

발간등록번호

11-1541000-001323-01

*H. pylori*에 대한 고역가 항체와
생육억제 복합물을 활용한 위장질환
기능성 식품의 개발

2012. 07. 24

남양유업주식회사

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “*H. pylori*에 대한 고역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 기능성 식품의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 23 일

주관연구기관명 : (주)남양유업
주관연구책임자 : 정 승 환
세부연구책임자 : 정 승 환
연 구 원 : 신 동 건
연 구 원 : 조 영 훈
협동연구기관명 : (주)비케이바이오
협동연구책임자 : 최 혁 준
협동연구기관명 : 조인(주)
협동연구책임자 : 김 춘 봉
협동연구기관명 : 가천대학교
협동연구책임자 : 박 중 현

요 약 문

I. 제 목

*Helicobacter pylori*에 대한 고역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 기능성 식품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

항-헬리코박터 난황항체, 유산균, 목이버섯 추출물 복합체를 개발하고, 이 복합체를 이용하여 *H. pylori*에 의한 위장질환을 예방하는 건강기능식품의 개발을 최종목표로 하였다.

2. 연구개발의 필요성

전 세계적으로 인구의 50% 이상이 *H. pylori*에 감염되어 있고 우리나라에서는 성인의 60-70%가 감염되어 있다. *H. pylori*는 1983년 호주의 Warren과 Marshall에 의해 인체의 위 점막에서 처음 분리되어 만성위염 및 소화성 궤양재발의 주요 원인인자임이 밝혀졌으며, 위암의 일부원인으로 추정되어 *H. pylori*의 박멸을 위한 다양한 치료방법이 연구되고 있다. 위 혹은 십이지장에서 약물 투여가 *H. pylori*의 감염에 대한 치료의 문제점으로 제시되고 있다.

최근에는 항생제를 사용하지 않는 새로운 치료개념의 일환으로 비 항생제성 물질들에 관심을 갖고 있다. 일반적으로 어떤 질병의 원인균에 대한 항체를 만들어 내고 그 항체를 이용하여 질병의 치료를 행한다면 가장 이상적인 방법이라 생각한다.

종래 토끼나 포유류를 면역시켜 그 혈액으로부터 특이적인 항체를 얻었으나 채혈과 정제로 인한 어려움과 식용의 문제점을 내포하였다. 그러나 난황으로부터 이행된 항체를 얻는 방법은 상기의 방법과 비교하여 채란과 항체수집이 용이하고 비용도 절감된다. 어미닭이 획득한 항체는 난황 중에 이행되어 축적되는 독특한 성질을 이용하여 항원을 산란계에 면역하고 특이항체를 얻는 방법이 확인되었다.

본 연구는 위염 및 십이지장염을 일으키는 주요 원인균인 *H. pylori*를 배양한 후 항원화하여 산란계에 면역시켜 특이항체를 생산하고 이를 함유하는 식품에 관한 것으로 이 특이항체를 이용하여 본 질병을 치료하기 위한 *H. pylori* 억제효과를 확인하였다.

또한 *H. pylori* 생육억제 기능으로 일부 유산균은 *H. pylori*에 항균물질을 분비한다는 연구보고가 있으며, 목이버섯의 다당류의 추출물이 *H. pylori*의 위점막 상피세포 부착을 억제한다는

연구가 보고되어 있어 본 연구는 항-헬리코박터 난황항체와 이에 대한 증폭효과로 유산균과 목이버섯 등 추가 기능성 소재로 확립하면서 발효유, 건강기능식품 등에 적용을 하기 위한 연구를 실시하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 최종 목표를 달성하기 위하여 총 6개의 세부, 협동과제 및 위탁과제를 구성하여 수행하였다.

세부과제에서는 본 과제를 통하여 개발된 항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발을 진행하였다. 항-헬리코박터 항체복합체를 건강기능식품에 적용하기 위해 난황항체, 유산균, 목이버섯추출물의 유효한 함량을 확인하였고, 각각의 원료가 발효유 제품에서의 문제가 없는지 확인하고 제품의 저장기간 동안 품질변화를 파악하기 위하여 공주공장에서 시험작업을 실시하였다.

제1협동과제에서는 헬리코박터균 항원 및 항체복합체 개발 연구를 하였다. 헬리코박터균의 배양 조건을 확립하고, 항원단백질을 제조할 균체를 준비하여 초음파 파쇄를 이용해 항원을 제조하였다. 항원을 닭에게 주사하여 난황으로부터 항체를 획득하고, 면역 기간에 따른 항체 역가를 분석하였다. 또한 헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 제조방법을 확립하고 대량생산에 적합한 제조방법을 확립하였다.

제2협동과제에서는 항-헬리코박터균 난황항체 생산을 하였다. 사양 및 면역항원의 생산조건을 확립하기 위하여 실험군 산란계 면역항원 접종방법 및 접종주기를 설정하였고 면역란을 수거하여 항체 역가측정에 따른 면역주기를 설정하였다. 또한 헬리코박터균 생육억제기능의 난황항체를 제조하기 위하여 면역항원이 접종된 계란의 살균조건을 확립하였다.

제3협동과제에서는 항-헬리코박터 유산균을 개발하고 항체 복합체 효능을 확인하는 실험을 하였다. 김치와 타락을 이용하여 유산균을 분리하고 헬리코박터균에 대한 억제 효능 및 유산균의 동정, 정제방법 등을 확립하였다.

건국대학교와의 위탁연구를 통해서도 세부과제에서 제공받은 목이버섯 추출물, 난황항체 IgY, 분리 유산균 상등액을 이용하여 *in vitro* 세포실험으로 *H. pylori* 균의 위벽세포 부착 억제 및 생육억제 효과를 확인하였고 각 물질들의 복합체를 제조하여 synergy 효과를 확인하였다.

충북대학교와의 위탁연구를 통해서도 항체 복합체를 함유하는 요거트형 시험물질이 *H. pylori* 균을 직접 사멸시키거나 위점막 내 생착을 방해함으로써 *H. pylori*가 이식된 동물모델에서 균을 퇴치하여 위염증을 개선시켜 주는지를 표준모델을 이용하여 입증하였다. 따라서 마우스 감염모델에 시험물질을 반복 경구투여하면서 위내에 이식된 균이 충분히 제거되고 그에 따라 위염이 개선되는지를 그 효능을 확인하였다.

IV. 연구개발결과

1. 항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발

항-헬리코박터 항체복합체를 함유한 유제품의 생산에 문제가 없는지 검토를 하였고, 이를 배합비, 제조공정, 영양성분, 관능검사 등으로 평가하였다.

항-헬리코박터 항체복합체를 함유한 유제품의 각 성분 사용량은 IgY가 0.5%, 유산균이 10^7 , 목이버섯 추출물이 0.1% 이다.

항-헬리코박터 항체복합체를 첨가한 유제품의 각 공정단계 별 검토사항은 기존의 유제품 제조 공정에서 시행하였을 때 문제점이 발견되지 않았으며, 보존성 실험에서 약간의 수분리 현상이 있었으나 관능에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

2. 헬리코박터균 항원 및 항체복합체 개발

본 실험에서 항원으로 사용한 균주는 *H. pylori* KCTC 12083(ATCC 43504)을 사용하였고, 배양조건은 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 brucella agar에 계대하여 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 10% FBS가 첨가된 brucella broth에 접종하여 37°C, 10% CO₂, 100 rpm 조건에서 36시간 동안 배양하였으며, growth curve를 측정한 결과 30시간에서 40시간에 가장 높은 활성을 보이며, 42시간 이후부터는 활성이 감소하는 경향을 보였다. 항원 개발을 위해 배양된 *H. pylori*를 초음파 파쇄 하였으며, adjuvant를 1:1로 혼합하여 100 µg/mL의 농도로 1회 주사량을 제조하였다.

면역한 닭이 생산한 면역란으로부터 IgY를 분리정제하기 위해 난황을 난백으로부터 분리 및 지질을 제거 후 filtering하여 냉동보관 하였다. 난황자체, λ-carrageenan 처리, kit 정제, column 정제 후 specific IgY 함량을 비교해 본 결과 column 정제(0.14%)가 가장 IgY 함량이 높으며, kit 정제(0.04%), λ-carrageenan 처리(0.03%) 순으로 함량이 높았고, 난황(0.01%)은 가장 함량이 낮았다.

목이버섯을 추출하는 공정은 분쇄, 침지, 가열, 여과 및 농축의 순서로 진행하였다. 각 공정 별 조건은 다음과 같다. 분쇄공정에서는 건조된 목이버섯을 10-20 mesh 정도 고르게 grinding 하였다. 침지는 분쇄된 목이버섯 100 g에 정제수 2000 ml(20배수)을 넣어 교반, 침지하였다. 가열공정에서는 95°C 이상에서 3시간 가열하며, 가열된 침지액을 여과를 위해 8000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 농축 공정에서는 여과된 상등액을 1-3 brix까지 농축하였다.

3. 항-헬리코박터균 난황항체 생산

축산물가공처리법의 살균액란의 규격인 일반세균 g당 10,000 이하, 대장균군 g당 10 이하, 살모넬라 음성 규격에 준하기 위하여 다음과 같은 살균조건 설정을 하였다.

열에 의한 안정성은 30분을 기준으로 55-62.5℃까지는 열에 안정성을 보였으며, 65℃ 이상에서는 항체의 열변성이 진행되었다. 또한 위 조건에서 미생물 규격에 적합하였다. 소독제는 차아염소산나트륨을 사용하였고, 물에 150-200 ppm까지 희석하여 난각을 소독한 결과 일반세균이 g당 170-350까지 줄어드는 경향을 보여주었다.

살균 전 가염 및 가당으로 인한 점도상승으로 살균에 문제점이 발견되어 살균 후 가염 및 가당을 실시하는 방식으로 변경하였고, 2차 오염을 방지하는 소독 및 청결상태를 유지하여 가염 및 가당하는 공정을 확립하였다.

4. 항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능 확인

김치와 타락으로부터 유산균을 분리한 결과 *Lactobacillus curvatus*, *Leuconotoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*를 각각 분리하였다.

각 유산균들 중 *H. pylori*에 대한 항균 효과가 우수한 균주를 당자화성과 16s rRNA 염기서열 분석한 결과 김치에서 분리한 LAB kw5는 *Leuconostoc mesenteroides*, 타락에서 분리한 LAB kw15는 *Streptococcus thermophilus*로 동정되었다.

*H. pylori*의 생육 저해는 유산균이 생성해 내는 항균 물질과 젖산 등에 의한 낮은 pH에 의한 작용인 것으로 알려져 있다. 분리된 유산균의 배양 상등액을 pH 7.0으로 보정하여 *H. pylori* 배양액에 첨가하여 시간에 따라 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 확인한 결과 표준균주와 야생형에서 모두 생육을 억제하는 것으로 확인되었다.

단일물질로 처리할 때보다 2가지의 복합물질이 더 효과가 높고 2가지의 복합물질보다는 3가지의 복합물질이 훨씬 효과가 높게 나타났다. 또한 3가지인 IgY + 목이버섯 + 유산균을 첨가하였을 때 *H. pylori* 생육저해에 탁월한 synergy 효과를 보여주었다.

5. *H. pylori*에 대한 고 역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 기능성 식품의 개발

항-헬리코박터 복합체의 부착 억제능 실험을 실시한 결과, 난황항체인 IgY 시료의 경우 최고 농도인 0.15 µg/ml에서도 부착 억제능이 관찰되지 않았으며, positive control로 사용한 일본 IgY 시료 역시 부착 억제능을 관찰할 수 없었다.

유산균 상등액 역시 40 mg/ml 이하의 농도에서는 *H. pylori* 균에 대한 부착 억제능이 관찰되지 않았다. 유산균 상등액의 경우 *H. pylori*균의 생육저해에 대한 연구가 보고된바 있지만 부착 억제능은 나타나지 않는 것으로 밝혀졌다.

목이버섯 추출물의 경우 0.5 brix에서는 두 균주 모두에서 60% 이상의 높은 부착 억제능을 보였으며, 0.125 brix까지도 미세한 부착 억제능을 관찰할 수 있었다.

앞서 결과를 보면 각 시료에 대한 부착 억제능은 목이버섯 추출물을 제외하고 뚜렷하게 나타나지 않았다. 본 연구에서는 효과가 미흡한 시료를 토대로 복합체를 제조하여 각 시료들에 대한 시너지 효과를 관찰하였다. 먼저 생육저해효과를 나타내지는 유산균 상등액과 난황항체 IgY를 바탕으로 2가지 복합체를 제조 후 부착 억제능 효과를 측정한 결과, 복합체 최종농도가 10 mg/ml 유산균 상등액 + 0.15 µg/ml IgY를 함유하는 복합체에서 약 30% 정도의 부착 억제능을 나타내었으며, 5 mg/ml 유산균 상등액 + 0.15 µg/ml IgY를 함유하는 복합체의 경우 약 10% 정도의 부착 억제능을 나타내었다. 유산균 분리균(L-15, L-5) 두 균주에 대해서는 별 다른 차이를 관찰할 수 없었다.

단일 물질에서도 효과를 보인 목이버섯 추출물과 난황항체 IgY 복합체의 경우 최종 농도가 0.125 brix 목이버섯 + 0.15 µg/ml IgY 복합체에서 약 69% 정도의 높은 부착 억제능을 보였으며 이는 목이버섯 단독으로 실험했을 때 나타난 효과(0.125 brix 목이버섯 = 약 27%)에 비해 훨씬 높은 부착 억제능이 관찰되었다.

6. 헬리코박터 퇴치 및 위염증 개선효능 평가

항 헬리코박터 난황항체 복합체를 포함하는 유제품의 마우스 실험을 통하여 그 효능을 입증하고자 하였다. 용매(감염) 대조군은 8마리 전부 감염이 확인됐으며, 위약대조군은 마우스 8마리 중 6마리가 감염 확정되었다. 실험군은 저용량군에서 8마리 중 5마리, 중간용량군에서 3마리, 고용량군에서 2마리로 농도에 따른 효능이 확인되었다. 고용량군의 경우 비교물질군과 비슷한 수준의 실험결과를 보여주었다.

항 헬리코박터 난황항체 복합체의 MIC 실험에서는 난황이 배지내 90 mg/ml 이상이 포함되어 있을 때 정균작용을 관찰할 수 있었다.

IgY 복합체의 urease 억제효능은 고농도의 IgY 복합체를 함유한 유제품에서 urease의 억제능력을 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제에서는 고면역화된 닭으로부터 항-헬리코박터 기능을 갖는 난황항체 뿐만 아니라 그를 이용한 제품화와 국내기술을 기반으로 연구를 추진하여 그 기술을 수출하고 국내외에 특허를 출원할 계획이다.

본 연구과제를 통하여 항 헬리코박터 난황항체 뿐만 아니라 그 효능을 증대시킬 수 있는 복합체를 개발하고, 난황항체, 유산균 및 목이버섯추출물 복합체를 최종 제품화하여 수입제품과의 경쟁력을 확보하고자 하며, 국산화 방향으로 연구를 추진하고 그 기술을 국내에 논문 1건 등재했으며, 특허 1건 출원 중에 있다.

본 연구과제에서 항 헬리코박터 난황항체와 유산균, 목이버섯추출물 복합제품 개발을 통해 *H. pylori* 부착 억제와 생육억제를 갖는 난황항체 복합체를 개발하였고, 식품소재화를 하여 건강 기능식품 및 기능성 유제품 등의 완제품과 기능성 원료를 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획이다. 특히 위염증을 일으키는 *H. pylori* 표면 특이단백질에 대한 항원분리, 정제를 통하여 항원성을 높이고 그 Target Antigen에 대한 특이성이 높은 항체를 개발하여 생산할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Development of stomach disease functional food that contained anti-*H. pylori* high activity Ab(IgY) and substance to suppress growth

II. Purpose and Necessity of Project

1. Purpose of Project

Purpose of this project is to develop the complex of anti-*Helicobacter pylori* antibody from egg yolk, lactic acid bacteria and *Auricularia auricula judae* extract and thereby develop functional food which prevents stomach disease by *H. pylori*.

2. Necessity of Project

Globally over the 50% of the human in the world are infected with *H. pylori* and in Korea, 60-70% are infected. *H. pylori* was first discovered by Warren and Marshall and isolated from mucous layer of stomach, and causes chronic gastritis, peptic ulcer and stomach cancer, and since then, numerous therapy is being researched. Drug delivery in stomach or duodenum is in problem for the treatment of *H. pylori* infection.

Recently new therapies which use non-antibiotics substance are in concern. Generally It is ideal method that the antibody is produced from bacteria and use the antibody for the treatment of illness.

Traditionally specific antibody was obtained from rabbit and mammal's blood, but, there is some difficulty in blood-taking and purification. Whereas obtaining antibody from yolk compared with above mentioned method is more simplified and inexpensive method. The antibody, obtained from hens, egg yolks and accrued and this unique properties using that immune the hens and obtain specific IgY are discovered.

This study is manufacture the specific IgY from immune the hens by *H. pylori* antigen that cause stomach disease and duodenitis, and IgY containing food. And identified suppress effect of *H. pylori* for therapy the disease using this IgY.

And study that several LAB are secrete antibiotic substrate that suppress growth HP and auricularia auricula judae polysaccharide extract are adherence inhibition to HP, is reported. And this study will try the anti *Helicobacter* IgY amplification this effect with LAB and auricularia auricula judae. Project will apply this material to yogurt and functional food.

III. Scope of Project

This project was performed by organizing total six main project team, collaboration team, and commissioned team in order to accomplish the final goal.

In the sub-project team, functional foods were developed containing anti-*H. pylori* antibody complex. The effective amount of egg yolk antibody, lactic acid bacteria, *Auricularia auricula judae* extract were identified for the application of anti-*H. pylori* antibody complex to the functional foods. The application of each raw materials to the fermented milks were checked and the pilot test was done to see the quality changes during the product's shelf-life.

In the 1st collaborative team, antigen and anti-*H. pylori* antibody complex were developed. The culture conditions pf *H. pylori* were established, and antigen was prepared by disruption of cells using ultrasonic. The antibody was obtained from egg yolk of which antigen had been injected to chicken, and the activity of antibody according to immunization period was analysed. Also the process of mass production of *Auricularia auricula judae* extract which contains inhibition effect against attachment activity on the intestinal tract of *H. pylori* was established.

In the 2nd collaborative team, anti-*H. pylori* egg yolk antibody was produced. The injection method and period of antigen were established to confirm the production condition of antigen. Also the sterilization condition of egg, which injected by antigen, was established for the manufacturing the egg yolk antigen which contains growth inhibition function of *H. pylori*.

In the 3rd collaborative team, anti-*H. pylori* lactic acid bacteria was developed and the function of antibody complex was identified. Lactic acid bacteria was isolated from kimchi and the growth inhibitory activity against *H. pylori* and identification of lactic acid bacteria and purification method were established.

In the commissioned team (Konkuk Univ.), effect of complex of *Auricularia auricula judae* extract, IgY, and lactic acid bacteria on the inhibition of attachment of *H. pylori* on the

stomach cells and cell growth of *H. pylori* by *in vitro* experiment was examined and identified its synergistic effect.

In the commissioned team (Chungbuk Univ.), The effect of yoruht containing antibody complex on the ulcer treatment was examined using animal model which *H. pylori* was inoculated. The test materials were orally administrated into model mouse and the eradication of *H. pylori* and the ulcer treatment was monitored.

IV. Results of Project

1. Development of functional food containing anti-*H. pylori* antigen complex

Check points of the production of fermented products containing anti-*H. pylori* antigen complex were established and these points were designated as formula, manufacturing process, nutritional aspects, sensory evaluation. Fermented products containing anti-*H. pylori* antigen complex consisted with 0.5% IgY, 10^7 cells of lactic acid bacteria, 0.1% *Auricularia auricula judae* extract. When check points of the processing steps for the fermented products containing anti-*H. pylori* antigen complex were examined, the integrity of developed processing steps were identical with processing steps of commercial fermented foods.

2. Development of antigen and antibody complex for *H. pylori*

H. pylori KCTC 12083(ATCC 43504) was used in this study and cells were cultured at 37°C, 10% CO₂, 100 rpm for 36 hr using brucells broth containing 10% FBS. Cells were maximally grown at 30 to 40 hr, and the cell growth decreased after 42 hr. *H. pylori* cells were disrupted using ultrasonic for the development of antigen and dosage for the each injection was determined as 100 µg/mL by mixing adjuvant as equal volume.

Egg yolk was isolated from egg white and the lipid was removed from egg yolk and then freed after filtration to purify the IgY from immunized egg. When egg yolk, λ-carrageenan-treated egg yolk, kit-purified IgY, column-purified IgY were compared, column-purified IgY (0.14%) contained the highest IgY content, and the next was kit-purified IgY(0.04%) and the λ-carrageenan-treated egg yolk contained the lowest IgY content.

Extraction process of *Auricularia auricula judae* was as follows; grinding, soaking, heating, filtration, and concentration. In grinding process, dried mushrooms were grinded to 10-20 meshes. In soaking process, 100 g of grinded mushroom was soaked into 2,000 mL of water and stirred. In heating process, soaked solution was heated at 95°C for 3 hr and then centrifuged at 8,000 rpm for 20 min. In concentration step, filtrate was concentrated to 1-3 brix.

3. Production of anti-*H. pylori* egg yolk antibody

The criteria of sterilized liquid egg based on the livestock processing act is as follows; below 10,000 CFU/g of total bacteria, below 10 CFU/g of coliform bacteria, *Salmonella* negative. To meet the above regulation, sterilization condition was established, and the antibody was stable at 55–62.5°C for 30 min, and denatured above 65°C. Sodium salt of hypochlorous acid was used as sanitizer, and when this sanitizer was used to egg shell at the concentration of 150–200 ppm, the viable cell numbers of total bacteria decreased to 170–350 CFU/g. Salt and sugar were added after sterilization due to the viscosity. Sanitation and cleaning processes were maintained for the prevention of secondary contamination.

4. Development of anti-*H. pylori* lactic acid bacteria and validation of antibody complex

Lactobacillus curvatus, *Leuconotoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* were isolated from kimchi and *Tarak*. Among these lactic acid bacteria, strains which show antibacterial effect against *H. pylori* were identified based on the carbohydrate utilization and the nucleotide sequence analysis of 16s rRNA gene. LAB kw5 isolated from kimchi was identified as *Leuconoostoc mesenteroides* and LAB kw15 isolated from *Tarak* was identified as *Streptococcus thermophilus*.

It is known that the growth inhibitory effect against *H. pylori* is attributed to the antibacterial material produced by lactic acid bacteria and the low pH due to the lactic acid. When the pH of the culture supernatane of isolated lactic acid bacteria was adjusted to 7.0 and added to the *H. pylori* culture, the growth of *H. pylori* was inhibited. When IgY, mushroom, and lactic acid bacteria was added to *H. pylori* culture as single, double, or triple combination, the growth inhibitory effect was the best in triple combination.

5. Development of stomach disease functional food that contained anti-*H. pylori* high activity Ab(IgY) and growth inhibitory complex

When the attachment inhibitory effect of anti-*H. pylori* antibody complex was checked, attachment inhibitory effect was not detected at the concentration of 0.15 µg/ml of IgY and 40 mg/ml of culture supernatant of lactic acid bacteria. Also 0.5 brix of mushroom extract showed over 60% of attachment inhibitory effect. Complex consisted of 10 mg/ml of culture supernatant of lactic acid bacteria and 0.15 µg/ml of IgY showed 30% of the attachment inhibitory effect, and the complex consisted of 5 mg/ml of culture supernatant of lactic acid bacteria and 0.15 µg/ml of IgY showed 10% of the attachment inhibitory effect. In contrast, complex consisted of 0.125 brix of mushroom extract and 0.15 µg/ml of IgY showed 69% of the attachment inhibitory effect, and this effect was higher than when mushroom extract alone used.

6. Validation of eradication of *H. pylori* and improvement of stomach ulcer treatment

The effectiveness of fermented milk containing anti-*H. pylori* antibody complex was estimated using mouse test. In infection control group, all eight mice were infected, and in placebo group, six out of eight mice were infected. In test groups, five mice in low dosage group, three mice in middle dosage group, two mice in high dosage group were infected, and this shows the concentration dependent effect of antibody complex.

From the MIC experiment using anti-*H. pylori* antibody complex, over 90 mg/ml of egg yolk showed bacterial static activity.

V. Outcome of Project and Application Plan.

Through project, obtain IgY from high immuned hens and this using products and carry project base on domestic technology, and that export technology and plan internal and external patent will apply

Through project, anti *Helicobacter* IgY beside that effect amplificate complex, are develop and complex of IgY and LAB, auricularia auricula judae extract make final product and then obtain competitiveness with import product and localize this technology. A paper was intervention and a patent was application, concerning this technology.

In this project, through develop complex anti *Helicobacter* IgY, LAB and auricularia auricula judae extract, adherence inhibit and suppress the growth of *H. pylori*. And this complex are apply to dairy product and functional food and expect sales to internal and external. Especially through separate surface specific protein and purification of *H. pylori*,

CONTENTS

Chapter 1. Summary of the research and development project	20
Chapter 2. Situation of the technology in domestic and foreign	21
Chapter 3. Contents and results of the research and development	22
Paragraph 1. Main project: Development of health functional food containing anti- <i>Helicobacter</i> antibody complex	
1. stabilization and formular development	
2. evaluation of safty and shelf life	
Paragraph 2. Collaborative project: Development of <i>helicobacter</i> antigen and antigen complex	
1. Development of <i>helicobacter</i> antigen	
2. Settle the production of auricularia auricula judae which have effect the detachment of <i>helicobacter</i>	
3. Mass production of auricularia auricula judae which have effect the detachment of <i>helicobacter</i>	
4. Establish the condition for mass produced of anti- <i>helicobacter</i> IgY	
5. Compare with the activity of product in domestic and foreign	
6. Quantitative analysis for content of anti <i>helicobacter</i> IgY	
7. Content analysis for anti <i>helicobacter</i> IgY following formular	
8. Valid content and stabilization through validation	
9. Establishment of effective antigen purification for industrialization	
Paragraph 3. Collaborative project: Production of anti <i>helicobacter</i> IgY	
1. Establish the specification and production condition	
2. Manufacturing of IgY	
Paragraph 4. Collaborative project: Development of anti <i>Helicobacter</i> , LAB and identify of antibody complex effect	
1. Screening of complex material and LAB what have function that suppress of <i>Helicobacter</i> growth	
2. Establishment of complex material and LAB what have function of suppress of <i>Helicobacter</i> growth	
3. Identify synergy effect of complex with IgY and LAB, auricularia auricula judae extract	
Paragraph 5. Researches commissioned: Development of stomach disease functional food that contained anti- <i>H. pylori</i> high activity IgY and substance to suppress growth	
1. A confirmation of IgY complex synergy effect through <i>in vitro</i>	

Paragraph 6. Researches commissioned: Efficacy of *Helicobacter* control and improvement of gastritis

1. A confirmation for IgY effect through *in vivo*
2. Minimum inhibitory concentration test of IgY complex
3. Effect of repress of IgY complex for urease

Chapter 4. The attainment of the goal and contribution for related field	148
Chapter 5. The results of the research and development and the application plan	152
Chapter 6. Foreign technology information obtained during the project	156
Chapter 7. References	159

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	22
	제 1절 세부과제: 항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발	
	1. 안정화 및 제형개발	
	2. 안전성 및 저장성 평가	
	제 2절 제1협동과제: 헬리코박터균 항원 및 항원복합체 개발	
	1. 헬리코박터 항원개발	
	2. 헬리코박터 부착억제 효과를 가지는 목이버섯추출물 제조방법확립	
	3. 헬리코박터 부착억제 효과를 가지는 목이버섯추출물 대량생산	
	4. 항-헬리코박터 IgY 대량생산을 위한 조건확립	
	5. 국내외 제품 역가 비교	
	6. 항-헬리코박터 난황항체 함량 정량분석	
	7. 제품 제형에 따른 항-헬리코박터 난황항체 함량분석	
	8. 헬리코박터 validation을 통한 유효함량 설정 및 안정화확인	
	9. 산업화를 위한 효율적 항체 정제 방법확립	
	제 3절 제2협동과제: 항-헬리코박터 난황항체 생산	
	1. 사양 및 생산조건 확립	
	2. 헬리코박터균 생육억제 기능의 난황항체 제조	
	제 4절 제3협동과제: 항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능확인	
	1. 헬리코박터균 생육억제기능의 복합체 재료 및 유산균 screening	
	2. 헬리코박터균 생육억제기능의 복합체 재료 및 유산균 확립	
	3. 난황항체, 유산균, 목이버섯 추출물 복합체 synergy 효능확인	
	제 5절 제1위탁과제: <i>H. pylori</i> 에 대한 고역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 기능성 식품의 개발	
	1. <i>in vitro</i> 를 통한 난황항체 복합물의 synergy 효능확인	
	제 6절 제2위탁과제: 헬리코박터 퇴치 및 위염증 개선 효능평가	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	148
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	152
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	156
제 7 장	참고문헌	159

제 1 장 연구개발과제의 개요

*H. pylori*는 위점막에서 처음 분리 동정된 이후, 위염, 위궤양 및 위암 같은 소화기질환의 원인으로 알려져 있으며, 특히 우리나라는 성인의 60-70%가 감염된 것으로 알려져 있다.

H. pylori 박멸을 위한 다양한 치료방법이 연구되고 있으나, 약물투여만으로 *H. pylori*가 제거되지 않아 재발률이 높고, 항생제에 대한 내성 및 약물의 부작용 등이 치료의 문제점으로 제기되고 있다.

항체를 이용한 질병치료 방법이 가장 이상적인 방법이 될 것이며, 난황으로부터 이행된 항체를 얻는 방법은 종래의 방법과 비교하여 채란과 항체수집이 용이하고 비용이 절감된다.

항 *H. pylori* 난황항체를 이용하여 위점막 부착과 염증발생을 감소시켜 재발률을 감소시키고 약물 부작용과 치료에 따른 막대한 비용절감이 기대된다.

그러나 국내에서 난황항체와 관련된 제품은 *H. pylori*에 대한 항체만을 사용한 유제품이 대부분이고, 보다 증대된 부착억제 기능소재나 생육억제 기능소재 등이 추가적으로 개발되어 있지 않아 더욱 기능이 탁월하고 우수한 제품의 개발이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 현재 면역항체 이외에 *H. pylori*의 성장을 저해하는 물질을 보다 광범위하게 screening하여 찾아내고 유산균과 목이버섯추출물 이외에도 보다 강력한 성장억제 기능소재를 찾아내어 synergy효과를 발현하는 항체복합체 개발을 실시하고자 하며 특히 위염증을 일으키는 *H. pylori* 표면 특이단백질에 대한 항원 분리, 정제를 통하여 항원성을 높이고 그 Target Anigen에 대한 특이성이 높은 항체를 생산하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

난황항체 관련 시장 현황은 주로 위장건강과 관련된 발효유와 유아설사 예방 목적으로 분유에 적용하여 면역관련 소재에 집중되어 왔고, 현재도 많은 부분을 차지하고 있다. 그러나 난황항체가 항생제 대체제를 시작으로 혈액에서 얻는 항체보다 위생적이고 대량생산이 가능하며 높은 가격 경쟁성 등의 많은 장점을 가지고 있으므로 이를 적용한 사업이 점차 확대되고 있다. 또한 최근 신종인플루엔자가 전 세계적으로 발생하면서 항체를 이용하여 바이러스를 제어하는 다양한 제품들이 출시되면서 더욱 손쉽게 산업화 할 수 있는 난황항체를 첨가한 식품뿐만 아니라 다양한 제품에까지 응용될 것으로 예상된다. 한 예로 난황항체 기술을 활용하여 여드름 치료에 도움이 되는 기능성 화장품이 출시되었다.

외국의 동향으로 일본은 이미 난황항체의 대량생산 및 산업적 이용기술이 먼저 개발되었고 또 가장 활발하게 연구되고 있기 때문에 이미 국내에 위장질환과 유아설사예방 관련 난황항체를 공급하고 있고 이외에 충치예방, 독감 바이러스 예방 난황항체를 제과, 마스크에 적용시켜 생산하고 있다. 미국의 경우 안정성에 중점을 두고 생산성을 높여 양질의 계란을 저렴하게 구입할 수 있게 함으로서 소비자의 신뢰를 계란 산업의 활성을 증진시키고 있다. 아울러 면역 및 치료제로서의 난황항체 전이기술을 비롯하여 저콜레스테롤 계란, 건강 기능성 물질 강화 계란 등의 전략을 내세워 새로운 소비 창출을 꾀하고 있다.

H. pylori 제어를 위한 난황항체 관련 제품은 아직 유제품이 대부분이고 보다 증대된 부착억제 기능소재나 생육억제 기능소재 등이 추가적으로 개발이 되어있지 않아 좀 더 기능이 탁월하고 우수한 제품의 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구를 통해 면역항체 이외에 *H. pylori* 성장을 저해하는 물질을 보다 광범위하게 screening하여 찾아내고 유산균과 목이버섯 추출물 이외에도 보다 강력한 성장억제 기능소재를 찾아내어 synergy 효과를 발현하는 항체복합체를 개발하고 기능성 소재 산업과 계란 산업을 증진시키며 계란을 이용한 지속적인 연구로 소비자에게 신뢰를 준다면 계란 산업을 넘어 식품 산업 활성화와 그에 대한 소비가 증가할 것이라 예상된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1 세부과제: 항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강 기능식품 개발

1. 안정화 및 제형개발

가. 재료 및 방법

(1) 검토원료

구분	IgY(난황항체)	유산균주(존스니균)	목이버섯추출물
사용량	0.5%	10^7	0.1%

(2) 발효유 제조

(가) 수유

축산물위생처리법에 의해 합격된 원유를 원심식 청정기로 진애물을 완전히 제거한 후 4℃ 이하로 냉각하여 저유탱크에 저장하였다.

(나) 조제

원유를 65℃로 가온한 후 여기에 탈지분유를 첨가하여 용해시켰다.

(다) 균질 및 살균

65℃에서 150-200 kgf/cm²의 압력으로 균질화한 후 95℃에서 5분간 살균하여 36-28℃로 냉각시켰다.

(라) 유당분해 및 발효

살균 조제액에 유당분해 효소를 첨가하고 10-20분 후 유산균을 접종하여 36-38℃로 유지하면서 7-9시간 발효시켰다. 배양이 완료된 후 과일유래 유산균을 투여하였다.

(마) 시럽 조제

정제수, 결정과당 등 당류, 식이섬유, 향료를 넣어 115℃로 15초간 살균하고 10℃로 냉각시켰다.

(바) 기능성원료 투입

검토원료를 용해하여 투입하였다.

(사) 혼합 및 냉각

발효가 완료된 발효액에 시럽 조제액을 넣어 분산, 혼합한 다음 냉각시켰다.

나. 실험결과

기능성원료 각각에 대한 조제실험을 한 결과는 Table 1-1과 같다. 기능성 원료 미첨가 제품인 대조군과 비교 시 관능, 침전, 당도, 산도 등에서 차이점이 없었다. 또한 예상 유통기간인 15일의 1.5배인 20일 동안 품질을 평가한 결과 특이사항은 보이지 않았다. 따라서 기능성 원료는 제품 적용 시 문제가 없을 것으로 판단되며, 확정 배합에 대한 시험작업으로 최종 적합성은 추가로 검토해야 할 것으로 사료된다.

Table 1-1. Result of mixing lactic-acid fermented milk with functional materials

구분	대조군	검토1	검토2	검토3
기능성 원료명	미첨가	IgY(난황항체)	유산균주(존스니균)	목이버섯추출물
조제상 문제점	없음	없음	없음	없음
침전	양호	양호	양호	양호
유산균수	15억	16억	16억	14억
당도	21.5	21.5	21.6	21.6
산도	0.75%	0.75%	0.76%	0.75%
보존 중 관능	1일차	이미, 이취없음	이미, 이취없음	좌동
	5일차	상동	상동	상동
	10일차	상동	상동	상동
	15일차	상동	상동	상동
	20일차	상동	상동	상동
판정	-	적합	적합	적합

2. 안전성 및 저장성 평가

가. 재료 및 방법

본 실험에서는 난황향체, 유산균, 목이버섯추출물을 적용한 발효유 제품에 대한 품질변화를 파악하기 위하여 제조공정 적합성, 공정단계별 규격 적합성, 제품검사(규격 적합성, 영양성분, 보존검사), 관능평가로 나누어 실험을 하였다.

(1) 제조공정

베이스 조제 및 배양은 기존 제품과 동일하며 유산균 투입방법은 기존 후침가 유산균 투입방법과 동일하게 첨가하였다.

(2) 공정단계별 검사

공정규격에 맞는 예열/조제, 발효, 균질/냉각 및 시럽조제(살균 전) 단계에 품질을 평가하였다.

(3) 제품검사

제품의 규격검사, 영양성분검사, 당류 및 보존검사로 나누어 실험을 실시하였다.

(4) 관능평가

연구소 내부 관능평가로 실시하였으며, 연구소 및 공주공장 직원 15명으로 구성된 패널로 기존의 제품과 blind로 관능평가를 실시하였다.

나. 실험결과

(1) 제조공정

베이스 조제 및 배양은 기존 제품과 동일(특이사항 없음) 하며, 유산균 투입방법은 기존 후침가 유산균 투입방법과 동일하였다. 시럽 조제, 혼합 및 포장 공정에서의 특이사항은 발견되지 않았다.

(2) 공정 단계별 검사

예열/조제, 발효, 균질/냉각 및 시럽조제의 각 공정 단계별 항목에 대한 검사결과 모두 적합판정을 하였다(Table 1-2).

Table 1-2. Result of checking process steps

순서	항목	규격	결과	판정
	성상	이미,이취,이물 無	적합	적합
	산도	0.18% 이하	0.15	"
예열/조제	비중	1.040-1.046	1.040	"
	당도	12-14 Brix	13.5	"
	침사	0.3 ml 이하	0.1	"
	성상	이미,이취,이물 無	적합	"
	배양시간	7-8 hr(적정산도 도달시)	7 hr	"
발효	산도	0.70~0.80%	0.80	"
공정규격	대장균군, 진균	음성	음성	"
	온도	37±3℃	37	"
	성상	이미, 이취 無	적합	"
균질/냉각	산도	0.75-0.85%	0.82	"
	당도	11-14 Brix	12	"
	성상	이미,이취,이물 無	적합	"
시럽조제	당도	64-66 Brix	64.7	"
(살균전)	산도	0.60-0.66	0.63	"
	pH	3.6-4.0	3.63	"

(3) 제품검사

(가) 규격검사

제품규격에 모두 적합하였다(Table 1-3).

Table 1-3. 규격검사 결과

항 목	규 격	결 과	판 정
성 상	이미,이취,이물 無	적합	적합
산 도	0.75-0.85%	0.79	적합
당 도	21-23 Brix	21.5	적합
비 중	1.079-1.085	1.081	적합
대장균, 진균	음성	음성	적합
유산균수	1×10^8 이상/ml	24억	적합
총고형분	22-25%	23	적합

(나) 영양성분검사

영양성분검사 결과 모두 적합하였다(Table 1-4).

Table 1-4. 영양성분검사 결과

항 목	표시사항	결 과	판 정
단백질(g)	4	3.78	적합
지방(g)	3	3	적합
수분(g)	-	77	-
회분(g)	-	0.79	-
나트륨(mg)	60	42	적합

(다) 당류

당류 검사결과 fructose가 가장 많은 비중을 차지하며, 구성은 아래 표(Table 1-5)와 같은 결과를 얻었다.

Table 1-5. 당류 결과

항목	변경	비고
Fructose(g)	4.98	-
Glucose(g)	3.25	-
Sucrose(g)	0.42	-
Maltose(g)	0.51	-
Lactose(g)	불검출	-
예상 총당함량(g)	12.41	Galactose 이론치 포함

(라) 보존검사

냉장상태에서 16일간 보존하였으며 보존기간 중 관능, 산도, 당도변화가 크게 나타나지 않았다. 단, 수분리 현상이 기존 제품에 비해 다소 높았으나, 냉장보존 5일차까지는 큰 차이가 없었으며, 9일차부터 차이를 나타냈다. 16일차 보존샘플의 경우 기존대비 30% 이상 수분리량이 많았다(Table 1-6).

Table 1-6. 보존기간에 따른 제품의 변화

항 목	1일차	3일차	5일차	7일차	9일차	11일차	13일차	16일차	
수분리 (g/봉)	기존	-	-	0.58	-	0.7	-	1.8	2.5
	리뉴얼	-	-	0.58	-	1.1	-	3.2	3.4
산도	0.80	0.80	0.81	0.82	0.84	0.85	0.85	0.86	
당도	21.5	21.4	20.9	21	21	21	20.7	20.9	
관능	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호	

(4) 관능평가

기존 제품과 blind로 관능평가를 실시한 결과 리뉴얼 제품에 대한 선호도가 다소 높았으나 유의적 차이는 없었다. 난황 첨가에 따른 이미, 이취가 잘 마스킹 되었다(Table 1-7).

Table 1-7. 관능검사 결과

구분	기존	리뉴얼	비고
고형감	3.2	3.07	5점법(강도)
감미	3.40	3.27	5점법(강도)
산미	2.93	2.93	5점법(강도)
향미	3.40	3.27	선호도
선호도	3.47	3.53	선호도
선호인원(명)	7	8	-

(5점 척도 / *: 3점 「적당하다」)

제 2 절 2 세부과제: 헬리코박터균 항원 및 항원복합체 개발

1. 헬리코박터균 항원개발

가. 재료 및 방법

(1) *H. pylori* 배양 및 항원제조

본 실험에서 항원으로 사용한 균주는 *H. pylori* KCTC 12083(ATCC 43504)을 사용하였고, 고체배양은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 첨가된 brucella agar에 계대하여 37℃, 10% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 액체배양은 10% FBS가 첨가된 brucella broth에 접종하여 37℃, 10% CO₂, 100 rpm 조건에서 36시간 동안 배양하였다. 균의 오염여부는 catalase test 및 urea broth를 이용한 urease test를 실시하여 확인하였다. 활성이 좋은 균체를 얻기 위해 액체 배양 조건에서 growth curve를 측정하였다.

(2) *H. pylori* 항원화 및 면역

H. pylori 항원화를 위해 PBS(Phosphate Buffered Saline)에 현탁한 *H. pylori*를 Ultrasonicator를 사용하여 20,000 Hz, 27초 씩 6회 동안 초음파 파쇄하여 항원 단백질을 제조하였다. 단백질 정량은 Bradford법을 이용하여 측정하였다.

면역은 항원단백질에 동량의 adjuvant(Montanide ISA 70)를 1:1의 비율로 혼합하여 100 µg/ml 농도의 1회 주사량을 제조하였다. 접종은 제조액 1 ml을 37주 된 산란계 20수에 가슴주사 하였으며, 1차 접종 후 2주 간격으로 총 3회 면역과 booster 면역 2회를 실시하였다. Booster 면역은 항체 역가를 고려하여 3차 접종 후 6주째에 실시하였다.

(3) 면역란 회수 및 IgY 분리정제

면역란은 1차 접종 후 11일째부터 주마다 2회 회수하였다. 면역란으로부터 IgY의 분리는 난황을 난백과 분리한 후 난황의 질량을 측정하고 증류수를 7배 혼합하였다. 실온에서 30분간 교반한 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 냉동 보관하였다.

(4) IgY 역가 측정

면역란으로부터 얻은 IgY 역가를 측정하기 위하여 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 수행하였다. 항원을 96 well plate에 넣고 4℃에서 overnight 하여 coating하였다. PBS-T(Phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4) buffer로 3회 washing한 후 1% BSA를 250 µl씩 넣고 23℃에서 1시간 동안 blocking하였다. PBS-T buffer로 3회 washing한 후 10 배씩 희석된 시료 및 standard를 200 µl씩 넣고 23℃에서 1시간 동안

반응시켰다. PBS-T buffer로 3회 washing한 후 2nd Ab-conjugate로 anti-chicken IgG Ab-HRP conjugate를 희석한 용액을 200 μ l씩 넣고 23°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T buffer로 3회 washing한 후 chromogen(TMB) 용액 50 μ l를 넣고 바로 substrate 용액 100 μ l를 넣은 후 23°C에서 10분 동안 반응시켰다. Stop 용액(2 M H₂SO₄)을 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시킨 후, 450 nm에서 ELISA reader로 각 well의 흡광도를 측정하여 standard와 비교하여 항체 역가를 unit으로 산출하였다.

나. 실험결과

(1) Growth curve

H. pylori ATCC 43504의 growth curve를 측정된 결과 fig 2-1과 같았다. 접종 후 30시간에서 40시간에 가장 높은 활성을 보였으며 42시간 이후부터는 활성이 감소하는 경향을 보였다.

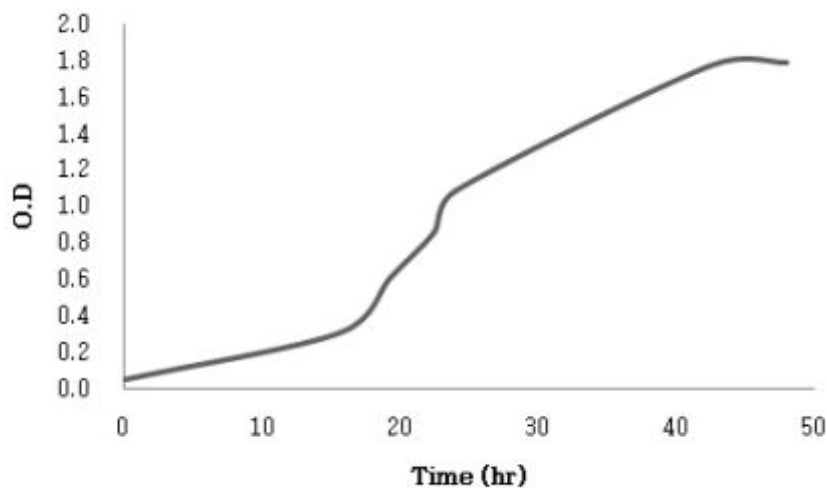


Fig. 2-1. Growth curve of *H. pylori* in Brucella broth supplement with 10% FBS

(2) IgY 역가 standard 설정

항체 역가는 면역 2주 후부터 측정하였고, 접종 후 11일째 수거한 면역란의 OD값을 기준으로 면역란의 항체 역가를 측정하였다. 면역란을 실험 시료로 제조한 후 10배씩 희석하여 항체 역가를 측정하였고 standard curve를 측정하였다(Fig. 2-2). 그래프에 가장 경사진 희석배수를 1 unit으로 설정하였고, ELISA법으로 측정된 OD값을 standard curve에 대입하여 항체 역가를 unit으로 표시하였다. 실험환경(온도, 시간 등)을 고려하여 1 unit 시료를 매 주 수거한 면역란과 같이 측정하였고, negative control로는 면역화하지 않은 조인(주) 일반란을 사용하였다.

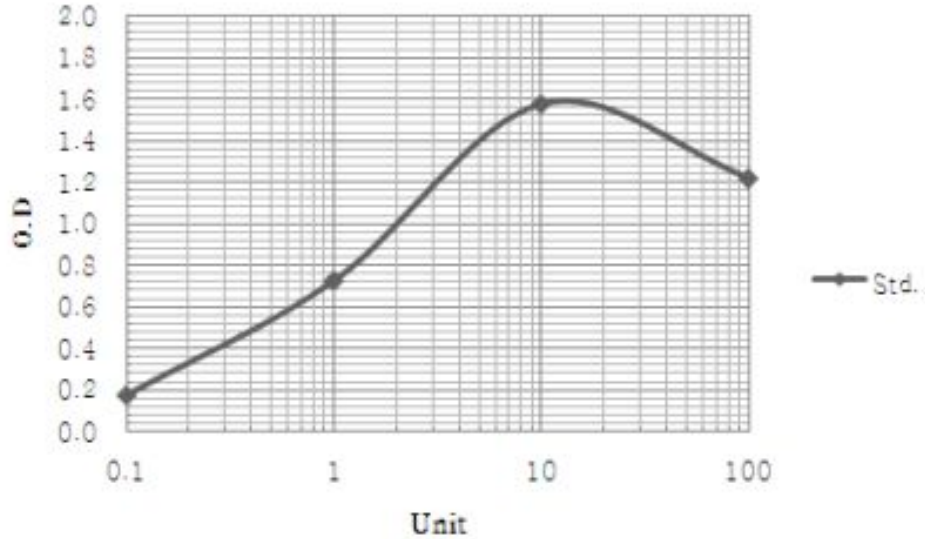


Fig. 2-2. Standard curve of IgY-*H. pylori*(collected after 11 days)

(3) IgY 역가 측정

면역 기간 동안의 항체 역가 측정 결과는 Fig. 2-3, Table 2-1와 같다. 1차 접종 후 7주째까지는 항체 역가가 상승곡선을 나타내다가 그 이후로 감소하는 추세였고 10주째 booster 면역을 한 결과 10주 이후부터는 다시 상승하는 모습을 보였다. 5-7주째에 항체 역가가 가장 높게 나타났고 10주째에는 가장 낮은 역가를 보였다.

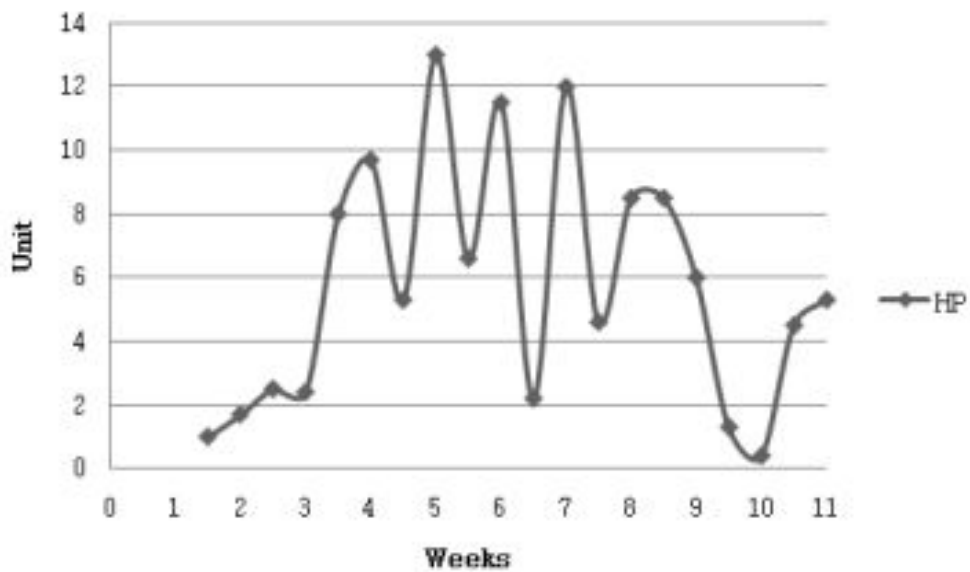


Fig. 2-3. Changes of antibody activity in egg yolk during the immunization period

Table 2-1. Measurement of antibody activity by unit in the immunization period

Date	Week	Unit	Note	Date	Week	Unit	Note
11/16	1.5	1.0		12/21	6.5	2.2	
11/19	2.0	1.7	2nd immunization	12/24	7.0	12.0	
11/23	2.5	2.5		12/28	7.5	0.5	
11/26	3.0	2.4		12/31	8.0	1.1	
11/30	3.5	8.0		01/04	8.5	8.5	
12/03	4.0	9.7	3rd immunization	01/07	9.0	6.0	
12/07	4.5	5.3		01/11	9.5	1.3	
12/10	5.0	13.0		01/14	10.0	0.4	4th immunization
12/14	5.5	6.6		01/18	10.5	4.5	
12/17	6.0	11.5		01/21	11.0	5.3	

2. 헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 제조방법 확립

가. 재료 및 방법

(1) 목이버섯 추출

분쇄된 목이버섯을 증류수에 침지하여 90℃에서 3시간 동안 가열하고 원심분리와 체를 이용하여 상등액을 여과한 후 1 brix정도의 농도로 제조하였다. 또한 목이버섯의 최적 추출 조건을 찾고자 열수량(20배수, 50배수), 효소 처리 유무, 효소의 종류(amylase, pullulanase, cellulase), 1, 2차 에탄올 처리 유무, 여과 방법(원심분리, 체, 광목) 등의 조건을 달리하여 수행하였다.

(2) 헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 정제, 분석

헬리코박터균에 부착저해효과를 가지는 목이버섯의 산업화를 위해 대량생산에 맞는 제조법 확립과 더불어 기능성분의 유효성을 검증하기 위한 목이버섯 추출물의 정제를 통한 분석을 실시하였다.

열수추출 및 에탄올 침전을 행하여 목이버섯으로부터 헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 활성다당체를 추출하였다. HPLC 분석을 통해 활성 다당체의 분자량을 평가하였으며, 구성당 분석을 통해 활성 다당체를 구성하고 있는 당의 종류와 비율을 확인하였다.

(가) 목이버섯 추출물 제조

본 실험에서는 헬리코박터균 부착억제 활성을 갖는 목이버섯 유래 활성 다당을 획득하기 위해 다음과 같은 방법으로 추출을 실시하였다.

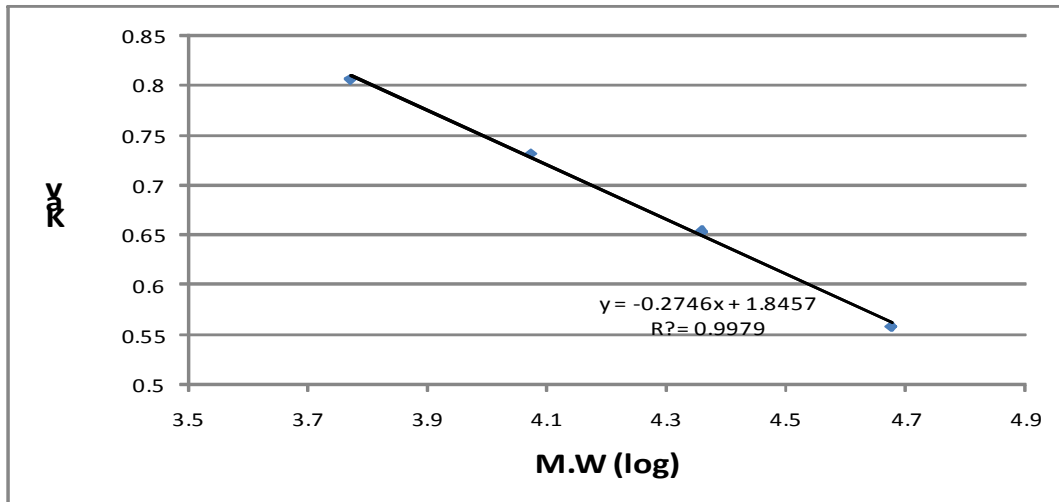
건조 목이버섯을 10-20 mesh정도 고르게 분쇄한 후 분쇄된 목이버섯 100 g에 정제수 2000 ml(20배수)을 넣어 교반, 침지하여 95°C 이상에서 3시간 가열하였다. 가열된 침지액을 8000 rpm, 20분 조건에서 원심분리를 행하여 상등액을 회수하고 상등액에 4배 volume의 ethanol을 가하여 다당을 침전시켰다. 그 후 8000 rpm, 30분 조건에서 원심분리를 행하여 침전된 다당을 회수하고 투석을 통하여 저분자 불순물을 제거하였다(cut-off 2,000의 dialysis tubing). 투석된 다당은 동결건조 후 분석용 시료로 사용하였다.

(나) 목이버섯 추출 다당의 분자량 측정

목이버섯 추출 다당의 분자량 측정을 위하여 시료를 1 mg/ml의 농도로 증류수에 녹여 Table 2-2의 분석조건으로 high performance liquid chromatography(HPLC)를 행하였다. 분자량 측정은 표준물질 pullulan series(P-50, 20, 10 및 5)를 이용하여 retention time을 측정한 후 각 분자량에 대한 KAV값을 산출하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

Table 2-2. Analytical conditions of HPLC for the determination of molecular weight of polysaccharide

Pump	YL9110(YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Detector	YL9170(RI, YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Column	SUGAR KS-803 column(Shodex Co. Ltd., Japan)
Column size	8 × 300 mm
Column temp.	50°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)
Injection vol.	20 µL
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)



$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_t : total volume

V_o : void volume

V_e : eluent volume

(다) 목이버섯 추출 활성 다당의 구성당 분석

헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 유래 활성 다당의 구성당 분석은 Albersheim 등의 방법을 일부 변형하여 유도체화 한 후 GC를 이용하여 분석하였다(Table 2-3, Fig.2-4). 다당 시료를 TFA 중에서 121°C에서 반응시켜 가수분해한 후 NH_4OH 에 용해하여 NaBH_4 로 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH_4 로 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH_4 를 제거한 후, methanol을 가하여 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거 하여 상당하는 alditol로 전환하였다. 전환된 alditol acetate는 chloroform, H_2O 2상 용매계로 분리하여 추출하였으며, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다.

Table 2-3. Analytical condition of gas chromatography for component sugar analysis

Apparatus	GC(ACME-6100, Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Frame ionization detector(FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column(Supelco, USA)
Column size	0.2 μm , 0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.2 μm film thickness
Oven temp.	60°C(1 min) \rightarrow 220°C(12 min) \rightarrow 250°C(15 min) 30°C/min 8°C/min
Injector temp.	240°C
Detector temp.	270°C
Carrier gas	N ₂ (1.5 ml/min)
Integrator	Autocro data module(Young-Lin Co. Ltd., Korea)

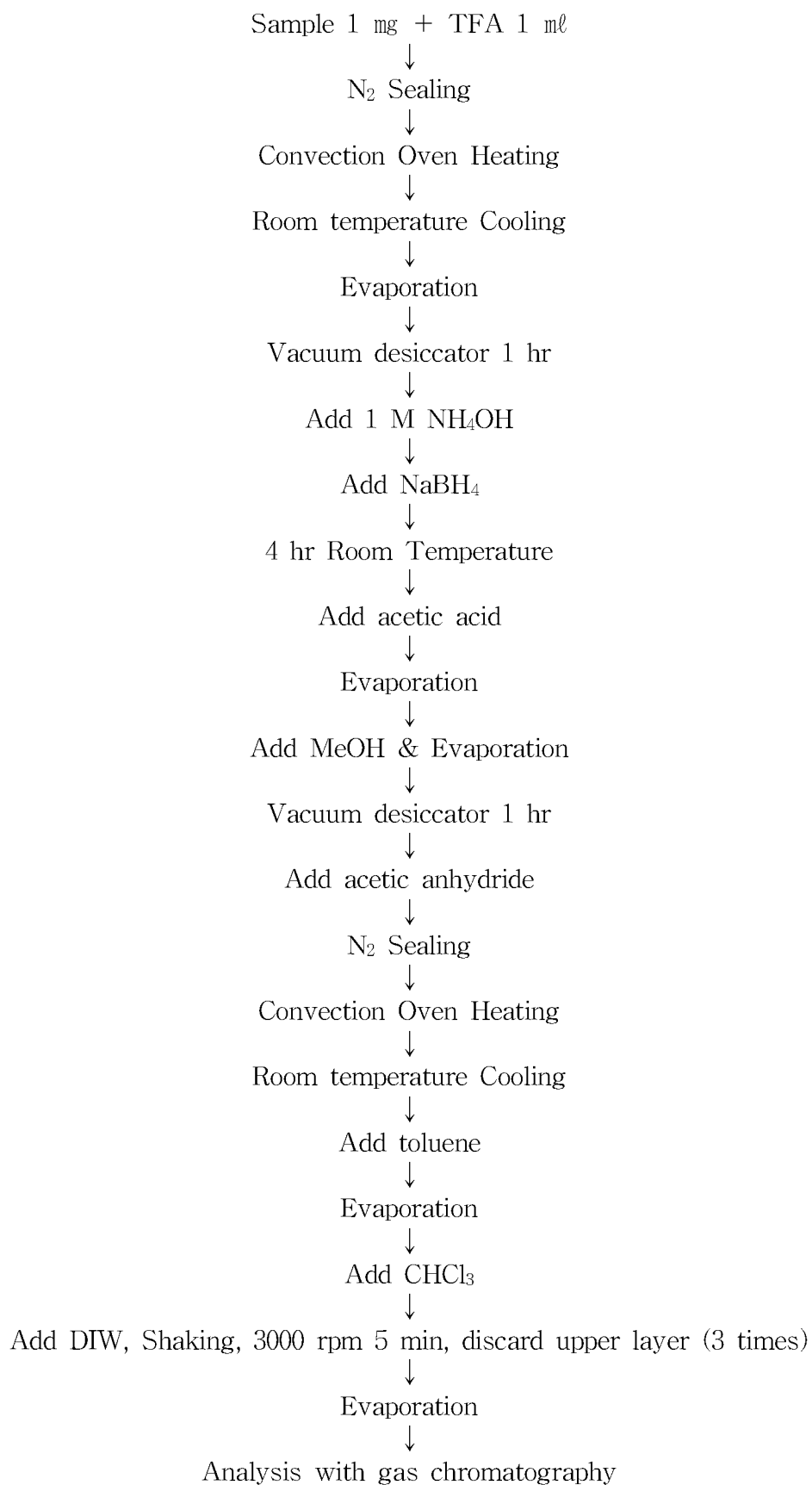


Fig. 2-4. Procedure of component sugar analysis

나. 실험결과

(1) 목이버섯 추출물 제조방법 확립

목이버섯의 효과적인 추출 방법 연구를 위해 목이버섯을 열수량, 효소 처리 유무, 효소의 종류, 에탄올 처리 유무, 여과 방법 등을 달리하여 추출 실험을 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

(가) 에탄올 처리 후 열수 추출 시 비교 실험

에탄올로 처리 후 추출 시 최종 제품을 획득하는 작업 편의성은 좋으나 용해성이 없고, 무처리 일 때의 경우가 수율이 더 높아 에탄올 처리는 효과적인 방법이 아니라고 판단하였다(Fig. 2-5).

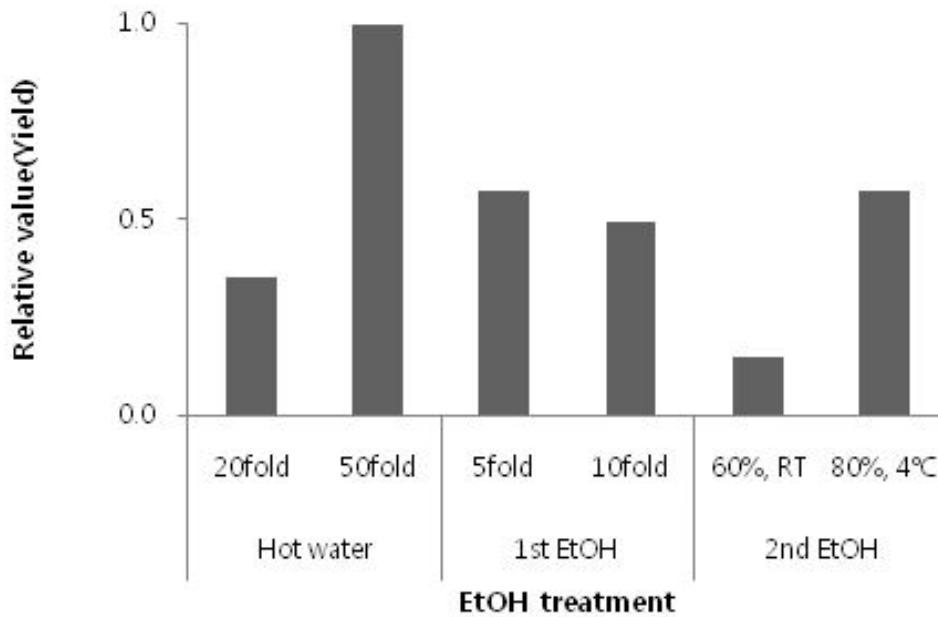


Fig. 2-5. 에탄올 처리 유무에 따른 수율 비교

(나) 효소 처리 후 열수 추출 시 비교 실험

평균적으로 무처리군에 비해 수율이 1.5배정도 더 높은 결과를 얻을 수 있었으나, 효소의 투입량을 고려할 때 투입 비용 대비 수율 증가가 미비하여 대량생산에 적합하지 않다고 판단하였다(Fig. 2-6).



Fig. 2-6. 효소 처리 및 종류에 따른 수율 비교

(다) 열처리 조건에 따른 수율 비교 실험

열수로 처리 시 적용량 50배 첨가 시에 수율이 가장 높으나 대량 생산 시에 핸들링해야 하는 부피가 너무 증가되어 대량 생산 시에는 적합하지 않고, 열수 처리와 고온건조 처리 시 비슷한 수율과 용해성을 보였으나 생산 비용과 효율 면에서 열수 처리가 더 적합하다 판단하였다(Fig. 2-7).

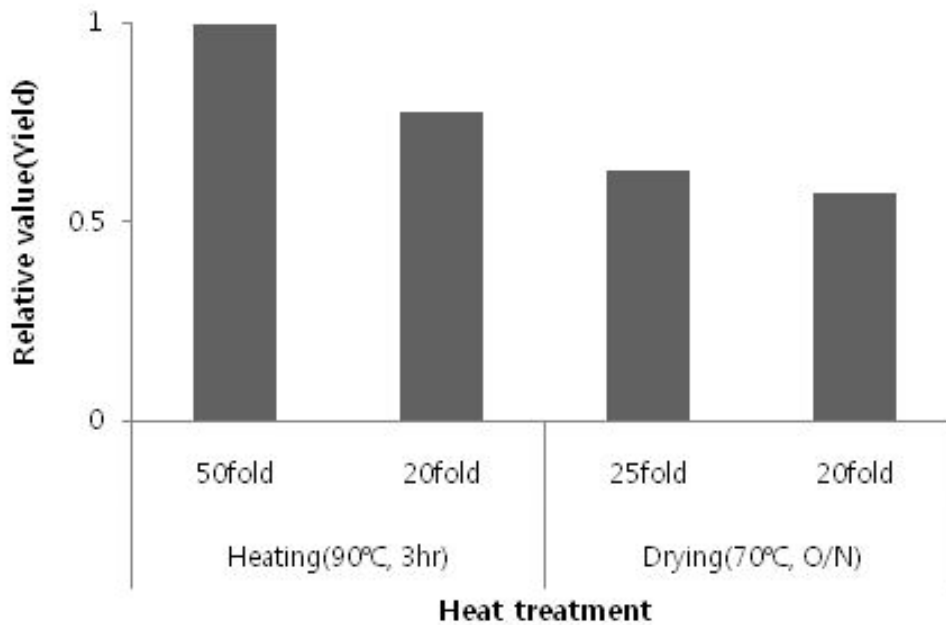


Fig. 2-7. 열처리 조건에 따른 수율 비교

(라) 여과방법에 따른 수율 비교

일반적으로 한약재 등의 천연물 여과에 많이 사용하는 광목을 가지고 여과 처리 시 거의 여과가 되지 않고 핸들링이 어려웠다. 원심분리 시 체로 처리하는 것보다 보다 수율이 좋으며, 두 가지 병행으로 순차적으로 적용 시 수율이 가장 좋았다(Fig. 2-8).

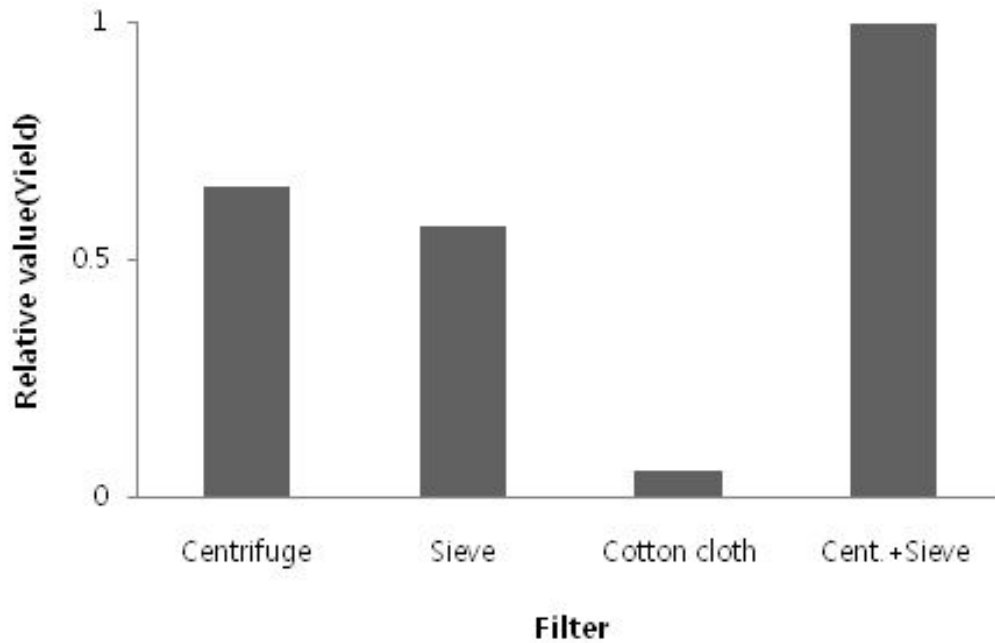
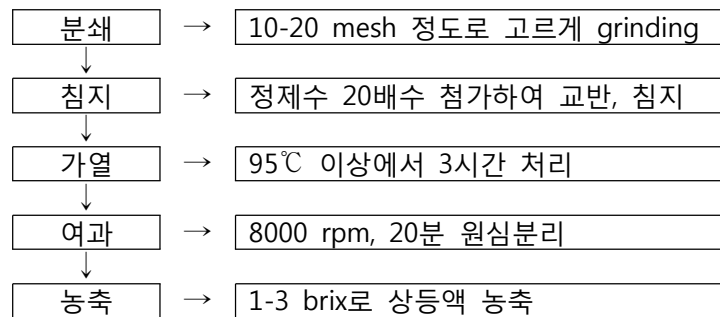


Fig. 2-8. 여과방법에 따른 수율 비교

상기의 조건 별 실험을 통해 향후 대량 생산을 위한 제조방법은 다음과 같으며(Fig 2-9), 이를 기초로 scale-up 실험을 통해 효율적 대량 생산법 및 경제성으로 평가할 예정이다.



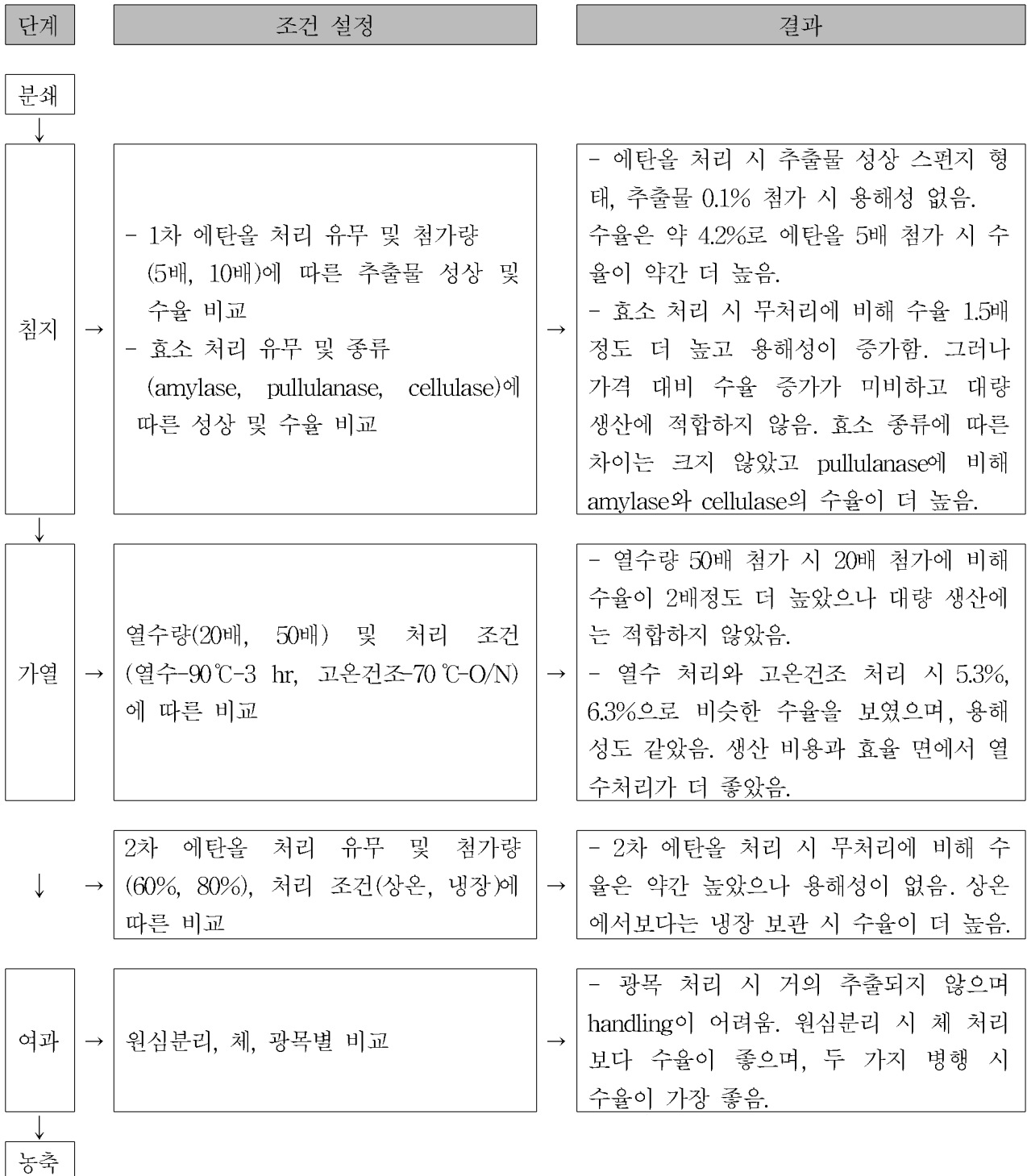
- ① 분쇄 : 건조 목이버섯을 10-20 mesh 정도 고르게 grinding 한다.
- ② 침지 : 분쇄된 목이버섯 100 g에 정제수 2000 mL(20배수)을 넣어 교반, 침지한다.
- ③ 가열 : 95℃ 이상에서 3시간 가열한다.
- ④ 여과 : 점성이 있는 상태의 용액을 여과한다.
 - a. 원심분리(8000 rpm, 20분) : 수율이 가장 좋음
 - b. Filter Press : 수율 낮음
 - c. 망 또는 체 여과 : 수율 낮음
- ⑤ 농축 : 여과된 상등액을 농축한다(1-3 brix 정도까지).

Fig. 2-9. 목이버섯 추출물 제조방법

3. 헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 대량 생산

(1) 목이버섯 추출물 대량 생산 및 최적 대량생산 조건 설정

대량생산에 적합한 최적 추출 조건을 찾고자 열수량, 효소 처리 유무, 효소의 종류, 1, 2차 에탄올 처리 유무, 여과 방법 등의 조건을 달리하여 수행한 주요한 내용을 상세 도식화 하면 다음과 같다.



목이버섯으로부터 열수 추출물의 대량 생산 공정인 분쇄, 침지, 가열, 여과, 농축 단계 중 주요 공정은 침지 공정 중 최소한의 정제수를 사용하여 working volume을 줄이는 방법과 열수 추출 후 여과공정을 효율적으로 처리하는 방안이다. 이 두 공정에 대한 효율성 검토를 통해 대량 생산 공정을 확립해야 할 것이다.

(2) 대량생산 시 경제성 평가 및 개선

(가) 목이버섯 추출물 소재의 품질평가

최적 공정을 통해 얻어진 목이버섯 추출물의 품질은 구성성분을 기준으로 판단하여야 한다. 즉, 고형분 함량을 기준으로 경시적 변화에 대한 결과를 조사하고, 식품으로서의 품질관리 기준에 적합 여부를 조사하여야 한다. 얻어진 목이버섯 추출물의 품질관리 기준을 다음의 표 (Table 2-4)에 보였다.

Table 2-4. Quality control items

항목	목이버섯 추출물 예시 1	목이버섯 추출물 예시 2
외관	연갈색의 점질 액상	연황색의 점질 액상
수분	< 99%	< 97%
고형분 함량	> 1%	> 3%
일반세균	< 10,000 cfu/g	< 10,000 cfu/g
대장균군	불검출	불검출

품질평가 요인에서 외관의 경우 목이버섯 원료에서 얻어진 추출물은 각각 그 원료의 색에서 연유된 칼라를 지니고 있어 일관적인 색의 지정은 불가능하였다. 따라서 각각의 원료의 색을 기준으로 제품의 색에 전이된 형태의 제품만이 가능하였다. 여기서 색을 통일하기 위한 탈색의 과정은 제품의 가격 및 안전성 측면에서 추가적인 공정의 적용이 의미가 없다고 판단하였다.

수분의 경우 제품이 점질의 액상이기 때문에 1차적으로 액상 제품으로 제조할 경우 의미가 없지만 고형분 대비 상대적 비율로 설정하였다. 고형분의 경우 목이버섯 추출물도 다른 버섯류 추출물과 같이 만노오즈, 갈락토오즈 등의 점질 다당을 많이 함유하고 있는 추출물처럼 일정 농도 이상으로 농축할 시 거품이 다량 발생하여 감압 농축기로 작업 가능한 농도로 설정하였다. 기준이 되는 생산공정의 경우 Scale-up 후 시운전 단계에서 얻어진 시제품을 기준으로 재분석하여 생산공정의 정확성, 재현성 등을 근거로 재설정하여야 한다고 보았다.

일반세균의 경우 식품원료의 경우 정확한 기준이 설정되어 있지는 않으나, 본 연구에서는 일반적인 기준으로 10,000 cfu/g의 기준을 설정하였다. 일반세균의 경우 원료에서 기인하는 부분은 없다고 볼 수 있으며, 제조공정의 분쇄과정 및 농축과정에서 연유될 수 있다. 따라서 제품

의 제조공정 상의 외부오염균의 유입을 예방한다면 일반세균 설정 기준을 만족시키는 것은 매우 용이하다고 할 수 있다. 대장균군의 경우 현재 식품공전상의 관리기준으로 설정하였다. 즉, 대장균군의 경우 불검출이 전제로 되어있어 이를 기준으로 설정하였다.

(나) 목이버섯 추출물의 대량 생산 공정 및 설비 최적화

● 제조공정 검토

목이버섯 추출물은 원료를 분쇄하는 단계, 침지를 하여 추출이 용이하도록 전처리하는 단계, 가열을 통해 목적물질을 효과적으로 추출하는 단계, 추출 후 추출물질의 획득을 위한 여과단계, 제품화를 위한 농축단계를 통해 얻을 수 있다.

● 분쇄공정

목이버섯에 수용성의 추출물을 얻기 위해서는 먼저 건조된 버섯을 미 분쇄할 필요가 있다. 분쇄를 위한 버섯 원료는 수분이 충분히 제거되어야 하며, 20 mesh 이하의 크기로 세분 하여야 하며, 세분시에는 건조식 colloidal-mill 형태의 miller를 사용하는 것이 바람직하다.

● 침지공정

침지 공정이 이후 실시될 열수 추출 공정의 이전 단계로 충분한 수화를 통해 최대의 목적물질을 추출하기 위해 시행한다. 이때 투입되는 물의 양에 추후 농축 공정의 비용 절감을 위해 최소화해야 하는데 목이버섯의 경우 수분 보유력이 우수한 식이섬유류가 다량 존재하여 많은 수분을 필요로 하게 된다. 따라서 lab. scale에서 실시한 20배수 첨가에 의한 방법과 함께 연속 교반을 통한 침지물질의 유동성을 증대 확인을 위해 20배수, 15배수, 10배수, 5배수의 물로 수화 추출 작업을 실시해 본 결과, 교반을 하지 않고 정치 시에는 20배수의 물이 필요하지만, 50 rpm 이상의 교반 시에는 15배수의 물을 투입하여도 이후 공정에 커다란 무리가 없는 것으로 판단되었다.

● 가열공정

가열 공정의 목적은 효과적으로 목이버섯의 기능물질을 추출함과 동시에 위생적으로 안전한 추출 용매를 사용함으로써 식품으로 안전하게 제조할 수 있어야 한다. 또한 가열 시간을 최대한 단축시킴으로서 열 에너지 비용을 최소화해야 하는데, lab. scale에서 기준으로 했던 3시간 추출 조건 이외에 교반기로 50 rpm이상의 대류를 통해 충분한 열교환을 실시할 경우 적게는 1시간 30분에서 많게는 2시간이면 충분한 추출이 가능함을 확인하여 대량 생산 시에는 교반을 통해 2시간 동안 95℃로 추출하는 것으로 설정하였다.

● 여과공정

여과 공정의 경우 점질 다당이 많은 것이 버섯류의 특징인 것처럼, 일반 여과지나 광목을 사용할 경우 막힘 현상으로 인해 여과 수율이 낮거나 작업이 불가능한 상황이 되어 lab. scale에서는 8000 rpm에서 20분간 원심분리 후 sieve로 거르는 것으로 설정을 하였다. 그러나 원심분리 공정의 경우 대량 생산 시 탈수공정에 많이 사용하는 원심분리기 또는 Filter press를 사용하

게 된다. 원심분리기는 제품의 생산 Capa.상 연속식을 사용하여야 한다. 일반적으로 연속식 원심분리기는 Disk type, Horizontal decanter를 고려할 수 있으며, Horizontal decanter가 가장 적절한 것으로 고려되었다. 그 이유는 연속공정이 가능하면서 동시에 얻어지는 Cake의 고형분 함량이 가장 높기 때문에 후속적인 건조공정에서 시간과, 에너지를 절약할 수 있어, 전체 공정의 생산성을 극대화 할 수 있기 때문이다. 다음의 Table 2-5에 원심분리기, Filter Press, Decanter를 기준으로 생산성을 비교하였다. 설비의 기준은 유사한 처리 Capa.를 기준으로 하였다.

Table 2-5. Comparison of productivity in filtering process

	원심분리기	Filter Press	Decanter
Feed의 고형분(%)	10	10	10
Cake의 고형분(%)	19	55	43
Productivity (고형분 Kg/Hr)	1	2.8	12.2

그 결과 원심분리기를 기준으로 할 때 Horizontal decanter는 얻어지는 Cake의 고형분 함량이 상대적으로 높으며, 특히 Filter Press와 비교할 경우 필터프레스의 경우 얻어지는 고형분의 함량이 다소 높으나, 준비와 해체하는 시간이 매우 길고, 운전의 용이성이 많이 떨어진다는 단점이 있어, 전체적인 Productivity를 고려할 때 Horizontal decanter(Fig. 2-10)가 가장 우수한 것으로 나타났다.

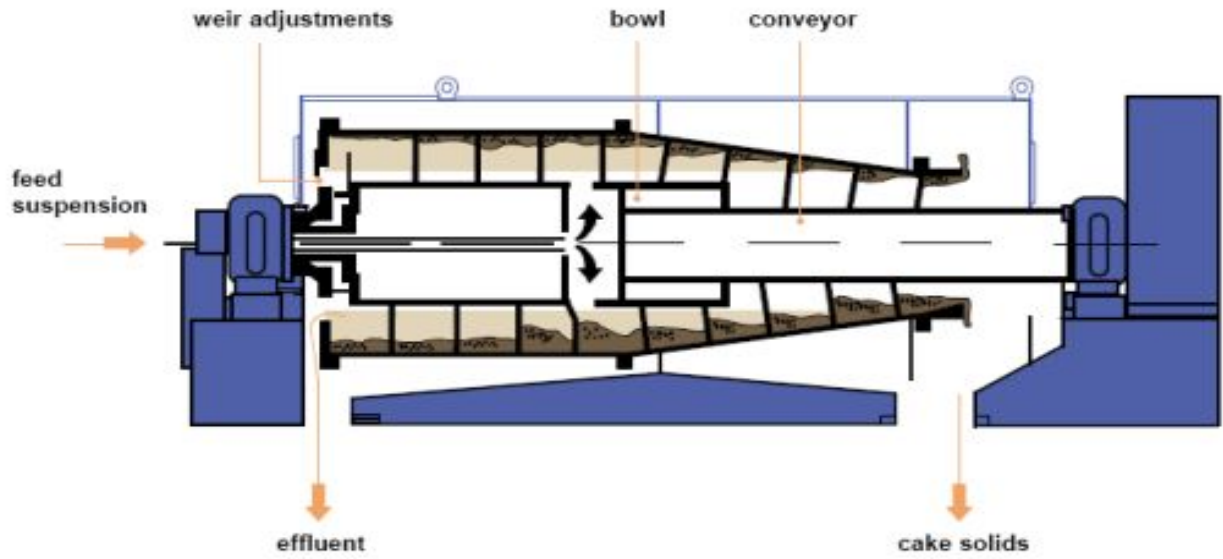


Fig. 2-10. Schematic diagram of horizontal screw decanter

● 농축공정

농축공정은 최종 제품의 규격화와 더불어 부피를 최소화 하여 부가가치를 부여하여 최종 제품화 하고, 위생적인 포장을 위한 단계라 할 수 있다. 목이버섯 추출물의 경우 특유의 수용성 점질 다당 때문에 기포가 다량으로 발생되어 특정 농도 이상으로 감압 농축이 불가하다. lab. scale의 경우 최소 1%에서 최대 3% 이상 고형분 함량의 제품의 제조가 한계로 판단되어 대량 생산시에는 UF를 통해 농축하는 방법을 적용하여 부피를 1차적으로 최소화 한 후 감압 농축을 하는 것으로 에너지 소비를 최소화 하였다. 실시 시 UF의 경우 막의 막힘현상이 많았고, MF에서는 막힘현상이 낮았으나, 농축의 효과를 위하여는 UF 300 kDa를 사용하여 1차적으로 농축 후 감압 농축하는 것으로 설정을 하였다.

(다) 공정 최적화

위에서 얻어진 공정을 기준으로 하여 전체공정을 구성하였다. 개별 공정의 최적 조작조건을 다음의 Table 2-6에 보였다. 또한, 시스템의 구현을 위한 Mixer의 Design Sheet도 다음과 같으며, 시스템의 디자인을 위한 일반적인 고려사항을 [공정 디자인 자료]에 별도 표기하였다.

Table 2-6. Optimum operation conditions





공정명	운전조건	기타조건
Grinding	<ul style="list-style-type: none"> ● 건식 colloidal miller ● Temp. : RT ● Time : 30분 이상 	원료의 종류에 따라 시간의 조절이 필요함.
Soaking	<ul style="list-style-type: none"> ● Rpm : 50이상 ● Time : 30분 이상 ● 용매배수 : 15배수 	
Extraction	<ul style="list-style-type: none"> ● Temp. : 95℃ ● Time : 2시간 이상 ● 용매배수 : 15배수 	
Mixing	<ul style="list-style-type: none"> ● RPM : 50이상 	
Centrifuge	<ul style="list-style-type: none"> ● Horizontal Decanter Type ● 원심력 : (1,000-2,000) 	2-3회 반복하여 세척함. 원료의 종류에 따라 원심력의 조절이 필요함.
Sieving	<ul style="list-style-type: none"> ● 원심분리로 선처리된 추출물 여과 ● 20 mesh로 선별함. 	
Packing	<ul style="list-style-type: none"> ● PE재질의 플라스틱 용기에 담아 냉동 	

(3) 대량생산 추출물의 제형별(액상, 분말) 저장조건 및 유통기한 설정 실험

(가) 목이버섯 추출물의 분말 제품화 시험

목이버섯 열수 추출물에 부형제로써 DE 12-18의 dextrin을 추출물의 고형분 대비 30%, 50%, 80%로 첨가하여 혼합 후 동결건조하여 분말로 제조한 후 각각의 제품별 품질 특성을 살펴보았다. 결과 육안 관찰 시 50% 첨가의 경우가 목이버섯 추출물 고유의 색을 가지며, 취급 시에도 날림 현상이 없고 안정적인 분말 성상을 보여 가장 적합한 제형으로 판단되었다(Table 2-7).

Table 2-7. Quality control items

목이버섯 추출분말제품				
Dextrin 첨가량	-	30%	50%	80%
특징	솜형태로 취급이 불편	약간 날림현상이 발생 우려	고유의 색을 가지며 안정적인 제형을 보임	고유의 색 낮아짐
비교 평가 (5점 척도)	1	2	4	3

항목	목이버섯 추출물 예시1	목이버섯 추출물 예시1	목이버섯 추출물 예시1
외관	연갈색의 분말	연황색의 분말	백색의 분말
수분	< 5%	< 5%	< 5%
목이버섯 추출물 함량	> 70%	> 50%	> 20%
일반세균	< 10,000 cfu/g	< 10,000 cfu/g	< 10,000 cfu/g
대장균군	불검출	불검출	불검출
회분	< 2%	< 2%	< 2%

분말화 제품의 대량 생산 시의 건조 및 포장공정에 대한 검토를 액상 제품과 별도로 실시하였으며 내용은 다음과 같다.

(나) 건조공정

건조공정은 건조시의 온도와 밀접한 관련이 있다. 특히 일부 시료의 경우 함유한 당성분의 양에 따라 고온 건조 시 갈변하는 특성이 있어 제품의 색을 일정하게 유지하기 위해서는 건조과정에서 적절한 온도와 시간의 설정이 매우 중요하다. 본 연구의 목이버섯 추출물의 경우 점도가 많아 부형제의 첨가량에 따라 건조공정에서의 허용 가능한 온도와 시간이 조정되게 된다. 일반적으로 제품의 품질관리기준의 설정 한도에서 온도는 가능한 높게, 시간은 가능한 짧게 설정하는 것이 공정의 생산원가를 낮추면서 생산성은 높이는 방법이 될 수 있다. Horizontal screw decanter를 사용하여 얻어진 시료를 이용한 건조방법 별 건조시간 및 생산성을 비교하여 보았다. 그 결과를 Table 2-8에 보였다.

Table 2-8. Comparison of productivity with different drying process

	열풍건조	진공건조(60 Torr)	동결건조
건조소요시간*(hr)	40	26	48
Productivity(kg/hr)	3.5	2.5	1.45
분말의 색깔의 진하기(1-10)	5	2	1

* : 최종 수분함량 5% 이하 기준

열풍건조의 경우 탈수과정에서 수분의 함량이 충분히 낮아진다면 적절한 뒤적임의 과정을 통해 건조과정을 빠르게 할 수 있었다. 그러나 건조과정상의 온도를 올리는 부분이 잔류 당의 카라멜화 반응으로 인하여 고온으로 건조하는 과정에서 색이 진해지는 문제점이 있었다. 진공건조의 경우 동결건조와 마찬가지로 진공도에 따라 수분의 증발이 진행되므로 갈변이 거의 진행되지 않았으며, 품질도 일관되게 유지되었으나, 생산성이 열풍건조에 비하여 떨어지는 단점이 있었으며, 동결건조의 경우 얻어지는 제품의 밀도가 상대적으로 낮아지며 고가의 비용이 소요되고, 생산성이 매우 낮으나 제품의 품질은 가장 우수한 방법이었다.

본 연구에서는 제품의 가격과 품질 및 생산성을 고려하여 열풍건조와 진공건조를 병행하는 방식을 고려하였다. 즉, 초기의 수분이 많은 상황에서는 진공건조방식을 택하고, 그 후에는 열풍건조방식으로 건조하여 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 선정하고자 하였다(Table 2-9).

Table 2-9. Apparent powder density comparison with different drying process

Process	Convection Drying	Vacuum Drying	Freeze Drying
Apparent Density(g/ml)	0.64	0.55	0.46

(다) 포장공정

목이버섯 추출분말 제품의 포장방법은 그 제형에 따라 구분되어 진다. 본 제품의 경우 최종 형태가 분말상 이므로 이를 감안하여 수분의 완전히 차단될 수 있는 포장재의 선정이 필요하였다. 가장 널리 사용되는 것으로는 알루미늄에 폴리에틸렌을 라이닝 한 것으로서 저렴한 가격 및 내구성, 산소 차단성으로 인하여 가장 적합한 것으로 판단되었으며, 그 외의 투명의 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등도 가능하였으나, 분말의 특성 상 내구성 측면과, 수분투과성 측면이 주요 고려대상으로 할 경우 라이닝된 알루미늄이 가장 적합하였다. 알루미늄의 경우 진공포장도

가능하였으며, 이 경우 포장 후 70℃에서 6개월간 저장하여도 품질에는 아무런 이상이 없었다.

목이버섯 추출분말 제품의 경우 효모의 제거가 완벽할 경우 가장 안정적인 품질유지가 가능하였으며, 불완전한 효모제거의 경우 흡습성이 증가되어 완벽한 차단, 밀봉이 중요한 인자로 나타났다. 일반적인 습도조건에서는 분말의 흡습성은 문제가 되지 않았으나, 여름철 상대습도가 90%에 이를 경우 흡습으로 인하여 분말의 유동성이 현저하게 저하되는 문제점이 발생하였다. 따라서 포장 작업 시 포장실의 상대습도를 최대 70% 이하로 유지하여야 하였으며, 포장에 소요되는 시간 역시 최소화 하여 흡습을 줄여야 하였다.

포장지의 경우 수분의 차단이 가장 완벽한 재질은 알루미늄에 폴리에틸린이 라미네이팅된 재질로서 시중에서 손쉽게 구할 수 있는 것이었으며, 그 외의 일반적인 폴리에틸렌, 폴리프로필렌의 경우 20 kg 정도의 양을 포장하는 것이 용이하지 않았으며 보관성 측면에서도 알루미늄 파우치에 비하여 뛰어나지 않았다. 다만, 포장용지의 가격적인 면에서 알루미늄 파우치의 가격이 상대적으로 비싸 이를 감안하여야 한다면 폴리프로필렌 수지를 이용한 포장 및 별도의 지박스 포장으로 대체가 가능하다고 보았다. 포장 시 용기 내에는 반드시 수분의 흡수를 위한 실리카겔을 첨가하여야 하며 입구는 열접착을 이중으로 하여 외부와 완벽하게 차단하여야 한다.

분말은 진공포장하는 것도 용이하였으며 그 경우 진공을 해제할 경우 손쉽게 분말로 되어 사용에 문제가 없었다. 진공포장의 경우 공기투과성이 낮은 재질로 알루미늄파우치, 폴리프로필렌 등이 적용 가능하였으며, 경우에 따라 질소를 퍼징하고 밀봉하는 것도 입자의 유동성과 유통기간을 확보하는데 용이하였다. 질소퍼징의 경우 포장단계가 추가되어야 하는 문제점 및 번거로움 때문에 권장하기는 어려우나 제품의 입자유동성은 가장 잘 유지되는 측면에서 장점이 있었다.

(라) 포장 및 유통방법 확립

목이버섯 추출분말 제품의 포장방법은 알루미늄의 경우 진공포장도 가능하였으며, 이 경우 포장 후 70℃에서 6개월간 저장하여도 품질에는 아무런 이상이 없었다. 효모의 제거가 완벽할 경우 가장 안정적인 품질유지가 가능하였으며, 불완전한 효모제거의 경우 흡습성이 증가되어 완벽한 차단, 밀봉이 중요한 인자로 나타났다.

포장방법의 경우 앞서 제시된 결과와 같이 기밀용기를 기준으로 밀봉하여 유통하는 것이 가장 적절하며, 흡습성이 있어 이를 예방하기 위하여 방습제를 포함시켜서 포장하는 것이 좋다. 유통방법의 경우 상온에서 분말상이 잘 유지되므로 별도의 유통조건을 필요로 하지는 않았다. 특히, 냉장 또는 냉동과 같은 유통조건에 대한 필요성은 없다고 보았다.

(마) 각 제품의 보존별 shelf life 평가

● 목이버섯 추출물

목이버섯 추출물의 경우 액상 상태에서는 제품의 보존성이 높지 않아 냉동 조건으로 포장 및

유통하는 것으로 조건으로 설정하였다. 제조된 제품의 경우 색상은 미황색을 띄었으며 품질검사 결과 일반적인 추출 제품의 품질규격인 대장균, 대장균 군의 불검출 및 일반세균수 < 10,000 cfu/g 이하의 조건을 만족하였다.

따라서 상기의 기준을 1차적인 내부 품질관리기준으로 하여, 30℃ 정치식 인큐베이터에 보관하여 가속시험을 통해 품질의 변화를 조사하였다. 제품의 형태는 액상을 기준으로 하였으며, 포장형태는 PE 재질의 플라스틱 용기에 밀봉하는 것으로 하였다. 제품의 산화에 의한 변질 등을 방지하기 위하여 질소 충전하는 것까지를 고려의 대상으로 하였다.

제품의 품질 상태는 육안으로서 색도의 변색 정도와 냄새를 통한 변패취의 생성 여부를 관찰하였고 결과는 아래 Table 2-10에 나타내었다. 결과는 초기 저장시의 색이었던 미황색이 2개월, 4개월, 6개월까지 변화 없이 지속됨을 관찰 할 수 있었고 냄새 역시 초기와 변화 없이, 변패취가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 밀봉상태에서 2년의 유통기한 설정을 결정할 수 있었다.

Table 2-10. Appearance and off-flavor of extracted solution as treatment day at 30℃

저장 기간(달)	2개월	4개월	6개월
외관(색)	미황색	미황색	미황색
변패취	없음	없음	없음

● 목이버섯 추출 분말

제품의 보존성은 유통기한의 설정과 관련되어 있다. 유통기한은 일반적으로 분말의 경우 2년으로 설정한다. 이는 이 기간이 경과 후까지 기준으로 제시한 품질특성이 유지되어야 함을 의미한다. 따라서 이를 확보하기 위해서는 품질기준의 항목의 설정은 법적인 기준에서 적절하게 설정하여야 하며, 지나치게 엄격하거나, 과도하게 세분화된 설정은 지향하여야 한다. 그 이유는 지나치게 엄격할 경우 제품의 품질이 유지되고 있다고 할 수 있는 상황에서도 제품의 판매가 불가능해지는 상황을 초래 할 수 있기 때문이다.

목이버섯 추출물에 dextrin을 혼합하여 건조한 후 얻어진 목이버섯 추출 분말 제품의 경우 수분함량 5% 미만으로 품질검사 결과 대장균, 대장균 군의 불검출 및 일반세균수 <10,000 cfu/g 이하의 품질규격을 만족하였다.

따라서 상기의 기준을 1차적인 내부 품질관리기준으로 하여, 50℃의 온도에서 품질의 변화를 조사하였다. 제품의 형태는 분말상을 기준으로 하였으며, 포장형태는 알루미늄파우치에 열압착하여 밀봉하는 것으로 하였다. 제품의 산화에 의한 변질 등을 방지하기 위하여 질소 충전하는 것까지를 고려의 대상으로 하였다. 품질의 평가는 저장 기간 별 제품의 외관(색)의 관찰 및 변패취의 생성, 식이섬유 및 조단백질의 함량을 측정하였고 그 결과는 아래 Table 2-11에 보였다.

표에서 알 수 있는 바와 같이 50℃에서의 처리 결과에서도 6개월간의 처리에도 불구하고 제품의 특성에 거의 변화가 없다는 것을 알 수 있었다. 특히, 정량화가 용이하지 못한 냄새에 있어서도 거의 변화가 없어 제품의 유통기한을 2년으로 설정하는 것에 문제가 없다고 판단하였다.

Table 2-11. Comparisons of property change under different temperatures

항목	외관(색)	변패취	일반세균	대장균군
70% 목이버섯				
2개월	연갈색	없음	적합	적합
4개월	연갈색	없음	적합	적합
6개월	연갈색	없음	적합	적합
50% 목이버섯				
2개월	연황색	없음	적합	적합
4개월	연황색	없음	적합	적합
6개월	연황색	없음	적합	적합
20% 목이버섯				
2개월	백색	없음	적합	적합
4개월	백색	없음	적합	적합
6개월	백색	없음	적합	적합

(4) 목이버섯 추출 다당의 분자량 측정

목이버섯 추출 활성 다당의 HPLC 분석을 수행한 결과(Fig. 2-10) P-1(RT ; 12.83 min)과 P-2(RT ; 14.57 min) 두 가지 peak가 나타남으로써 분자량이 상이한 다당체가 함께 존재하고 있음을 확인하였다. 비교적 저분자 peak인 P-2의 경우 KAV 값을 산출하여 작성된 표준곡선으로부터 분자량을 환산한 결과 37 kDa의 다당체로 밝혀졌다. 하지만 고분자 peak인 P-1의 경우 보유하고 있는 분자량 측정 시스템(SUGAR KS-803 column)의 측정범위(6 kDa-50 kDa)를 초과하여 정확한 분자량을 측정하지 못하였다. P-1의 예상 분자량은 100 kDa에서 200 kDa 정도일 것으로 추정되며, 정확한 분자량 측정은 추후 충분한 시스템을 갖추어 수행 할 예정이다.

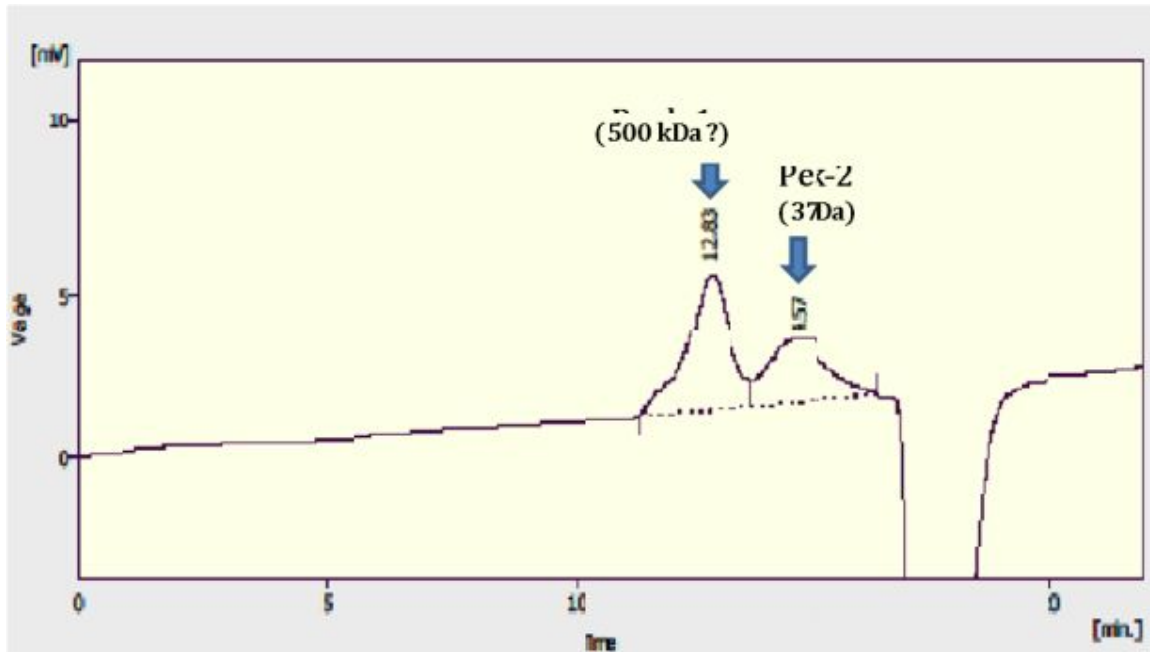


Fig. 2-10. Elution patterns of polysaccharide extracted from *Auricularia Auricula-judae* on size-exclusion HPLC equipped with SUGAR KS-803 column

(5) 목이버섯 추출 활성 다당의 구성당 분석

목이버섯으로부터 획득한 활성 다당체의 구성당 분석을 행한 결과 glucose(38.9%)와 mannose(26.2%)의 함량이 높았으며, 그 외에도 galactose(14.26%), xylose(11.06%) 및 fucose(7.31%) 등의 usual sugar가 다양하게 존재하고 있음이 확인되었다(Table 2-12, Fig. 2-12, Fig. 2-13)

일반적으로 *Auricularia* 속 버섯류의 활성다당체는 β -glucan, glucurono-xylomannan 및 glucomannan이 알려져 있다. 구성당 분석결과 glucose, mannose 및 xylose의 함량이 비교적 높다는 점과 앞선 HPLC 분석결과 분자량이 상이한 다당체가 혼재하고 있다는 사실은 목이버섯 유래 헬리코박터균 부착억제 활성 다당은 glucurono-xylomannan 혹은 glucomannan이 β -glucan과 함께 존재하는 혼합물일 가능성을 강력하게 시사한다.

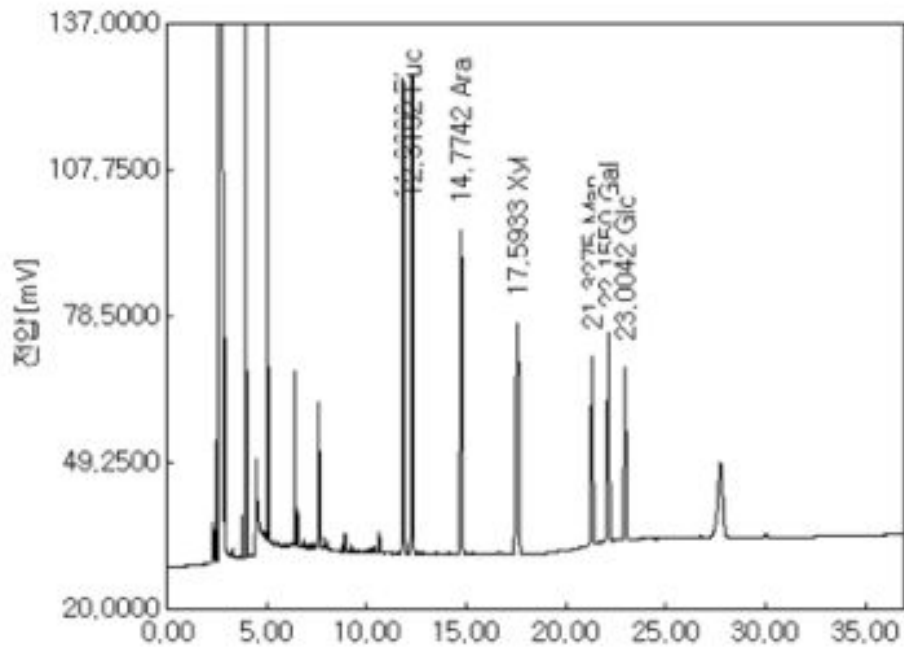


Fig. 2-12. Chromatography of acetylated alditols derived from usual sugar mixture (rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose and glucose)

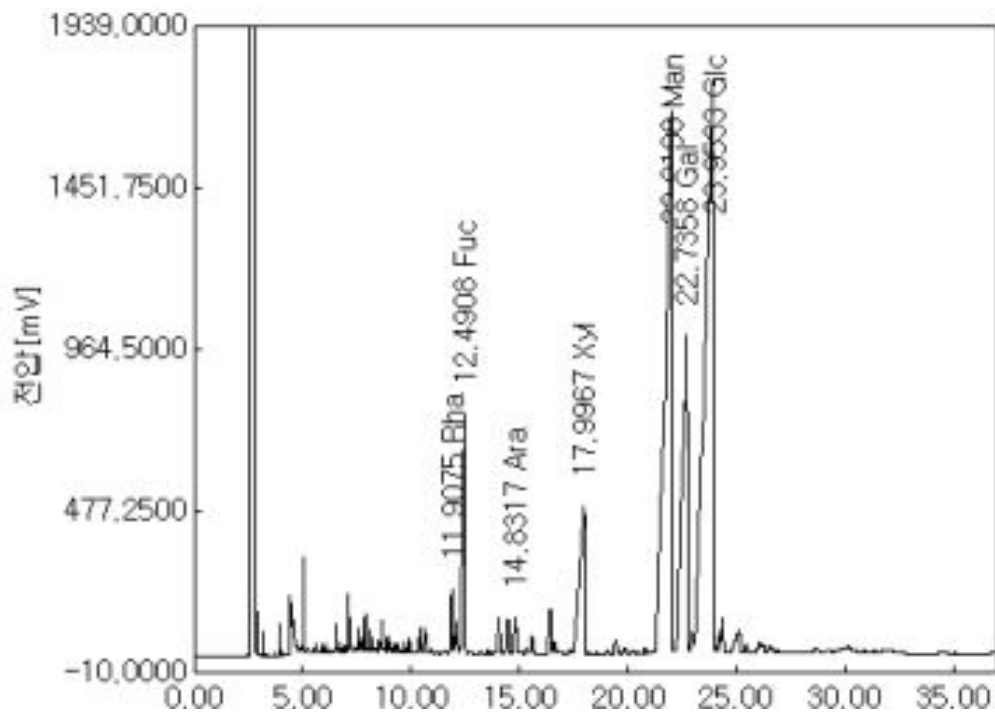


Fig. 2-13. Chromatography of acetylated alditols derived from polysaccharide extracted from *Auricularia Auricula-judae*.

Table 2-12. Component sugar constituents of polysaccharide extracted from *Auricularia Auricula-judae*

	area	M.W	r.f	area/M.W x r.f	Mol %
Rha	903.1083	376	1.311	3.149	1.237
Fuc	5388.246	376	1.298	18.601	7.307
Ara	716.0508	362	1.309	2.589	1.017
Xyl	6986.353	362	1.459	28.158	11.061
Man	30497.05	434	0.95	66.756	26.225
Gal	14115.6	434	1.116	36.297	14.26
Glc	42964.95	434	1	98.998	38.892
Total	101571.4			254.548	100.00

4. 항-헬리코박터 IgY 대량생산을 위한 조건 확립

가. 재료 및 방법

(1) 산업화를 위한 면역란 대량생산

(가) *H. pylori* 배양 및 항원제조

본 실험에서 항원으로 사용한 균주는 *H. pylori* KCTC 12083(ATCC 43504)을 사용하였고, 고체배양은 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 brucella agar에 계대하여 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48-72시간동안 배양하였으며, 액체배양은 10% FBS가 첨가된 brucella broth에 접종하여 37°C, 10% CO₂, 100 rpm 조건에서 36시간동안 배양하였다. 균의 오염여부는 catalase test 및 urea broth를 이용한 urease test를 실시하여 확인하였다.

(나) *H. pylori* 항원화 및 면역

H. pylori 항원화를 위해 20,000 Hz, amp. 35%, pulse 9.0, 9.0 조건에서 27초 씩 6회 동안 초음파 파쇄하여 항원단백질을 제조하였고, 단백질 정량은 Bradford법을 이용하여 측정하였다. 면역는 항원단백질에 동량의 adjuvant를 1:1의 비율로 혼합하여 100 µg/0.5 ml농도의 1회 주사량을 제조하였다. 접종은 제조액 0.5 ml을 48주령 로만브라운 산란계 200수에 가슴주사하였고 1차 접종 후 2주 간격으로 총 3회 면역을 실시하였다.

(다) 면역란 회수 및 IgY 분리정제

면역란은 1차 접종 후 11일째부터 2회/주마다 회수하여 10주까지 수거하였다. 면역란으로부터 난황항체의 분리는 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가한 후 잘 혼합하고 난황의 지질을 제거하기 위해 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 회수한 후 whatman No.2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 회수하여 냉동 보관하였다.

(라) Specific 난황항체 역가측정

항-헬리코박터 난황항체의 역가측정을 ELISA를 아래 방법을 따라 이용하여 수행하였다.

- ① 0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY를 희석하였다. 또한 항원 *H. pylori*(whole cell)를 희석하였다.
- ② 희석한 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 O/N하였다.
- ③ 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 μ l씩 1회 washing하였다.
- ④ 3% BSA를 well당 150 μ l씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다.
- ⑤ Blocking한 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 μ l씩 5회 washing하였다.
- ⑥ Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다.
- ⑦ Anti-*H. pylori* IgY 검체를 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석하였다.
- ⑧ 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well당 100 μ l씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다.
- ⑨ 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 μ l씩 5회 washing하였다.
- ⑩ Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well당 100 μ l씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다.
- ⑪ 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 μ l씩 5회 washing하였다.
- ⑫ o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well당 100 μ l씩 넣은 후 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다.
- ⑬ 3 N H_2SO_4 를 well당 100 μ l씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다.
- ⑭ 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다.
- ⑮ Purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다.
- ⑯ Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 specific IgY의 함량을 산출하였다.

(2) 항체정제 및 농축 방법 확립

면역란으로부터 난황항체를 고순도로 분리하기 위해 항체를 정제, 농축하고자 하였다. 항체를 정제 및 농축하기 위해 면역란에 λ -carrageenan을 처리하는 방법과 Chicken IgY purification kit, IgY purification affinity column을 이용하여 처리하는 방법을 다음과 같이 수행하였다.

λ -carrageenan은 식품첨가물로서 (주)엠에스씨에서 공급받아 사용하였다. Chicken IgY purification kit는 delipidation reagent와 IgY precipitation reagent를 처리하여 90% 순도의 IgY를 획득할 수 있는 것으로 Pierce사 제품을 사용하였다. IgY purification affinity column은 2-mercaptopyridine을 ligand로 하여 total IgY를 선택적으로 분리할 수 있는 것으로 GE Healthcare사의 HiTrap 제품을 사용하였다.

(가) λ -carrageenan을 이용한 난황항체 정제 및 샘플 전처리

난황의 지질을 제거하여 IgY를 더 많이 획득할 수 있는 방법으로 λ -carrageenan을 아래와 같은 방법으로 처리하였다.

면역란에서 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가하였다. 잘 혼합한 후 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 회수 하였다. 회수 된 상등액을 Whatman No.2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 Whatman No. 5 filter paper로 재여과 하였다. 여과액을 샘플로 사용하며 바로 사용하지 않을 경우 냉동보관하며 사용 직전에 다시 한 번 여과하였다.

(나) Chicken IgY purification kit를 이용한 난황항체 정제 및 농축

Chicken IgY purification kit 사용은 제품설명서에 제시된 방법에 준하여 수행하였으며, 난황 20 g을 처리하여 최종 같은 volume의 정제된 난황항체가 들어있는 PBS buffer를 획득하였다. 정제된 난황항체의 수율 계산은 최종 획득한 IgY 50 μ l를 PBS buffer 950 μ l로 희석하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 제시된 계산식에 대입하여 최종 total IgY의 함량을 구하였다.

(다) IgY purification affinity column을 이용한 난황항체 정제 및 농축

IgY purification affinity column 사용은 제품설명서에 제시된 방법에 준하여 수행하였으며, column에 대한 내용은 Table 2-13에 나타내었다. 난황의 전처리는 λ -carrageenan을 사용하였다. Column의 binding capacity에 따라 난황 1/4에 해당하는 양을 전처리하여 최종 50 ml 정도의 정제된 난황항체가 들어있는 elution buffer를 획득하였다.

Table 2-13. HiTrap IgY Purification HP characteristics

Column dimensions(i.d. × h)	1.6 × 2.5 cm
Column volume	5 ml
Ligand	2-mercaptopyridine
Ligand concentration	3 mg/ml
Binding capacity	100 mg pure IgY per 5 ml column 1/4 egg yolk per 5 ml column
Mean particle size	34 μm
Bead structure	Highly cross-linked spherical agarose
Maximum back pressure	0.3 MPa, 3 bar
Maximum flow rate	20 ml/min
Recommended flow rate	5 ml/min
pH stability	
Long term	3 to 11
Short term	3 to 13
Storage	4-8°C in 20% ethanol

난황항체를 λ-carrageenan, purification kit, purification affinity column 총 3가지 방법에 의하여 정제하였고 total IgY의 함량 측정은 파장 280 nm에서 흡광도를 측정한 후 계산식으로 함량을 구하였으며, 단백질 정량은 Bradford법으로 측정하였다. 또한 위의 3가지 방법으로 각각 정제한 난황항체를 동결건조하여 고형분 함량을 측정하였으며, specific IgY의 함량 측정은 다음과 같이 ELISA를 이용하여 측정하였다.

(라) ELISA를 이용한 함량 측정

● Plate coating

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY 및 항원 *H. pylori*(whole cell)를 희석하였다. 희석한 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well당 100 μl 씩 넣고 4°C에서 O/N 하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 μl 씩 1회 washing하였다. 3% BSA를 well 당 150 μl 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다.

● 정제된 난황항체 함량측정

Coating된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μl 씩 5회 washing한 후 purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다. λ-carrageenan, purification kit, purification affinity column으로 정제한 항 헬리코박터 난황항체를 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석한 후 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well당 100 μl씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank

well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 뒤, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다. 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하여 purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다. Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 각 정제 방법에 따른 항-헬리코박터 난황항체의 함량을 산출하였다.

(3) 분자량 별 농축에 따른 역가 측정

면역란으로부터 고순도와 고역가의 항-헬리코박터 난황항체를 얻기 위해 Ultrafiltration을 이용한 효율적인 농축 방법을 찾고자 하였다. 면역란으로부터 난황을 분리한 후 λ -carrageenan을 처리하여 난황항체를 정제하고 분자량 별로 분획하여 분획별로 단백질 함량과 specific IgY 함량과 고형분 함량을 측정하였다. 각 분획별 샘플의 단백질 정량은 Bradford법으로 측정하였고, 동결건조하여 고형분 함량을 측정하였으며, specific IgY의 함량 측정은 ELISA를 이용하여 측정하였다.

(가) λ -carrageenan을 이용한 난황항체 정제 및 샘플 전처리

난황의 지질을 제거하여 IgY를 더 많이 획득할 수 있는 방법으로 λ -carrageenan을 아래와 같은 방법으로 처리하였다.

면역란에서 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가하였다. 잘 혼합한 후 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 회수 하였다. 회수 된 상등액을 Whatman No.2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 Whatman No. 5 filter paper로 재여과 하였다. 여과액을 샘플로 사용하며 바로 사용하지 않을 경우 냉동보관하며 사용 직전에 다시 한 번 여과하였다.

(나) Ultrafiltration을 이용한 항체 농축

본 연구에 사용한 Ultrafiltration은 Pellicon 2 Mini로 Millipore사로부터 구입하였다. Membrane은 IgY의 분자량을 고려하여 분자량 300 kDa과 50 kDa 두 가지를 이용하였고, 샘플의 점도와 유동성을 고려하여 biomax, V screen type을 사용하였다. 펌프는 분당 4-13 l 정도의 역량을 가지며 대량 생산을 고려하여 이 시스템을 pilot 생산에 그대로 적용할 수 있는 모델을 선정하여 대량 농축 방법을 구축하고자 하였다. 장치는 펌프를 이용하여 연동작용에 의해 샘플이 유입되며 inlet 부분과 retentate 부분에 압력 gauge가 연결되어 있어 유속을 확인할 수 있었으며, 압력은 펌프 회전 속도와 retentate 부분의 valve를 조절하며 사용하였다. 실험의 일관성과 재현성을 유지하고자 TMP(Transmembrane Pressure, 막간차압)는 약 0.6-0.65, ΔP 는 약

0.2-0.25, 유속은 80-100 ml/min(LMH)으로 설정하여 실험하였다. IgY의 분자량이 약 180 kDa임을 감안하여 분자량이 50 kDa인 membrane을 이용하여 저분자물질을 제거하고 분자량이 300 kDa인 membrane을 이용하여 고분자물질을 제거하여 분자량 분획에 의해 농축하고자 하였다. 먼저 전처리한 난황액을 분자량이 300 kDa인 membrane으로 한외여과하여 permeate(drain) 부분을 회수한 후 분자량이 50 kDa인 membrane으로 한외여과하여 retentate 부분을 획득하였다. 획득된 농축액과 각 단계별로 얻어진 시료들의 고형분, 단백질, specific IgY 함량을 측정하여 정제, 농축 정도를 확인하였다.

(다) ELISA를 이용한 함량 측정

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY 및 항원 *H. pylori*(whole cell)를 희석하였다. 희석한 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 µl 씩 넣고 4°C에서 O/N하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 µl 씩 1회 washing하였다. 3% BSA를 well당 150 µl 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다. Coating된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 µl 씩 5회 washing한 후 purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다. Anti-*H. pylori* IgY 검체 및 분자량 별로 농축한 난황항체 샘플을 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석하였다. 정제한 항-헬리코박터 난황항체를 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석한 후 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well 당 100 µl 씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well당 200 µl 씩 5회 washing하였다. Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 µl 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T buffer로 well 당 200 µl 씩 5회 washing하였다. o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 µl 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 µl 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다. 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하여 purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다. Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 각 정제 방법에 따른 항-헬리코박터 난황항체의 함량을 산출하였다.

나. 실험결과

(1) 산업화를 위한 면역란 대량생산

항-헬리코박터 난황항체(specific IgY) 역가는 면역 1.5주 이후부터 면역 후 9주까지 측정하였고 2 회/주 간격으로 측정하였다. 면역란은 약 200 개/일/회의 면역란 중 임의로 30개를 수거하여 제공받았으며, 그 중 20개를 임의로 선택하여 전처리한 후 측정 샘플로 사용하였다. 항-헬리코박터 난황항체 역가는 기존 접종 후 11일째 수거한 면역란의 특이항체 OD값을 1 unit으

로 측정된 것이 아닌 항체량이 정량화된 purified chicken IgY를 standard로 하여 그 함량을 기준으로 특이항체 역가를 측정하였다. 특이항체 측정방법 validation을 통하여 purified chicken IgY 농도별 OD값의 직선성을 나타낸 농도범위를 정한 후 그 농도 범위 내에서 standard curve를 작성하였다. Standard curve는 각 농도별로 8반복하여 평균치로 계산하였고 결정계수가 0.99이상임을 확인하였다. Standard(purified chicken IgY)의 항원인 anti-chicken IgY와 항-헬리코박터 난황항체의 항원인 *H. pylori*(whole cell)를 같은 농도로 같은 plate에 coating하였고 측정하고자하는 항-헬리코박터 난황항체 검체를 standard(purified chicken IgY)와 동일한 조건에서 측정하여 실험 시에 발생할 수 있는 오차를 최대한 줄이고자 하였다. 또한 때 측정 시 blank와 negative control로 면역화하지 않은 조인(주) 일반란을 같이 측정하였고, 실험의 정확성을 확인하기 위해 함량을 알고 있는 reference sample을 같이 측정하였다.

면역 기간 동안의 항체 함량 측정 결과는 Fig. 14와 같다. 면역 후 4주째까지는 특이항체 함량이 상승하다가 그 이후로 약간 감소하는 추세를 보였지만 3차 접종을 수행한 후 다시 상승하는 모습을 보여 전체적으로 6주까지 특이항체 함량이 증가하는 추세를 보였다. 6주 이후에는 특이항체 함량이 감소하는 추세를 보였으며 추가 booster 면역을 하지 않아 그대로 특이항체 함량이 감소됨을 확인할 수 있었다. 1차년도에 30수 분량으로 항-헬리코박터 난황항체 역가 측정 결과와 비교해보면 1차 접종 후 7주째까지 항체 역가가 상승하다가 그 이후로 감소하는 추세를 보였고 10주째 booster 면역을 한 결과 10주 이후부터는 다시 상승하는 모습을 보였으며 5-7주째에 항체 역가가 가장 높게 나타났고 10주째에 가장 낮은 역가를 보여 비슷한 패턴을 확인할 수 있었다. 그러나 면역담의 종류, 연령, 면역주사량, 주사부위, 양계장환경 등의 조건에 따른 오차 또한 확인 할 수 있었다.

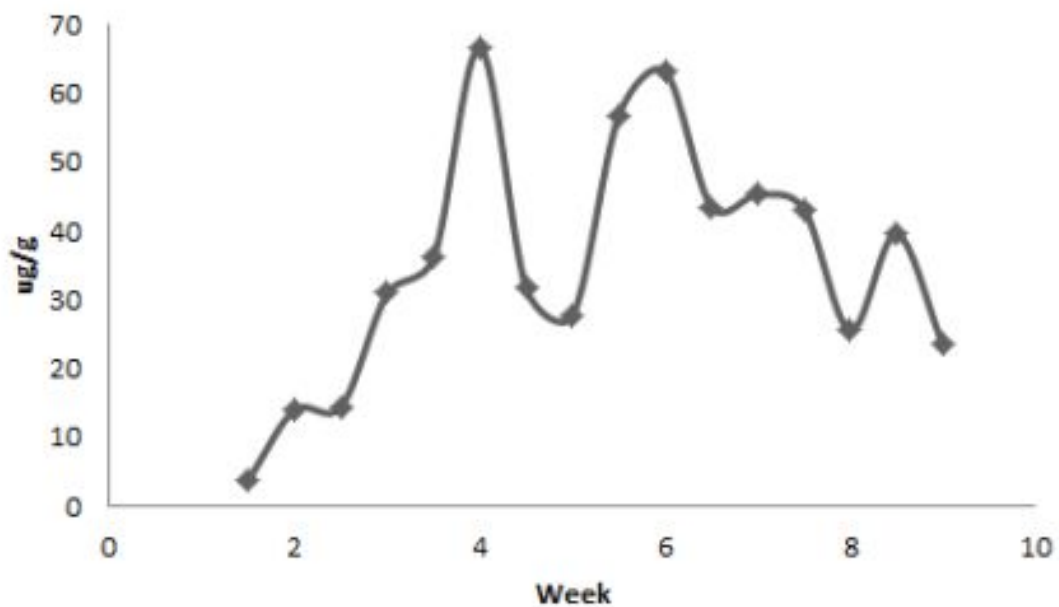


Fig. 2-14. 면역기간 동안의 항헬리코박터 난황항체 함량 변화

Table 2-14. 부형제 첨가 후 냉장/냉동을 반복한 후 변화 관찰

		1회	2회	3회	4회
무첨가군	IgY 함량	50	32	20 >	20 >
	정상	5*	2	1	1
가염 5%	IgY 함량	50	52	48	45
	정상	5	4	3	3
10% Dextrin DE 12-18	IgY 함량	50	46	30 >	30 >
	정상	5	3	2	2
10% FOS	IgY 함량	50	47	49	42
	정상	5	4	3	3
10% Dextrin syrup DE 28~	IgY 함량	50	48	46	45
	정상	5	4	3	3
10% HFCS	IgY 함량	50	48	42	41
	정상	5	4	2	2

* 5점 척도로 정상일 경우 5, 불량일 경우 1

(2) 항체정제 및 농축 방법 확립

면역란으로부터 난황항체를 고순도, 고역가로 분리하기 위해 항체를 정제, 농축하는 방안을 마련하고자 하였다. 난황항체를 고순도, 고역가로 분리하기 위한 방법으로 λ -carrageenan, Chicken IgY purification kit, IgY purification affinity column을 이용하여 난황항체를 분리, 정제하였다. 난황으로부터의 항체 정제란 water soluble protein으로부터 lipoprotein을 분리하는 것으로, 계란 난황 성분의 34%가 지질로 구성되어있기 때문에 지질을 제거하기 위한 방법으로 다음과 같은 방법들이 있다.

Separation Method Lipoprotein coagulating agent	Ultracentrifugation
	Organic solvent delipidation
	Ethylene glycol
	Dextran sulfate sodium
	Polyacrylic resin
	Alginate sodium
	λ -carrageenan

Lipoprotein coagulating agent로 λ -carrageenan을 처리하였으며, 유사한 원리인 delipidation reagent와 IgY precipitation reagent를 사용하여 진행하는 IgY purification kit와 비교 분석하였다. 그리고 추후 난황항체 대량생산을 감안하여 scale up으로 resin 제작이 가능한 affinity column을 이용하여 난황항체 정제도를 측정하였다.

각 처리 방법 별 난황항체 정제 결과를 Table 2-15에 나타내었다. 결과는 고형분 함량과 수율, 단백질 함량과 total IgY 함량, specific IgY 함량으로 각각 나누어 정리하였다. 시료로 사용한 난황 20 g을 기준으로 난황의 고형분 함량은 10.5 g으로 수율 52.5%를 보였다. 난황 20 g으로부터 얻은 난황 단백질 g함량은 3.4 g으로 고형분 함량의 32.4%에 해당하였고, total IgY 함량은 152.2 mg으로 고형분 함량의 1.5%에 해당하였으며 단백질 함량의 4.8%에 해당하였다. 난황 20 g으로부터 얻은 specific IgY의 함량은 959.4 µg으로 고형분 함량의 0.01%에 해당하였고, 단백질 함량의 0.03%에 해당하였다.

IgY purification kit를 이용하여 난황항체를 정제한 결과 kit로 정제한 난황항체의 고형분 함량은 난황 20 g을 기준으로 806 mg, 4.03%의 수율을 보였고, 단백질 함량은 106 mg으로 고형분 함량의 13.2%에 해당하였다. 난황 20 g으로부터 얻은 total IgY 함량은 152.2 mg으로 고형분 함량의 18.9%에 해당하였고, specific IgY의 함량은 305.4 µg으로 고형분 함량의 0.04%에 해당하였다.

λ-carrageenan 처리로 정제한 난황항체의 고형분 함량은 난황 20 g을 기준으로 624 mg, 3.12%의 수율을 보였고, 단백질 함량은 313.3 mg으로 고형분 함량의 50.2%에 해당하였다. 난황 20 g으로부터 얻은 specific IgY의 함량은 159.9 µg으로 고형분 함량의 0.03%에 해당하였으며, total IgY 함량은 측정하지 않았다.

IgY affinity column을 이용하여 난황항체를 정제한 결과 고형분 함량은 난황 20 g을 기준으로 85.4 mg, 0.43%의 수율을 보였고, 단백질 함량은 77.5 mg으로 고형분 함량의 90.7%에 해당하였다. 난황 20 g으로부터 얻은 specific IgY의 함량은 122.5 µg으로 고형분 함량의 0.14%에 해당하였으며, total IgY 함량은 측정하지 않았다.

각 처리 방법에 따라 비교해보면 column의 경우 가장 수율이 낮으나 단백질 함량이 90.7%로 가장 높은 순도를 보였고 specific IgY도 0.14%로 가장 높은 회수율을 보였다. λ-carrageenan 처리의 경우 난황 항체만을 획득하는 kit와 column과 달리 lipoprotein만을 제거하는 목적이기 때문에 지질 제거에 따라 상대적으로 단백질 함량이 50.2%로 높게 획득되었지만 specific IgY는 다른 처리 방법에 비해 가장 낮은 0.03%의 회수율을 보였다. Kit의 경우 처리 방법 중에서 가장 높은 수율을 보였지만 단백질과 specific IgY의 수율이 낮았고, 또 난황항체를 대량으로 생산 시 한계가 있기 때문에 적합한 방법은 아니라고 사료되었다. 난황항체를 대량으로 분리, 정제해야 할 경우 specific IgY의 함량뿐만 아니라 수율 또한 중요하게 고려해야 할 사항이기 때문에 column으로 대량생산을 할 경우 ligand 선택이나 샘플 전처리법 등의 과정에서 수율을 높일 수 있는 방안을 검토해야 할 것으로 사료되었다.

따라서 면역란으로부터 고순도, 고수율의 난황항체를 대량으로 획득하기 위해서 항체에 영향을 주지 않는 최소한의 공정으로 각 단계별로 효율성을 극대화해야 할 것이다. 본 연구에서 항-헬리코박터 난황항체의 분리, 정제, 농축 실험에 대한 대략적인 모식도는 Fig. 2-15와 같다. Affinity column 처리 후 Ultrafiltration으로 시료를 농축하여 고순도 난황항체를 얻기 위한 실험이 아직 진행 중에 있지만 이번 실험 결과로 미루어 볼 때에 column과 Ultrafiltration을 병

행으로 처리하여 정제, 농축 효율을 높이는 방법도 효과적이라 사료된다. 고순도, 고수율의 난황항체를 대량으로 생산하기 위한 항체 정제방법은 본 연구에서 수행한 방법 외에도 다양한 방법이 있기 때문에 좀 더 추가 실험을 통해 가능성을 검토해야 할 것으로 사료된다.

Table 2-15. 처리 방법 별 난황항체 정제도 비교

난황 20 g 기준	고형분	수율	단백질 함량	Total IgY	Specific IgY
난황	10.5 g	52.50%	3.4 g(32.4%)	152.2 mg(1.5%)	959.4 µg(0.01%)
Kit	806.0 mg	4.03%	106.0 mg(13.2%)	152.2 mg(18.9%)	305.4 µg(0.04%)
λ-carrageenan	624.0 mg	3.12%	313.3 mg(50.2%)	-	159.9 µg(0.03%)
Column	85.4 mg	0.43%	77.5 mg(90.7%)	-	122.5 µg(0.14%)

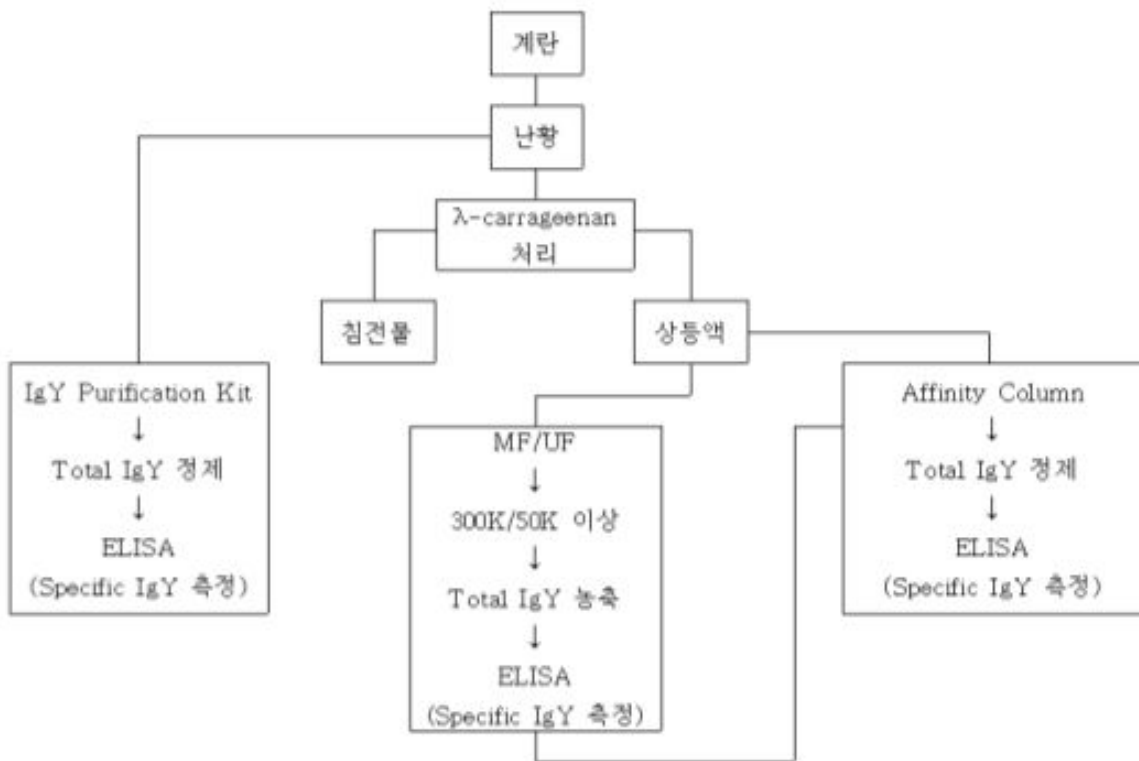


Fig. 2-15. 항헬리코박터 난황항체의 분리 정제, 농축을 위한 실험 모식도

(3) 분자량 별 농축에 따른 역가 측정

면역란으로부터 난황항체를 고순도, 고역가로 분리하기 위한 방안으로 Ultrafiltration을 수행하여 항체를 정제, 농축하는 방안을 마련하고자 하였다. 면역란으로부터 Ultrafiltration을 수행하여 농축된 난황항체를 획득하기까지 각 단계별로 시료를 취하여 농축 정도, 회수율, 손실율 등

을 확인하였다. Ultrafiltration을 하기위한 전처리 단계부터 농축하기까지의 각 단계를 step별로 나눠 Table 2-16과 같이 구분하였다. 보다 효율적인 농축 실험 진행을 위해 2단계로 나누어 전처리하였다. 먼저 난황의 지질 성분을 제거하기 위해 λ -carrageenan을 처리(Step 1)한 후 size가 1 μ m인 filter paper를 이용하여 여과(Step 2)하였다. 분자량이 300 kDa인 membrane으로 한외여과하여 permeate부분과 retentate부분을 Step 3과 3-1로 나누어 구분하였고 Step 3부분을 다시 분자량이 50 kDa인 membrane으로 한외여과하여 retentate부분과 permeate부분을 Step 4와 4-1로 구분하였다.

각 Step별로 단백질 함량과 specific IgY 함량을 측정된 결과를 Table 2-17에 나타내었다. 각 Step별로 단백질 함량을 비교하면 난황으로부터 λ -carrageenan을 처리하여 분리한 난황항체 수용액의 단백질 함량이 4.74 mg/ml로 측정되었고, 수용액을 1 μ m filter로 전처리한 후 샘플의 단백질 함량이 3.96 mg/ml로 측정되어 고분자의 단백질이 약간 제거되었음을 알 수 있었다. 분리하고자 하는 난황항체가 Step 3에 존재할 것이라는 예상과 달리 분자량 300 kDa membrane을 통과한 분획에서 단백질 함량이 적어 정확한 함량을 측정할 수가 없었다. 분자량 300 kDa 이상의 물질들이 존재하는 Step 3-1 부분에서 단백질 함량이 13.16 mg/ml로 측정되어 난황항체를 포함한 단백질들이 Step 3-1에 존재함을 알 수 있었다. 단백질이 거의 존재하지 않는 Step 3의 샘플을 가지고 Step 4, 4-1을 구분하였기 때문에 마찬가지로 단백질 함량을 구할 수가 없었다.

Table 2-16. Step별 난황항체 분리 단계에 따른 시료 처리 상태(Design 1)

Step 1	λ -carrageenan 처리
Step 2	1 μ m filter로 전처리
Step 3	300 K membrane으로 UF, Permeate(Drain)
Step 3-1	300 K membrane으로 UF, Retentate
Step 4	Step 3을 50 K membrane으로 UF, Retentate
Step 4-1	Step 3을 50 K membrane으로 UF, Permeate(Drain)

Table 2-17. 난황항체 분리 단계 별 단백질, specific IgY 함량(Design 1)

	단백질 함량	Specific IgY 함량
Step 1	4.74 mg/ml	43.57 μ g/ml
Step 2	3.96 mg/ml	34.43 μ g/ml
Step 3	-	-
Step 3-1	13.16 mg/ml	-
Step 4	-	2.74 μ g/ml
Step 4-1	-	-

각 Step별로 specific IgY 함량을 비교하면 난황으로부터 λ -carrageenan을 처리하여 분리한 난황항체 수용액의 specific IgY 함량이 43.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었고, 수용액을 1 μm filter로 전처리한 후 샘플의 specific IgY 함량이 34.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되어 filtering에 의해 단백질뿐만 아니라 난황항체도 일정량 손실되었음을 알 수 있었다. Step 3 이후부터는 실험의 판단 착오로 예상했던 분획에서 원하는 물질이 검출되지 않아 데이터를 얻지 못하였으며 결과 분석도 무의미한 것으로 사료되었다.

따라서 이번 실험 결과를 통해 난황항체가 분자량이 300 kDa인 membrane에서 대부분 통과하지 못함을 알 수 있었으며, 300 kDa membrane으로 난황항체보다 고분자의 물질을 제거하고 50 kDa membrane으로 난황항체보다 저분자의 물질을 제거하여 50 kDa과 300 kDa 사이의 물질만을 획득하려 했던 것을 50 kDa 또는 300 kDa 이하의 물질을 제거하여 난황항체를 농축하는 것으로 재실험을 수행하였다. Ultrafiltration의 유속과 실험의 효율성을 고려하여 두 분자량의 membrane 중 분자량이 300 kDa인 membrane으로 재측정하였다.

재실험에 진행된 각 단계를 Step별로 Table 2-18과 같이 구분하였고, 각 Step별로 단백질 함량과 specific IgY 함량을 측정한 결과를 Table 2-19에 나타내었다. 각 Step별로 단백질 함량을 비교하면 난황으로부터 λ -carrageenan을 처리 후 원심분리 전 상태인 Step 1의 단백질 함량이 고품분 1 g으로부터 126.12 mg, 원심분리 후 상태인 Step 2의 단백질 함량이 584.44 mg 만큼 획득되었다. Size 5 μm 인 filter로 여과한 시료인 Step 3의 단백질 함량이 고품분 1 g 기준으로 492.39 mg, size 1 μm 인 filter로 여과한 Step 4의 단백질 함량이 571.43 mg으로 측정되었다. 분자량이 300 kDa인 membrane을 통과하지 못한 retentate 부분인 Step 5의 단백질 함량이 고품분 1 g 기준으로 784.84 mg 측정되었으며, 300 kDa membrane을 통과한 Step 6에서는 단백질이 함량이 너무 적어 결과를 얻지 못하였다.

각 Step별로 specific IgY 함량을 비교하면 난황으로부터 λ -carrageenan을 처리 후 원심분리 전 상태인 Step 1의 specific IgY 고품분 1 g으로부터 64.59 μg , 원심분리 후 상태인 Step 2의 specific IgY의 함량이 526.67 μg 만큼 획득되었다. Size 5 μm 인 filter로 여과한 시료인 Step 3의 specific IgY의 함량이 고품분 1 g 기준으로 514.13 μg , size 1 μm 인 filter로 여과한 Step 4의 specific IgY 함량이 421.87 μg 으로 측정되었다. 분자량이 300 kDa인 membrane을 통과하지 못한 retentate 부분인 Step 5의 specific IgY 함량이 고품분 1 g 기준으로 575.20 mg 측정되었으며, 300 kDa membrane을 통과한 Step 6에서는 specific Ig Y의 함량이 24.32 μg 로 측정되었다.

Table 2-18. Step별 난황항체 분리 단계에 따른 시료 처리 상태(Design 2)

Step 1	λ -carrageenan 처리, 원심분리 전
Step 2	λ -carrageenan 처리, 원심분리 후
Step 3	5 μ m filter로 전처리
Step 4	1 μ m filter로 전처리
Step 5	300 K membrane으로 UF, Retentate
Step 6	300 K membrane으로 UF, Permeate(Drain)

결과를 살펴보면 지질을 제거하기 전인 Step 1의 수율은 높지만 단백질과 specific IgY의 함량이 상대적으로 매우 낮았고 지질을 제거하고 난황항체를 포함한 수용성 물질인 Step 2는 수율은 3.42%로 낮지만 고형분 중 단백질과 specific IgY의 함량이 각각 58.4%와 0.0053%로 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 5 μ m의 filter로 전처리한 Step 3의 경우 전 단계에 비해 단백질 함량이 크게 감소하여 고분자의 단백질이 filter를 통해 제거된 반면 specific IgY 함량은 크게 차이가 없어 불필요한 물질들이 제거되어 정제되었음을 알 수 있었다. 1 μ m의 filter로 전처리한 Step 4의 경우 전 단계에 비해 단백질 함량이 다시 증가한 반면 specific IgY 함량은 크게 감소해 filter 전처리에 의한 난황항체의 손실이 일정량 발생하였음을 알 수 있었다. 분자량 300 kDa 이상의 물질들이 존재하는 Step 5은 1.58%로 적은 수율을 보였지만 고형분 1 g에 단백질 구성이 78.5%였고 specific IgY 함량도 크게 올라감을 알 수 있었다. 분자량 300 kDa 미만의 물질인 Step 6은 Step 5와 수율은 비슷하였지만 그 중 단백질은 거의 없었고 specific IgY는 소량 존재함을 알 수 있었다.

따라서 Ultrafiltration을 이용하여 난황항체를 정제, 농축을 할 경우 난황항체의 분자량뿐만 아니라 난황에 들어있어서 제거해야할 난황항체 외의 물질의 분자량도 고려하여 membrane을 선택해야할 것으로 사료된다. 또한 획득하고자하는 물질의 손실율과 여과의 흐름성도 membrane 선택 시 같이 고려해야한다.

Table 2-19. 난황항체 분리 단계 별 단백질, specific IgY 함량(Design 2)

고형분 1g 기준	수율	단백질 함량	Specific IgY 함량
Step 1	51.00%	126.12 mg(12.6%)	64.59 ug(0.006%)
Step 2	3.42%	584.44 mg(58.4%)	526.67 ug(0.053%)
Step 3	3.50%	492.39 mg(49.2%)	514.13 ug(0.051%)
Step 4	3.46%	571.43 mg(57.1%)	421.98 ug(0.042%)
Step 5	1.85%	784.84 mg(78.5%)	575.20 ug(0.058%)
Step 6	1.48%	-	24.32 ug(0.002%)

5. 국내외 제품 역가 비교

가. 재료 및 방법

본 연구를 통해 생산한 항-헬리코박터 난황항체를 해외 항-헬리코박터 난황항체 제품의 역가와 비교하여 제품가능성, 기술경쟁력 등을 평가하고자 하였다. 해외 항-헬리코박터 난황항체 제품은 일본의 협력업체인 G사에서 항원이 코팅된 플레이트와 함께 제공받았다. 항원의 종류에 따라 항원이 코팅된 플레이트의 내용이 달라지므로 타 난황항체 제품을 분석할 때 플레이트를 제공받아야하는 어려움이 있어 여러 제품을 같이 비교할 수 없었다. 일본 G사의 항-헬리코박터 난황항체는 *H. pylori* urease를 항원으로 하여 생성된 monoclonal 난황항체로서 항체역가가 자사규격인 1 unit 이상이라고 규격화된 제품이다.

과제 개발용 난황항체는 이번 2차 년도에 대량생산으로 얻은 면역란부터 분리한 것으로 1차 접종 후 3주 후에 수거한 면역란을 사용하였다. 과제 개발용 난황항체와 일본 제품인 난황항체는 동일한 방법으로 전처리하고 같은 standard와 조건에서 실험하였으며 아래와 같은 방법으로 ELISA를 이용하여 측정하였다.

(1) 면역란으로부터 난황항체 분리

면역란으로부터 난황항체의 분리는 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가한 후 잘 혼합하고 난황의 지질을 제거하기 위해 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 회수한 후 Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 회수하고 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

(2) Specific 난황항체 역가측정

일본 난황항체 제품 분석에 사용할 plate는 제공을 받아 아래와 같은 방법으로 ELISA를 수행하였다.

Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다. 연구 개발용 및 일본 제품용 Anti-*H. pylori* IgY 검체를 적정 농도가 되도록 순차적으로 희석하였다. 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well 당 100 μ l씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. Anti-chicken IgY Peroxidase를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다. 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하

였다. Purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다. Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 연구 개발용 및 일본 제품용 specific 난황항체의 함량을 산출하였다.

나. 실험결과

본 연구를 통해 생산한 항-헬리코박터 난황항체와 일본 항 헬리코박터 난황항체 제품의 함량을 비교분석하였다. 함량 측정은 4반복으로 측정하였고 분석한 과제 개발용 난황항체와 일본 제품용 난황항체의 특이항체 함량을 Table 2-20에 제시하였다.

과제 개발용 특이적 난황항체는 난황액 1 g을 기준으로 평균 35.75 µg, 0.004%를 포함하고 있었으며, 일본 제품용 특이적 난황항체는 난황액 1 g을 기준으로 평균 1.39 mg/g, 0.140%를 포함하고 있었다. 일본 제품용 특이적 난황항체는 과제 개발용 특이적 난황항체에 비해 약 40배의 높은 함량을 갖고 있었다. 큰 함량 차이를 보인 원인으로 항원의 종류, 산란계의 연령, 면역주기 및 면역 횟수, 그리고 난황 가공 기술 등에 의한 것으로 사료된다. 비록 고면역화 되지 않은 면역란의 난황으로 측정하였지만 현재 제품으로 납품되고 있는 난황액과 비교하였을 때 매우 낮은 함량을 보여 향후 항원 제조에서부터 면역란 생산에 이르는 각 과정에서 함량을 높일 수 있는 방안을 검토하고, 또 난황항체 정제 및 농축을 통해 함량을 향상시킬 수 있는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

Table 2-20. 과제 개발용 및 일본 제품용 specific IgY 함량 비교

반복수	Specific IgY 함량	
	과제 개발용 난황항체 (Anti- <i>H. pylori</i> IgY)	일본 제품용 난황항체 (Anti- <i>H. pylori</i> Urease IgY)
1	36.68 µg/g	1.48 mg/g
2	33.88 µg/g	1.37 mg/g
3	37.31 µg/g	1.33 mg/g
4	35.14 µg/g	1.37 mg/g
평균	35.75 µg/g	1.39 mg/g

6. 항-헬리코박터 난황항체 함량 정량분석

가. 재료 및 방법

항-헬리코박터 난황항체 함량의 정량분석을 위해 항체량이 정량화된 purified chicken IgY를 구입하여 standard로 사용하였다. 제품의 농도는 10 mg/ml로 D.W 1 ml로 환원시킨 후 냉동보관하여 사용하였다. 난황항체 함량 정량분석은 측정방법 validation을 통해 분석법의 정확성과

객관성을 확인하였으며, 특이항체 함량 정량분석을 ELISA를 이용하여 아래와 같은 방법을 따라 수행하였다.

● Plate 준비

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY와 항원 *H. pylori*(whole cell)를 희석하여 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 μ l 씩 넣고 4°C에서 O/N하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 1회 washing하였다. 3% BSA를 well 당 150 μ l 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking한 후 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다.

● Standard 준비

Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석한다.

● Sample 준비

면역란에서 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가하여 잘 혼합한 후 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 회수하여 Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 샘플로 사용하였다. 샘플을 PBS-T buffer로 적정 농도까지 순차적으로 희석하였다.

● 시험방법

Plate 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing한 뒤 Anti-chicken IgY peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하고 o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다. 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다. Purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다. Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 specific IgY의 함량을 산출하였다.

나. 실험결과

항-헬리코박터 난황항체(specific IgY) 함량 정량분석은 purified chicken IgY 농도별 OD값의 직선성을 나타낸 농도범위를 정한 후 그 농도 범위 내에서 standard curve를 작성하였다. Standard curve는 각 농도별로 8반복하여 평균치로 계산하였고 결정계수가 0.99이상임을 확인

하였다. Standard(purified chicken IgY)의 항원인 anti-chicken IgY와 항-헬리코박터 난황항체의 항원인 *H. pylori*(whole cell)를 같은 농도로 같은 플레이트에 coating하였고 측정하고자 하는 항-헬리코박터 난황항체 검체를 standard(purified chicken IgY)와 동일한 조건에서 측정하여 실험 시에 발생할 수 있는 오차를 최대한 줄이고자 하였다. 또한 매 측정 시 blank와 negative control로 면역화하지 않은 조인(주) 일반란을 같이 측정하였고, 실험의 정확성을 확인하기 위해 함량을 알고 있는 reference sample을 같이 측정하였다.

면역 기간 동안의 항체 함량 측정 결과는 Table 2-21과 같다. Anti-*H. pylori* IgY는 난황 1 g 안에 함유된 특이항체의 함량으로 나타내었으며, 면역 후 처음 수거한 면역란의 특이항체 함량인 3.92 µg/g 이후로 점차 증가하다 4주에서 66.66 µg/g으로 최고치를 나타내었다. 이 후로 특이항체 함량이 감소하다 3차 면역 이후에 다시 63.29 µg/g까지 증가하였으나 추가 booster 면역이 없어 계속 함량이 점차 감소하였고 맨 마지막 측정치인 9주째에 23.59 µg/g의 함량을 나타내었다. 면역화하지 않은 조인(주) 일반란의 특이항체는 2 µg/g 이하의 함량을 보였다.

1차년도에 항-헬리코박터 난황항체 역가 측정 시 기준으로 삼았던 1 unit과 2차년도 생산한 면역란 중 1 unit에 해당하는 11/15일자 면역란의 난황항체를 비교하고자 특이항체 함량을 정량 분석 한 결과 1차년도 1 unit의 특이항체는 난황 기준 4.16 µg/g, 2차년도 1 unit의 특이항체는 난황 기준 3.92 µg/g의 함량을 나타내 비슷한 수치를 보였다. 따라서 항체의 함량을 나타낼 수 있는 정량 분석법이 unit으로 역가 수치를 나타내는 역가 측정법과 유사한 결과를 보였고, 또 역가 측정법 보다 정확성과 객관성이 우수하기 때문에 특이항체 분석에 표준법으로 사용가능할 것이라 사료된다.

Table 2-21. 면역 기간 동안 항체 함량 측정

Date	Week	Anti- <i>H. pylori</i> IgY ($\mu\text{g/g}$)	Note
11/15	1.5	3.92	
11/18	2.0	14.05	2nd immunization
11/22	2.5	14.47	
11/25	3.0	31.04	
11/29	3.5	36.19	
12/02	4.0	66.66	3rd immunization
12/06	4.5	31.65	
12/09	5.0	27.67	
12/13	5.5	56.83	
12/16	6.0	63.29	
12/20	6.5	43.57	
12/23	7.0	45.34	
12/27	7.5	43.22	
12/30	8.0	25.59	
01/03	8.5	39.56	
01/06	9.0	23.59	

7. 제품제형에 따른 항 헬리코박터 난황항체 함량분석

가. 재료 및 방법

제품의 제형이 첨가된 항-헬리코박터 난황항체의 함량에 영향을 주는지 확인하고자 난황항체가 첨가된 우유, yogurt, 트로키, soft candy, tablet을 아래와 같은 방법으로 ELISA를 이용하여 함량을 측정하였다.

● 플레이트 준비

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY와 항원 *H.pylori*(whole cell)를 희석한 후 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 μl 씩 넣고 4°C에서 O/N하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μl 씩 1회 washing한 뒤 3% BSA를 well 당 150 μl 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다. Blocking한 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μl 씩 5회 washing하였다.

● Standard 준비

Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다.

● Sample 준비

면역란으로부터 난황향체의 분리는 난황을 난백으로부터 분리한 후 난황의 질량과 동량의 D.W를 첨가한 후 잘 혼합하고 난황 질량 4배의 0.1% λ -carrageenan을 첨가하여 30분간 실온에 정치하였다. 5000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 회수한 후 Whatman No.2 filter paper를 이용하여 여과한 후 여과액을 전처리 샘플로 사용하였다. 난황향체가 함유된 트로키, soft candy, tablet은 각 1 g씩 PBS-T buffer 9 ml에 희석하여 37°C에서 1시간 진탕한 후 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻고 추가로 10,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 샘플로 사용하였다. 난황향체가 함유된 우유, 요거트는 각 1 ml 씩 PBS-T buffer 9 ml에 희석하여 강하게 vortexing한 후 샘플로 사용하였다.

● 시험방법

플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액과 각 샘플을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing한 뒤 Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing한 뒤 o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다. 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다. Purified chicken IgY 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 ng/ml 농도의 OD값으로부터 직선상의 검량선을 작성하였다. Sample의 각 희석액의 OD값으로부터 standard 검량선을 이용하여 specific IgY의 함량을 산출하였다.

나. 실험결과

우유, yogurt, 트로키, soft candy, tablet의 제형별 특성이 난황향체에 영향을 주는지 알아보기 위해 각 제형별로 항-헬리코박터 난황향체를 첨가하여 특이항체 함량을 측정된 결과 Table 23과 같다. 각 제품에 첨가한 난황향체를 대조군으로 같이 측정하여 함량을 비교하였다. 대조군의 특이항체 함량이 2.47 ug/mL인 것에 비해, 우유는 2.10 ug/mL, yogurt는 1.63 ug/mL, 트로키는 3.22 ug/mL, soft candy는 2.00 ug/mL, 그리고 tablet은 2.66 ug/mL을 나타내었다. 이 중 yogurt의 특이항체 함량이 1.63 ug/mL로 함량이 가장 낮게 검출되었고 대조군과 비교하였을 때 66%로 매우 낮은 검출량을 보였다. 우유와 soft candy는 각각 85%와 81%로 약간의 감소 경향을 보였고, 트로키와 tablet은 각각 130%와 108%로 대조군보다 더 높게 나와 약간의 실험 오차를 보였으나 첨가된 난황향체 함량을 저해하지는 않았다.

실험 오차는 난황항체 검출을 위한 전처리의 차이에 의한 것으로 보이며, 전처리 방법에 의해 약간의 함량 변화가 확인되었지만 난황항체의 함량 변화에 제품 제형별 첨가된 성분이 더 큰 영향을 주는 것으로 사료되었다. 각 제품 제형별 구성 성분은 Table 2-22에 나타내었으며 제조 비밀 유지를 위해 첨가량은 표시하지 않았다. Yogurt에서 가장 낮은 함량을 보인 이유는 유기산 첨가와 유산균 발효에 의한 낮은 pH의 영향이라 사료되며 그 외 제형에서도 첨가 성분에 따라 첨가된 난황항체의 함량 변화에 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 제품의 용해성과 굳기 정도와 난황항체 함량 측정을 위한 전처리 시 항체 회수율과 함량 측정 시 inhibitor로 작용할 수 있는 성분 등에 의해서도 난황항체 함량 측정에 영향을 줄 수 있다고 사료되었다. 따라서 항체가 첨가된 제품 제조 시 구성 성분을 고려해야 하며, 추후 난황항체가 첨가된 건강기능식품의 항체 함량 분석을 위한 전처리, 분석 방법에도 이와 같은 사항을 고려해야 할 것으로 사료된다.

Table 2-22. 제품 제형별 항-헬리코박터 난황항체 함량 비교

	Specific IgY 함량
Control	2.47 µg/ml
우유	2.10 µg/ml(85%)
Yogurt	1.63 µg/ml(66%)
트로키	3.22 µg/ml(130%)
Soft candy	2.00 µg/ml(81%)
Tablet	2.66 µg/ml(108%)

Table 2-23. 제품 제형별 구성 성분

	Ingredients
우유	원유
Yogurt	이소말토올리고당, 결정과당, 뉴트리오스, 펙틴, 향료, 복합유산균, 유당분해효소 등
트로키	말티톨, 이소말토올리고당, 자일리톨, 결정셀룰로오스, 스테아린산칼륨, 향료 등
Soft candy	팔라티노스, 말토오스, 자일리톨, 결정셀룰로오스,
Tablet	스테아린산칼륨, 향료 등

8. 헬리코박터 난황항체 validation을 통한 유효함량 설정 및 안정화 확인

가. 재료 및 방법

항헬리코박터 난황항체 정량방법에 대하여 정량방법의 정당성을 입증하고자 아래와 같은 방법에 따라 농도범위 설정시험, 직선성 확인시험 그리고 정량한계 및 정밀성 확인시험을 수행하였다.

(1) 농도범위 설정시험

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY를 희석하고 희석한 anti-chicken IgY를 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 4°C에서 O/N하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 1회 washing하였다. 3% BSA를 well 당 150 μ l 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking한 후 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. Purified chicken IgY를 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 및 0.781 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석한 뒤 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였으며 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다. 각 농도의 purified chicken IgY의 OD값의 평균을 구하여 검량선을 작성하였다. 이 그래프를 기준으로 한 로그함수를 구하여 결정계수가 0.99 이상인 최소농도와 최고농도의 범위를 구하였다.

(2) 직선성 확인시험

직선성 확인에 관한 시험은 아래와 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

- ① 0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY를 희석하였다.
- ② 희석한 anti-chicken Ig Y를 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 μ l 씩 넣고 4°C에서 O/N하였다.
- ③ 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 1회 washing하였다.
- ④ 3% BSA를 well 당 150 μ l 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다.
- ⑤ Blocking한 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다.
- ⑥ Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석하였다.
- ⑦ Plate 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 3

7°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다.

- ⑧ 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다.
- ⑨ Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다.
- ⑩ 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다.
- ⑪ o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다.
- ⑫ 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하였다.
- ⑬ 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다.
- ⑭ 각 농도의 purified chicken IgY의 OD값의 평균을 구하여 검량선을 작성하였다.
- ⑮ 위에서 작성한 검량선으로부터 각 농도의 purified chicken IgY의 OD값 평균치로부터 각 농도액의 purified chicken IgY 농도를 산출하였다.
- ⑯ 각 농도액의 실측치 농도와 이론상 농도에 대한 상대오차를 구하였다.

(3) 정량한계 및 정밀성 검증시험

위의 방법대로 작성한 검량선에서 최저 농도(1.563 ng/ml)를 포함한 3가지 농도(1.563, 3.125, 6.25 ng/ml)의 역가를 5회 분석하고, 2일간 3회씩 추가 분석하여 정량한계치에서의 정확성 및 정밀성을 확인하였다.

0.05 M coating buffer(pH 9.6)로 anti-chicken IgY를 희석한 후 ELISA용 96 well plate에 well 당 100 μ l 씩 넣고 4°C에서 O/N하였다. 코팅된 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 1회 washing한 후 3% BSA를 well 당 150 μ l 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 blocking하였다. Blocking한 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다.

Purified chicken IgY를 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.563 ng/ml가 되도록 PBS-T buffer로 희석한 뒤 플레이트 배열, 희석배수에 따라 purified chicken IgY 희석액을 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Blank well에는 PBS-T buffer를 넣었다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. Anti-chicken IgY Peroxidase conjugate를 PBS-T buffer에 희석하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 PBS-T buffer로 well 당 200 μ l 씩 5회 washing하였다. o-Phenylenediamine을 발색기질액으로 사용하여 well 당 100 μ l 씩 넣은 후 알루미늄 호일로 차광하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 3 N H₂SO₄를 well 당 100 μ l 씩 넣고 발색을 정지시킨 후 492 nm, 620 nm에서 OD값을 측정하고 각 well의 OD값에 Blank well의 OD값을 차감하였다. 각 농도의 purified chicken IgY의 OD값의 평균을 구하여 검량선을 작성하였다.

위에서 작성한 검량선으로부터 각 농도의 purified chicken IgY 희석액의 OD값 평균치로부터 각 농도의 purified chicken IgY 희석액 농도를 산출하여 각 농도액의 실측치 농도와 이론상 농도에 대한 상대오차를 구한다.

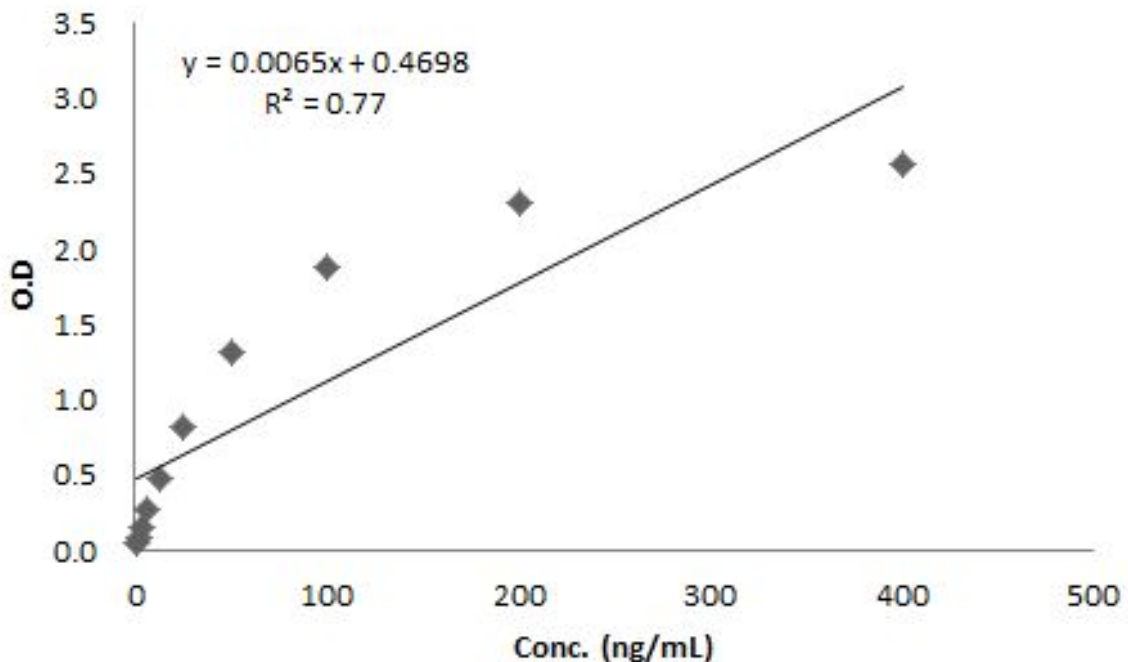
나. 실험결과

(1) 농도범위 설정시험

정량농도범위 설정을 위해 purified chicken IgY를 400 ng/ml에서부터 0.781까지 10단계의 농도로 희석하고 각각의 OD값을 측정하여 검량선을 작성하였다. 검량선을 구한 후 결정계수가 0.99 이상인 최소농도와 최고농도의 범위를 구하였다. Purified chicken IgY를 각 농도별로 ELISA를 이용하여 OD값을 측정한 결과 Fig. 2-16과 같았다. 0.781-400 ng/ml 범위의 결정계수는 0.77(Fig. 16, A), 0.781-200 ng/ml 범위의 결정계수는 0.88(Fig. 16, B), 0.781-100 ng/ml 범위의 결정계수는 0.95(Fig. 16, C), 0.781-50 ng/ml 범위의 결정계수는 0.98(Fig. 16, D), 0.781-25 ng/ml 범위의 결정계수는 0.99(Fig. 16, E)이었다. 0.781-25 ng/ml 범위에서 결정계수가 0.99이지만 정밀도를 높이기 위해 1.563-25 ng/ml 범위가 최적이라 판단되어 농도범위를 1.563-25 ng/ml로 결정하였다.

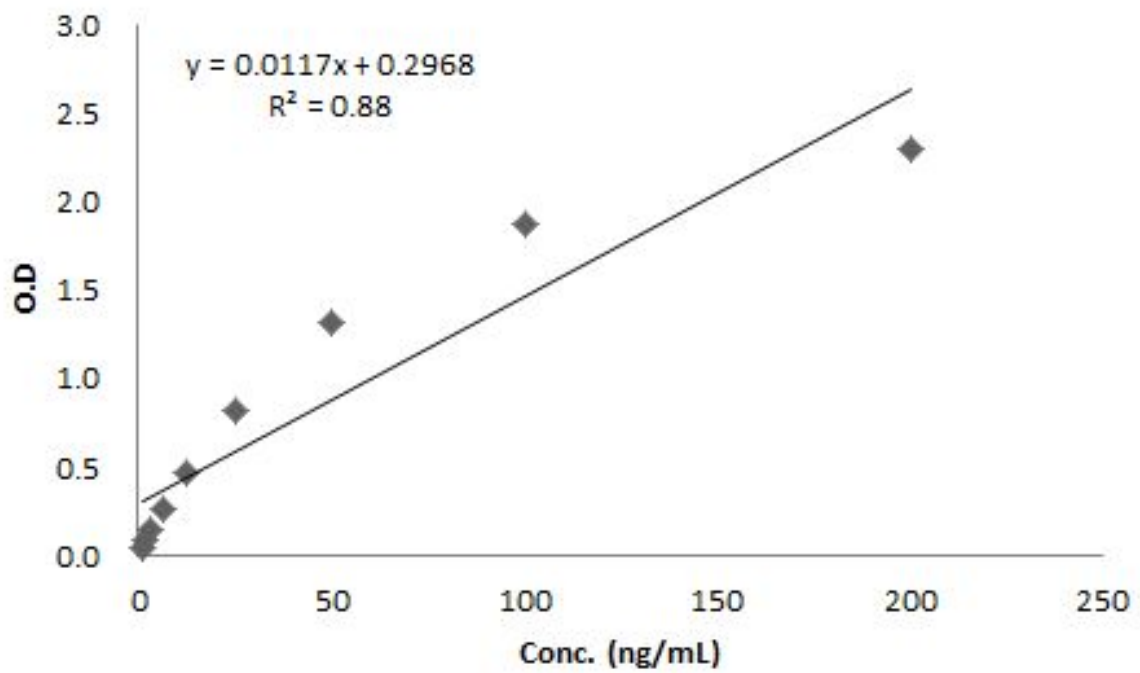
A. 0.781-400 ng/mL에서의 직선성

IgY농도 (ng/mL)	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
OD값	0.052	0.089	0.152	0.269	0.474	0.815	1.315	1.882	2.308	2.558
결정계수	0.77									



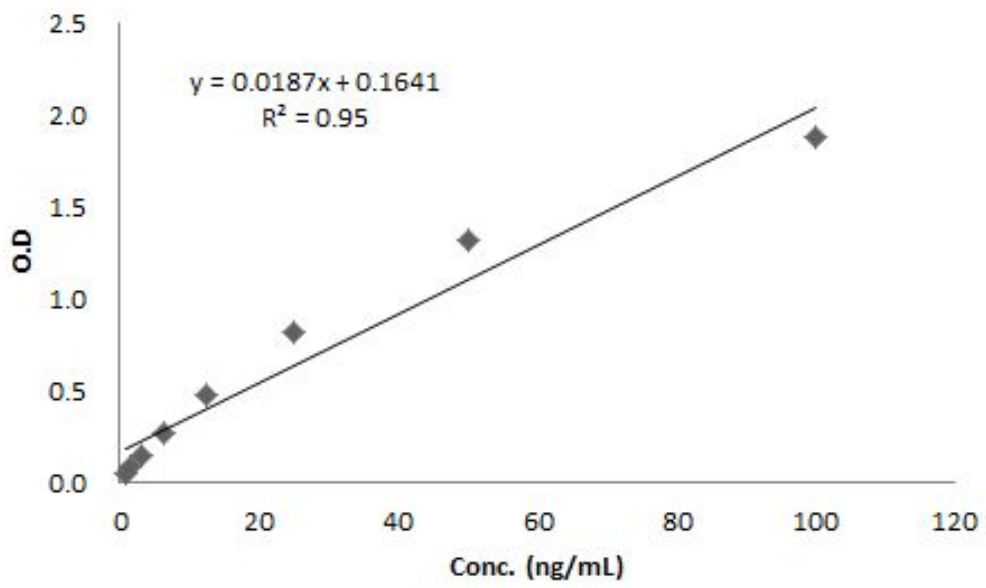
B. 0.781-200 ng/mL에서의 직선성

IgY농도 (ng/mL)	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
OD값	0.052	0.089	0.152	0.269	0.474	0.815	1.315	1.882	2.308
결정계수	0.88								



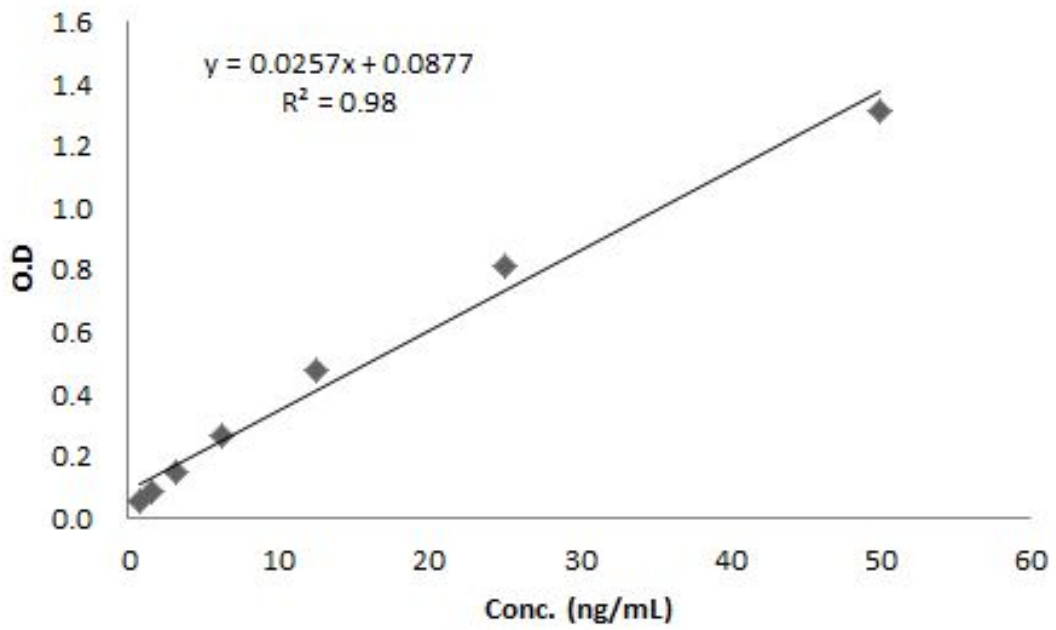
C. 0.781-100 ng/mL에서의 직선성

IgY농도 (ng/mL)	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50	100
OD값	0.052	0.089	0.152	0.269	0.474	0.815	1.315	1.882
결정계수	0.95							



D. 0.781-50 ng/mL에서의 직선성

IgY농도 (ng/mL)	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50
OD값	0.052	0.089	0.152	0.269	0.474	0.815	1.315
결정계수	0.98						



E. 0.781-25 ng/mL에서의 직선성

IgY농도 (ng/mL)	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25
OD값	0.052	0.089	0.152	0.269	0.474	0.815
결정계수	0.99					

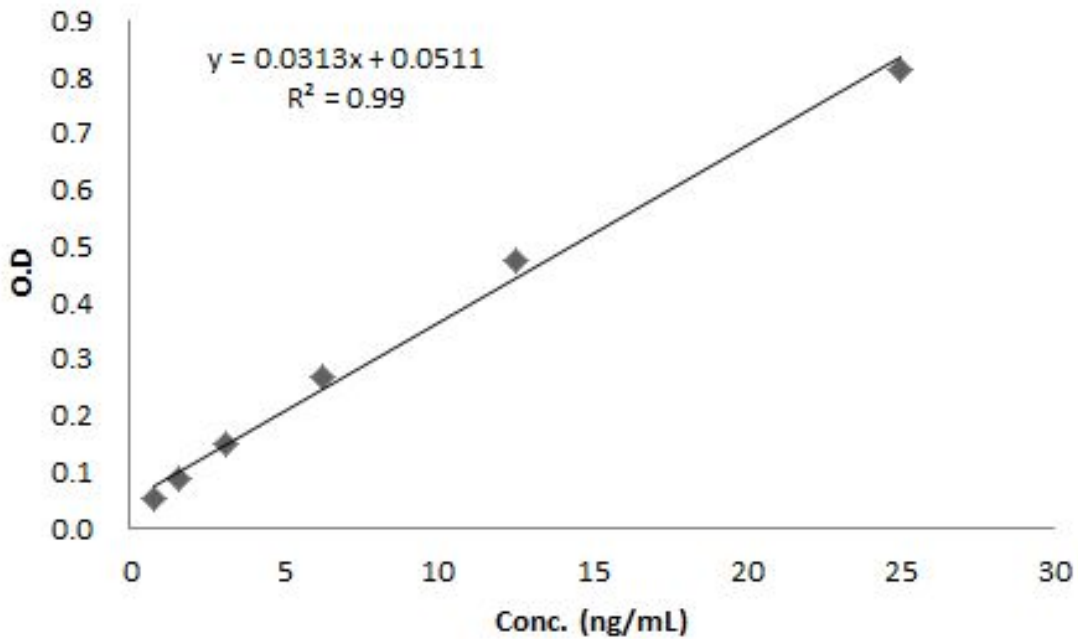


Fig. 2-16. 각 농도 범위에서의 직선성

(2) 직선성 검증시험

앞에서 설정한 정량농도 범위인 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.125 ng/ml, 1.563 ng/ml 농도의 purified chicken IgY를 측정하여 얻은 OD값으로부터 검량선을 작성하여 실측치 농도와 이론상의 농도를 비교하여 상대오차를 구한 후 정확성을 평가하고자 하였다. 상대오차는 각 농도별 이론상 농도대비 최저농도에서 80-120% 이내, 그 외 농도에서는 85-115% 이내에서 정확성을 평가하였다.

실험은 8회 반복 측정하였으며 모든 측정에서 검량선의 결정계수가 0.99이상임을 확인하였다. 8회 측정 실측치를 평균치로 하여 각 농도의 상대오차를 산출한 결과 Table 2-24와 같았다. 정량최저농도인 1.563 ng/ml의 실측치 평균은 1.393 ng/ml로 상대오차는 89.2%로 확인되었고,

그 외 3.125 ng/ml의 실측치 평균은 3.068 ng/ml, 상대오차는 98.2%, 6.25 ng/ml의 실측치 평균은 6.402 ng/ml, 상대오차는 102.4%, 12.5 ng/ml의 실측치 평균은 12.692 ng/ml, 상대오차는 101.5%, 25 ng/ml의 실측치 평균은 24.887 ng/ml, 상대오차는 99.6%로 확인되었다.

따라서 정량최저농도에서의 상대오차범위인 80-120% 및 그 외 농도에서의 상대오차허용범위인 85-115%를 모두 만족하였으며, 이론상의 농도와 실측치의 직선성이 정확하다는 것이 확인되었다.

Table 2-24. 1.563-25 ng/ml에서의 이론상 농도와 실측치 농도별 상대오차

이론치 (ng/mL)	측정회수	1.563	3.125	6.25	12.5	25	결정계수
	1	1.363	3.224	6.451	12.439	25.026	0.999
	2	1.403	3.156	6.500	12.377	25.006	0.999
	3	1.527	2.857	6.744	12.320	25.031	0.999
실측치 (ng/mL)	4	1.362	2.984	6.707	12.452	24.952	0.999
	5	1.281	2.844	6.209	13.541	24.502	0.996
	6	1.317	3.242	6.161	12.870	24.816	0.999
	7	1.570	3.322	5.783	12.834	24.918	0.999
	8	1.324	2.913	6.663	12.701	24.841	0.999
평균(ng/mL)		1.393	3.068	6.402	12.692	24.887	
상대오차		89.2%	98.2%	102.4%	101.5%	99.6%	

(3) 정량한계 및 정밀성 검증시험

최저농도를 포함한 3가지 농도인 1.563, 3.125, 6.25 ng/ml의 purified chicken IgY를 1일간 5회 분석, 2일간 3회씩 추가 분석하여 일내, 일간 정확성과 정밀성을 측정하였다. 최저농도(1.563 ng/ml)의 일내, 일간 정확성은 상대오차 80-120% 이내, 일내, 일간 정밀성은 변동계수 20% 미만에서 평가하였고, 그 외 농도의 일내, 일간 정확성은 상대오차 85-115% 이내, 일내, 일간 정밀성은 변동계수 15% 미만에서 평가하였다.

정량한계치 평가 결과 일내 상대오차는 92.17%, 변동계수는 7.34%이며, 일간 상대오차는 92.17%, 변동계수는 7.22%로 정량한계치 허용범위인 일내, 일간 상대오차 80-120%, 일내, 일간 변동계수 20% 미만 이내의 값을 나타내 정량한계치에서의 정확성이 확인되었다.

또한 3.125 ng/ml 농도에 대해서는 일내 상대오차는 102.64%, 변동계수는 5.52%이며, 일간 상

대오차는 102.64%, 변동계수는 4.74%로 나타났고, 6.25 ng/mL 농도에 대해서는 일내 상대오차는 101.97%, 변동계수는 5.23%이며, 일간 상대오차는 102.56%, 변동계수는 3.81%로 나타나 정량한계치 허용범위인 일내, 일간 상대오차 85-115%, 일내, 일간 변동계수 15% 미만 이내의 값을 나타내 일내, 일간의 정확성, 정밀성이 확인되었다(Table 2-25).

Table 2-25. 최저농도 포함 3가지 농도의 일내, 일간 상대오차 및 변동계수

실시일	이론치 (ng/mL)	측정회수	1.563	3.125	6.25
1일차	실측치 (ng/mL)	1	1.37	3.04	6.39
		2	1.35	3.02	5.42
		3	1.63	3.37	6.90
		4	1.60	3.09	6.11
		5	1.32	2.76	6.21
		평균	1.45	3.06	6.21
		일내상대오차	93.06%	97.79%	99.30%
		일내변동계수	10.21%	7.11%	8.61%
2일차	실측치 (ng/mL)	1	1.51	3.28	6.38
		2	1.44	3.35	6.38
		3	1.66	3.45	6.75
		평균	1.54	3.36	6.50
		일내상대오차	98.32%	107.52%	104.05%
		일내변동계수	7.31%	2.54%	3.28%
3일차	실측치 (ng/mL)	1	1.27	3.41	6.69
		2	1.33	2.97	6.24
		3	1.39	3.24	6.30
		평균	1.33	3.21	6.41
		일내상대오차	85.12%	102.61%	102.56%
		일내변동계수	4.51%	6.92%	3.81%
3일간 평균		3일 평균	1.44	3.21	6.37
		일간상대오차	92.17%	102.64%	101.97%
		일간변동계수	7.22%	4.74%	2.39%

9. 산업화를 위한 효율적 항체 정제 방법 확립

가. 재료 및 방법

(1) 대량 생산에 맞는 Ultrafiltration을 이용한 항체 농축

수거된 면역란의 난황의 지질 성분을 제거하기 위해 λ -carrageenan을 처리한 후 size가 1 μ m 인 filter paper를 이용하여 여과하였다. 분자량이 300 kDa인 membrane으로 한외여과하여 filter를 통과한(drain) 난황액을 모아 다시 분자량이 50 kDa인 membrane으로 한외여과하여 filter를 통과지 못한 난황액(permeate)을 농축하였다.

(2) SDS-PAGE를 통한 정제 여부 확인

UF를 통하여 농축된 난황액을 SDS-PAGE를 통하여 정제 여부를 확인하였다. 우선 0.75mm 유리판을 포개어 casting stand에 조립한 후 separating gel solution을 13% 농도로 준비하였다 (Table 2-26).

Table 2-26. Recipe for polyacrylamide separating gel(Unit: ml)

Stock solution	Final acrylamide concentration in the separating gel(%)									
	5.0	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0	10.0	12.0	13.0	15.0
30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide 4x Tris-HCL/SDS, pH8.8 H2O	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
10% ammonium persulfate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

결합된 spacer에 Comb를 꽂은 상태에서 1 cm 밑부분에 표시를 해놓고 comb를 제거한 후 separating gel을 Pasteur pipette을 이용하여 표시된 부분까지 붓고, H₂O-saturated isobutyl alcohol을 gel위로 층이 생기도록 서서히 부어 상온에서 gel을 굳혔다. Gel이 굳으면 H₂O-saturated isobutyl alcohol을 따라 버리고, 1x Tris-HCl/SDS, pH 8.8 용액으로 헹궈내고, stacking gel solution을 Pasteur pipet을 이용하여 separate gel 위 낮은 판까지 붓고 comb를 끼운 채 굳혔다. Stacking gel이 굳을 때 까지 상온에서 30-45분 보관하였다. 단백질 정량을 하여 농도를 알고 있는 샘플을 6x SDS/sample buffer를 사용하여 6:1로 희석한 후 screw-cap microcentrifuge tube에 담아 100℃에서 5분간 끓였다. gel의 comb를 gel이 찢어지지 않게 조심스럽게 제거를 하고, 1x SDS/electrophoresis buffer로 헹궈어냈다. Gel이 굳으면 Chamber에 gel을 장착하고 chamber에 1x SDS/electrophoresis buffer를 채웠다. Well에 sample을 적정량 loading하고, gel판이 완전히 잠길 때까지 chamber에 1x SDS/electrophoresis buffer로 채운 뒤

전원을 연결하고 bromphenol blue tracking dye가 separating gel에 도달할 때까지 100 V 조건으로 전기영동 하였다. Bromphenol blue tracking dye가 separating gel의 바닥에 도달하면 전원을 내려 전기영동을 종료하였다. Chamber 내 electrode buffer를 제거하고, gel판을 분리하고 gel판에서 gel을 조심스럽게 분리한 뒤 gel을 플라스틱 용기에 담아 staining 및 destaining을 하여 band를 관찰하였다.

나. 실험결과

본 실험에서 사용한 실험군과 대조군으로 실험군은 Ultrafiltration을 거쳐 농축을 한 난황항체를 사용하였으며, 대조군으로써 λ -carrageenan을 처리 후 난황의 지질만을 제거한 난황액으로 비교를 하였다. IgY의 heavy chain과 light chain을 분리하기 위해 끓는 물에서 5분간 끓여 주었으며, 이로 인해 깨끗하게 정제 된 IgY의 경우 band 양상이 heavy chain과 light chain 두 개로 깨끗하게 나오게 되어야 한다. 대조군은 단백질의 정제가 제대로 이루어지지 않아 band가 많이 나타나는데 비해 UF를 통해 정제한 난황액의 경우 비교적 깨끗하게 분리된 것을 확인할 수 있었다. 난황 IgY의 size는 heavy chain이 75 kDa, light chain이 35 kDa 인데, light chain이 흐릿하나 UF를 통과한 난황액에서 위와 같은 양상을 보여주었다. Fig에서 왼쪽부터 size marker, 대조군, UF통과한 난황액 순이다(Fig. 2-17).

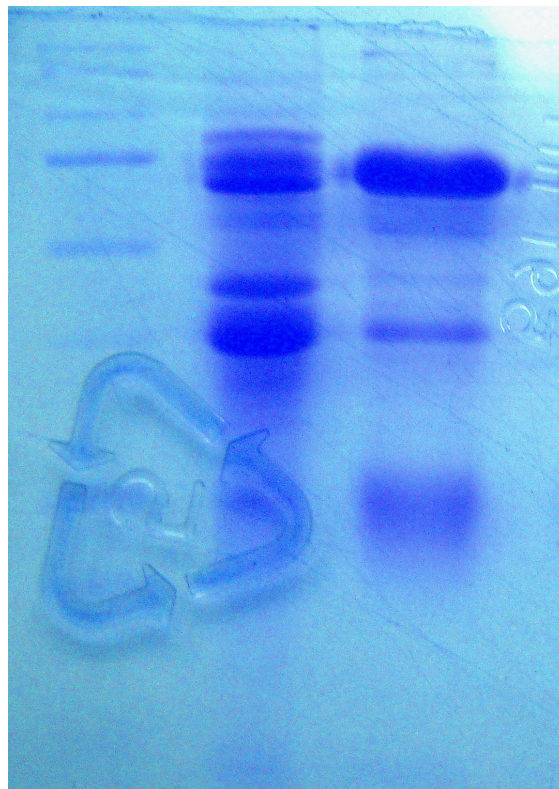


Fig. 2-17. SDS-PAGE를 통한 UF 정제확인

제 3 절 3 세부과제: 항-헬리코박터균 난황항체 생산

사양 및 면역항원의 생산조건을 확립하기 위하여 실험군 산란계 면역항원 접종방법 및 접종주기를 설정하였고 면역란을 수거하여 항체 역가측정에 따른 면역주기를 설정하였다. 또한 헬리코박터균 생육억제기능의 난황항체를 제조하기 위하여 면역항원이 접종된 계란의 살균조건을 확립하였다.

1. 사양 및 계란 생산조건 확립

가. 재료 및 방법

사양 및 면역항원의 생산조건 확립을 위해 최초 2주 간격으로 총 3회와 booster 면역 2회 동안 산란계 20수 가슴부위에 각각 1 mL의 항원을 접종한 후 계란을 수거하였다. Booster 면역은 항체역가 측정 후 역가의 측정치가 최고 역가점에서 50% 이상 감소 시에 접종을 실시하였다. 또한 면역란의 산란율과 치사율을 면역 후 주 단위로 측정하였다.

● 난황항체 살균조건 확립

난황의 살균조건을 확립하기 위한 방법으로 선행된 과제로서 외부로부터 계란을 구입하여 온도와 시간대 별로 난황의 살균조건을 확립하였다.

2. 헬리코박터균 생육억제기능의 난황항체 제조

가. 재료 및 방법

● 품종

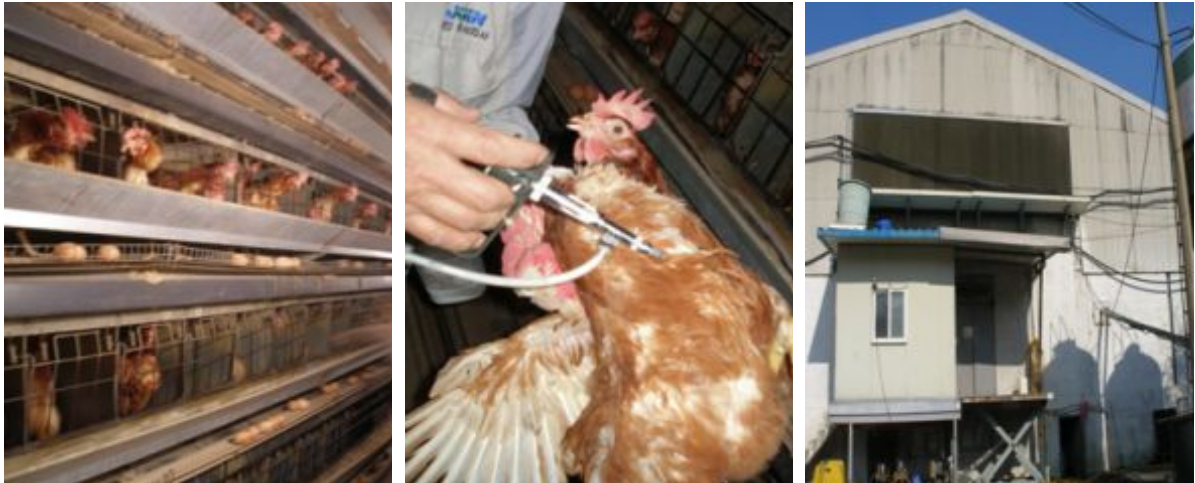
항-헬리코박터균 난황항체 대량생산을 위한 산란계로 48주령 로만브라운 산란계를 사용하였다.

● 접종 주기

접종은 2주 간격으로 총 3회에 걸쳐 항원 100 ug/0.5 mL을 아래 그림과 같이 닭의 가슴에 주사하였다.

● 생육조건

본 연구에 사용된 산란계를 아래 그림과 같이 독일 팜텍케이지에 2마리씩 입수하여 호프식 자유급이를 실시하였고 계사의 실내온도는 $18\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 40-60%를 유지하는 자동조절식 무창 계사에서 생육하였다.



(1) 가염 및 가당난황 제품의 유통기한 설정

● 냉장제품

냉장제품은 5℃ 이하 보관하며 경과일별 미생물 실험 및 외관, 관능의 평가를 실시하여 판정하였다. 관능평가는 아래와 같은 기준으로 수행하였고, 미생물 규격은 Table 3-1과 같은 항목으로 검사하였다.

● 냉동제품

냉동제품은 -18℃ 이하 보관하며 경과일별 미생물 실험 및 외관, 관능평가를 실시하여 판정하였다. 관능평가는 아래와 같은 기준으로 수행하였고, 미생물 규격은 아래와 같은 항목으로 검사하였다.

Table 3-1. 관능평가기준 및 미생물 규격

	똑같다	5
관능평가기준	약간 다른 것 같지만 구별이 안된다	4
	약간 차이가 있다	3
	차이가 있다	2
	차이가 뚜렷하다	1
미생물실험항목	축산물 가공처리법규상 살균제품의 미생물 규격 항목	
	-일반세균	
	-대장균군	
	-살모넬라	

나. 실험 결과

(1) 실험계군 산란율 및 폐사율

1차년도 면역 기간 동안 실험계군의 산란율 및 폐사율 현황은 Table 3-2와 같다. 면역 기간 동안 산란율은 90.0-94.3%의 범위를 보였고, 폐사는 발생하지 않았다.

Table 3-2. The status of birth rate and mortality rate of test group

Week	Birth rate	Mortality rate
1	-	-
2	-	-
3	18.6 /day(92.9%)	0 /day(0%)
4	18.4 /day(92.0%)	0 /day(0%)
5	18.0 /day(90.0%)	0 /day(0%)
6	18.9 /day(94.3%)	0 /day(0%)
7	18.7 /day(93.4%)	0 /day(0%)
8	18.9 /day(94.3%)	0 /day(0%)
9	18.7 /day(93.4%)	0 /day(0%)
10	18.6 /day(92.9%)	0 /day(0%)
11	18.3 /day(91.4%)	0 /day(0%)
12	18.3 /day(91.4%)	0 /day(0%)

2차년도 난황항체 대량생산을 위해 사용한 200수 분량의 산란계의 산란율 및 폐사율을 면역 기간 동안 확인하였다. 면역 기간 동안의 실험계군의 산란율 및 폐사율 현황은 Table 3-3과 같다. 평균 산란율은 약 88%, 평균 폐사율은 약 2%로 확인되었다.

Table 3-3. 면역기간 동안 200수 실험계군의 산란율 및 폐사율 현황

날짜	주령	수수	도 폐사	폐 폐사율	누적폐사율	산란율	비고(접종날짜)
2010/11/04	48-7	200		0.000	0.000	86.99	접 종
2010/11/05	49-1	199	1	0.500	0.500	86.39	
2010/11/06	49-2	199		0.000	0.500	86.62	
2010/11/07	49-3	199		0.000	0.500	87.45	
2010/11/08	49-4	199		0.000	0.500	86.92	
2010/11/09	49-5	199		0.000	0.500	86.71	
2010/11/10	49-6	199		0.000	0.500	87.46	
2010/11/11	49-7	199		0.000	0.500	86.49	
2010/11/12	50-1	199		0.000	0.500	87.24	
2010/11/13	50-2	199		0.000	0.500	87.30	
2010/11/14	50-3	199		0.000	0.500	87.26	
2010/11/15	50-4	199		0.000	0.500	86.62	
2010/11/16	50-5	199		0.000	0.500	86.93	
2010/11/17	50-6	199		0.000	0.500	87.41	
2010/11/18	50-7	199		0.000	0.500	87.55	접 종
2010/11/19	51-1	199		0.000	0.500	88.29	
2010/11/20	51-2	199		0.000	0.500	88.15	
2010/11/21	51-3	198	1	0.503	1.003	87.85	
2010/11/22	51-4	198		0.000	1.003	88.24	
2010/11/23	51-5	198		0.000	1.003	88.27	
2010/11/24	51-6	198		0.000	1.003	88.30	
2010/11/25	51-7	198		0.000	1.003	88.61	
2010/11/26	52-1	198		0.000	1.003	88.47	
2010/11/27	52-2	198		0.000	1.003	88.77	
2010/11/28	52-3	198		0.000	1.003	87.41	
2010/11/29	52-4	198		0.000	1.003	89.70	
2010/11/30	52-5	198		0.000	1.003	89.03	
2010/12/01	52-6	198		0.000	1.003	89.15	
2010/12/02	52-7	198		0.000	1.003	89.00	
2010/12/03	53-1	198		0.000	1.003	89.72	
2010/12/04	53-2	198		0.000	1.003	88.97	접 종
2010/12/05	53-3	198		0.000	1.003	88.99	
2010/12/06	53-4	198		0.000	1.003	88.75	
2010/12/07	53-5	198		0.000	1.003	89.29	
2010/12/08	53-6	198		0.000	1.003	89.32	
2010/12/09	53-7	197	1	0.505	1.508	88.65	
2010/12/10	54-1	197		0.000	1.508	88.68	
2010/12/11	54-2	197		0.000	1.508	87.32	
2010/12/12	54-3	197		0.000	1.508	88.32	
2010/12/13	54-4	197		0.000	1.508	88.52	

Table 3-2. (Continued)

날짜	주령	수수	도 폐사	폐 폐사율	누적폐사율	산란율	비고(접종날짜)
2010/12/14	54-5	197		0.000	1.508	86.71	
2010/12/15	54-6	197		0.000	1.508	88.31	
2010/12/16	54-7	197		0.000	1.508	89.21	
2010/12/17	55-1	197		0.000	1.508	88.75	
2010/12/18	55-2	197		0.000	1.508	89.07	
2010/12/19	55-3	197		0.000	1.508	88.79	
2010/12/20	55-4	197		0.000	1.508	88.98	
2010/12/21	55-5	197		0.000	1.508	89.27	
2010/12/22	55-6	197		0.000	1.508	89.47	
2010/12/23	55-7	197		0.000	1.508	89.23	
2010/12/24	56-1	197		0.000	1.508	89.17	
2010/12/25	56-2	197		0.000	1.508	89.66	
2010/12/26	56-3	197		0.000	1.508	88.92	
2010/12/27	56-4	197		0.000	1.508	89.76	
2010/12/28	56-5	197		0.000	1.508	89.27	
2010/12/29	56-6	197		0.000	1.508	89.65	
2010/12/30	56-7	197		0.000	1.508	89.41	
2010/12/31	57-1	197		0.000	1.508	88.99	
2011/01/01	57-2	197		0.000	1.508	89.11	
2011/01/02	57-3	197		0.000	1.508	88.87	
2011/01/03	57-4	197		0.000	1.508	88.28	
2011/01/04	57-5	197		0.000	1.508	89.18	
2011/01/05	57-6	197		0.000	1.508	88.51	
2011/01/06	57-7	197		0.000	1.508	88.71	
2011/01/07	58-1	197		0.000	1.508	88.56	
2011/01/08	58-2	197		0.000	1.508	88.06	
2011/01/09	58-3	197		0.000	1.508	88.87	
2011/01/10	58-4	196	1	0.508	2.015	88.45	
2011/01/11	58-5	196		0.000	2.015	88.13	
2011/01/12	58-6	196		0.000	2.015	88.86	
2011/01/13	58-7	196		0.000	2.015	88.19	
2011/01/14	59-1	196		0.000	2.015	88.21	
2011/01/15	59-2	196		0.000	2.015	87.80	
2011/01/16	59-3	196		0.000	2.015	87.57	
2011/01/17	59-4	196		0.000	2.015	87.86	
2011/01/18	59-5	196		0.000	2.015	88.07	
2011/01/19	59-6	196		0.000	2.015	87.48	
2011/01/20	59-7	196		0.000	2.015	87.86	
2011/01/21	60-1	196		0.000	2.015	87.37	
2011/01/22	60-2	196		0.000	2.015	87.40	

Table 3-3. (Continued)

날짜	주령	수수	도 폐사	폐 폐사율	누적폐사율	산란율	비고(접종날짜)
2011/01/23	60-3	196		0.000	2.015	87.86	
2011/01/24	60-4	196		0.000	2.015	87.53	
2011/01/25	60-5	196		0.000	2.015	87.13	
2011/01/26	60-6	196		0.000	2.015	87.33	
2011/01/27	60-7	196		0.000	2.015	86.92	
2011/01/28	61-1	196		0.000	2.015	86.07	
2011/01/29	61-2	196		0.000	2.015	86.54	
2011/01/30	61-3	196		0.000	2.015	86.13	
2011/01/31	61-4	196		0.000	2.015	84.75	
2011/02/01	61-5	196		0.000	2.015	86.64	
2011/02/02	61-6	196		0.000	2.015	86.59	
2011/02/03	61-7	196		0.000	2.015	86.71	
2011/02/04	62-1	196		0.000	2.015	85.87	
2011/02/05	62-2	196		0.000	2.015	86.53	
2011/02/06	62-3	196		0.000	2.015	85.67	
2011/02/07	62-4	196		0.000	2.015	87.20	
2011/02/08	62-5	196		0.000	2.015	87.00	

(2) 난황항체 살균조건 확립

축산물가공처리법의 살균액란의 규격으로 일반세균은 g당 10,000이하, 대장균군은 g당 10이하, 살모넬라는 음성의 규격에 준하여 난황의 살균조건 설정 실험이 선행 진행하였다. 30분을 기준으로 55℃에서 62.5℃까지는 열에 안정성을 보였고 65℃ 이상에서는 항체의 열화가 인정되었고, 또한 위의 조건에서 난황액을 처리하였을 시 미생물 규격에 적합하였다.

(3) 면역란의 난각 소독 농도 설정

산란된 원란의 난각표면에는 케이지의 분변에 의한 교차오염으로 살모넬라와 같은 병원성 미생물의 존재와 깃털, 분변이 난각에 묻어 제조공정상에서 난각의 세척 및 소독을 실시하여야 한다. 소독제는 차아염소산나트륨을 사용하였고 물과 적정농도로 희석하여 난각을 소독하였다. 실험결과는 아래 Table 3-4와 같고 희석농도는 결과를 토대로 150 ppm으로 설정하였다.

Table 3-4. 면역란 난각의 미생물 제어를 위한 차아염소산나트륨 농도 설정

차아염소산나트륨 농도	미생물 (일반세균)			비고
	1번째	2번째	3번째	
50 ppm	1300	-	-	일반세균 1,000이상으로 초기균수가 높아 더 이상의 검증 불필요(경험, 1회검증)
100 ppm	1100	-	-	
150 ppm	350	-	-	미생물적으로 안정하고, 잔류염소 확인 결과 원란 세척 시 150-200 ppm까지 가장 안정적인
200 ppm	170	-	-	
250 ppm	10	-	-	차아염소산나트륨 농도가 높을수록 균의 수치는 감소하지만, 염소가 잔류하여 더 이상의 검증 불필요(경험, 1회 검증)
300 ppm	5	-	-	

(4) 난황항체 생산을 위한 살균 난황 제조공정 확립

산란된 계란을 이용하여 할란 및 난황, 난백을 분리하여 순수난황을 우선적으로 생산하고 이 난황을 사용하여 살균처리를 실시하여 가염 및 가당을 실시하는 Fig. 3-1과 같이 제조공정을 확립하였다.

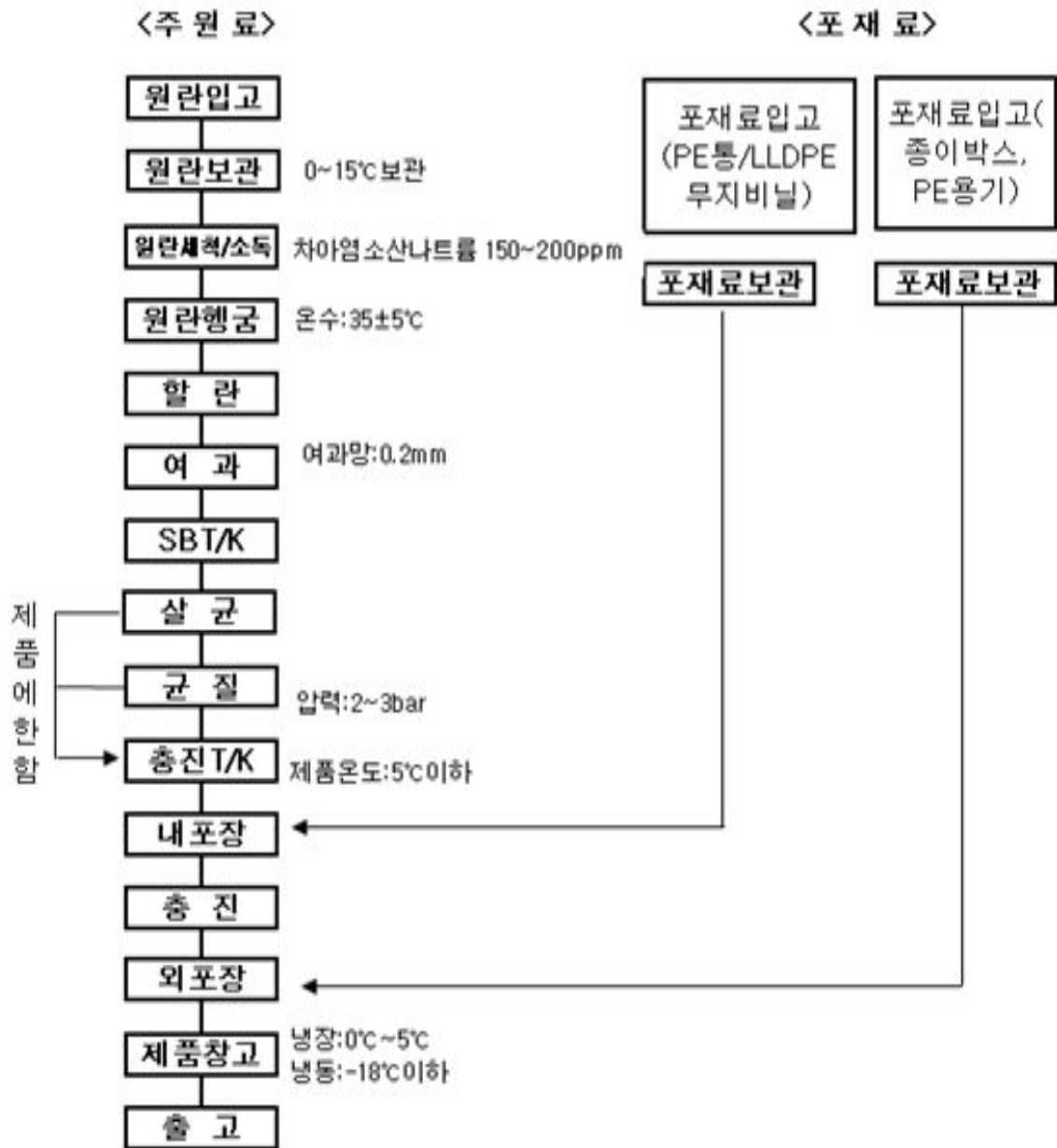


Fig. 3-1. 살균난황 제조공정도

(5) 난황의 살균조건 확립

계란은 일반적으로 단백질이 풍부하여 쉽게 변질되고 응고온도가 낮기 때문에 살균공정의 온도 및 시간의 관리가 상당히 중요하다. 난황제품의 품질의 변형을 최소화 하면서 제품이 미생물적으로 안전한 살균온도와 시간을 설정하여 살균함으로써 제품의 안전성을 확보하고자 하였다.

열교환방식의 살균기를 이용하여 제품의 살균을 실시하며 이 때 살균온도와 시간의 조건은 난황제품의 품질의 변형이 없는 선에서의 온도와 시간대별 살균을 실시하여 얻은 샘플을 미생물

실험을 통해 법적 규격을 충족할 수 있어야 한다. 살균액란 제품의 법적 규격은 다음과 같다.

일반세균	10,000 이하/g
대장균군	10 이하/g
살모넬라	음성 /g
보관조건	냉장 : 5℃이하 냉장보관 냉동 : -18℃이하 냉동보관
유통기한	살균제품 7일 비살균제품 48시간

온도 및 시간 별 살균제품의 미생물 결과는 아래 Table 3-5와 같다.

Table 3-5. 온도 및 시간별 살균제품의 미생물 결과

제품	살균 온도	유속	관능 검사	미생물								
				일반세균			대장균군			살모넬라균		
				이취 이취 잔존	1번째	2번째 (가) - *	3번째	1번째	2번째	3번째	1번째	2번째
난황액	64℃	2000	이취 잔존	8100	*	-	30	-	-	음성	-	-
	65℃	1500	양호	17	10	28	음성	음성	음성	음성	음성	음성
	66℃	1500	양호	음성	음성	50	음성	음성	음성	음성	음성	음성
	67℃	1500	양호	음성	음성	12	음성	음성	음성	음성	음성	음성

* 이취발생으로 더 이상 검증 불필요(경험, 1회검증)

(6) 난황의 가염 및 가당공정 확립

살균 전 난황제품에 가염 및 가당을 실시할 경우 제품의 점도 상승으로 인하여 가염 및 가당 시 후 살균을 위한 이송에 문제가 발생하였다. 그리고 점도의 증가로 인하여 살균 시 제품의 응고 현상 발생 가능성을 보였다. 또한 살균 전 가염 및 가당을 실시하면 살균 작업 시 판넬의 스케일 및 설비에 영향을 미칠 가능성이 컸다.

살균 후 가염 및 가당을 실시할 경우 제품에 미생물의 2차 오염 발생가능성이 있었으나 미생물의 2차 오염을 방지하는 소독 및 청결상태를 유지로 미생물의 오염을 방지하여 살균공정 전에 가염 및 가당 실시하는 공정을 확립하였다(Fig. 3-2).

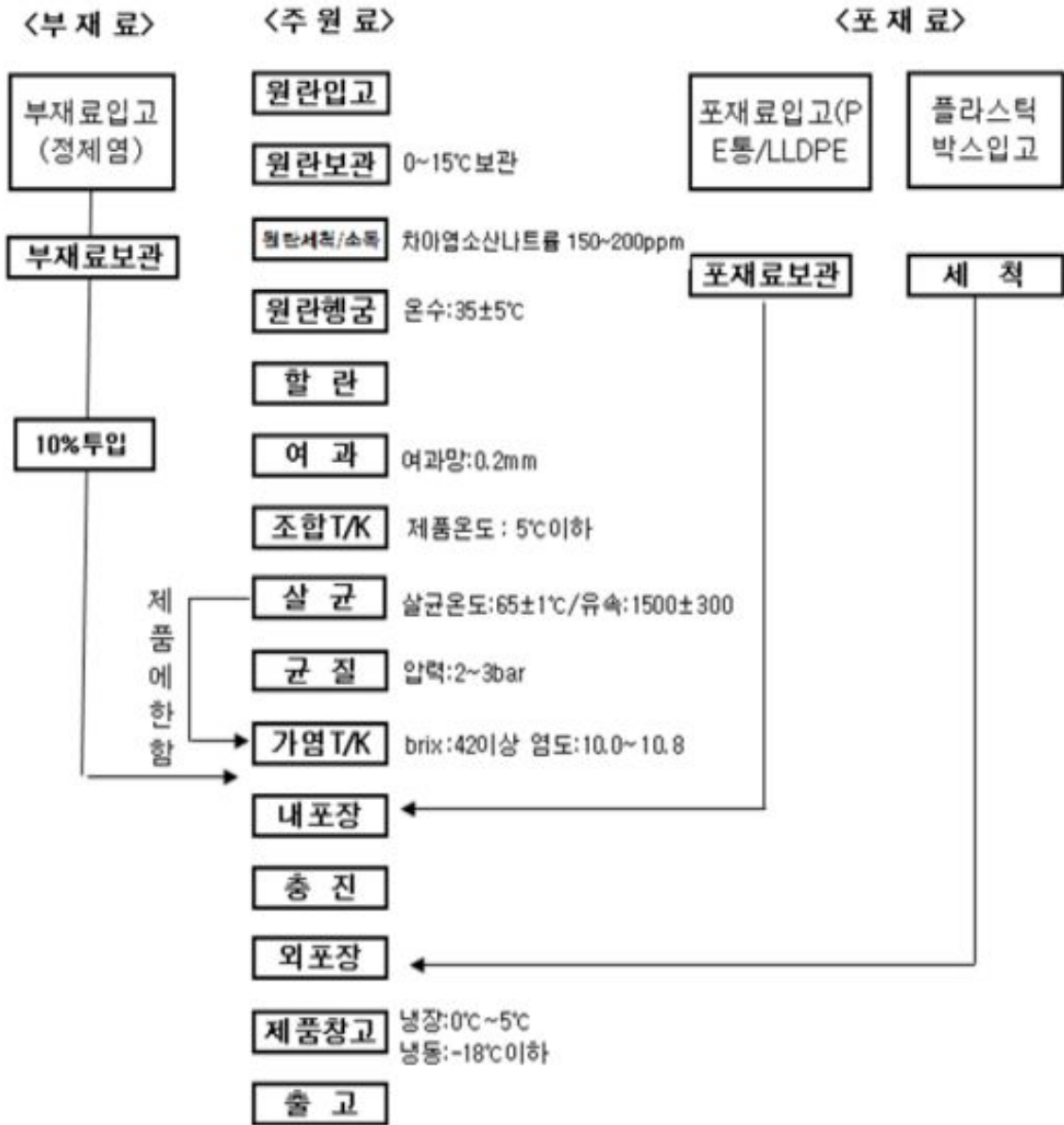


Fig. 3-2. 가열 및 가당 난황 제조공정도

(7) 제품의 유통기한 설정 시험

난황제품의 유통기한을 설정하고자 냉장, 냉동 상태에서 경과일에 따른 외관 및 관능평가를 실시하고, 축산물 가공처리법규 상 살균제품의 미생물 규격인 일반세균, 대장균군, 살모넬라를 검사하였다. 검사 결과는 Table 3-6, 3-7과 같다.

냉장 상태에서의 검사 결과 제품을 12일간 냉장보관 하여도 외관, 관능 및 미생물 검사에서도 상품성이 있는 품질이 유지 되었으나, 제품의 보다 안전성을 유지하기 위해 유통기한을 7일로

설정하였다.

냉동 상태에서의 검사 결과 실험기간동안 일반세균은 한계치인 10,000 이하/g를 벗어나지 않았고, 전체적으로 1,000 이하/g로 안정성을 유지하였으며, 대장균군 및 살모넬라균은 실험기간 내에 모두 불검출로 적합하였다. 상기 실험 결과는 570일 동안의 실험 결과이며 통상 7배의 안전성을 보장하는 결과치이다.

본 제품에 대한 유통기간을 1년으로 예측하고 이를 설정하였을 경우 제품의 원료조건 및 제조공정과 보관방법으로 인하여 제품의 보존성은 확보될 수 있으며 유통기한이 긴 유사제품과 비교해도 품질관리에 문제점이 없으며 더불어 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합 사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 동 제품의 유통기간을 1년으로 설정하는데 따른 제품의 안정성과 품질에 별다른 문제점이 없을 것으로 판단되어 유통기간을 1년으로 설정하였다.

Table 3-6. 냉장제품의 유통기한 설정 실험 결과

구분 경과일	외관	풍미	일반세균	대장균군	살모넬라균
표준제품	양호	5.0	2.0×10^1	음성	음성
1일	양호	5.0	2.0×10^1	음성	음성
2일	양호	5.0	2.0×10^1	음성	음성
3일	양호	5.0	3.0×10^1	음성	음성
4일	양호	5.0	5.0×10^1	음성	음성
5일	양호	5.0	6.0×10^1	음성	음성
6일	양호	5.0	7.0×10^1	음성	음성
7일	양호	5.0	9.0×10^1	음성	음성
8일	양호	5.0	1.0×10^2	음성	음성
9일	양호	5.0	1.2×10^2	음성	음성
10일	양호	4.9	1.2×10^2	음성	음성
11일	양호	4.9	1.5×10^2	음성	음성
12일	양호	4.7	1.7×10^2	음성	음성

Table 3-7. 냉동제품의 유통기한 설정 실험 결과

경과일	구분	실험온도(-18℃ 보관)			
		외관	풍미	일반세균	대장균군
표준제품	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
1일	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
10일	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
30일	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
60일	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
90일	양호	5.0	1×10 ¹	음성	음성
120일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
150일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
180일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
210일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
240일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
270일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
300일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
330일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
360일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
390일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
420일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
450일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
480일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
510일	양호	5.0	2×10 ¹	음성	음성
540일	양호	4.9	2×10 ¹	음성	음성
570일	양호	4.9	2×10 ¹	음성	음성

제 4 절 4 세부과제: 항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능 확인

1. 헬리코박터균 생육억제기능의 복합체 재료 및 유산균 screening

(1) 유산균의 배양 및 분리

가. 재료 및 방법

(가) *H. pylori*와 유산균의 배양

● *H. pylori* 배양

본 연구에서 사용된 표준 균주 *H. pylori*는 생물자원센터(KCTC)에서 분양받았으며, 야생형 균주는 경상대학교에서 분양받은 2주를 사용하였다. *H. pylori*의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)가 첨가된 brucella agar 또는 broth에 접종한 후 10% CO₂ incubator 또는 microaerobic chamber에서 48시간 배양하였다.

● 유산균의 배양

본 연구에서는 유산균의 분리를 위해 대조균으로 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactics* 등의 표준 균주는 Lactobacilli MRS agar 또는 broth에 접종한 후 37°C에서 배양하여 사용하였다.

(나) 분리원 및 유산균의 분리

● 분리원

*H. pylori*의 생육을 저해 하는 유산균을 분리하기 위해 가정집과 식당, 시중에 파는 김치와 타락을 이용하였다.

● 배양

수집된 시료는 마쇄 후 균질화 및 여과하고 적정 배율로 희석하여 Lactobacilli MRS agar에 도말한 후 37°C에서 72±3시간 배양하였다. 배양 후 형성된 단일 집락을 유산균 표준 균주와 유사한 형태학적 특성을 나타내는 집락을 선택하여 Lactobacilli MRS agar에 평판 희석한 후 동일한 조건에서 배양하였다.

● 동정

본 실험에서 분리된 유산균의 Gram 양/음성 실험, catalase test, 현미경 관찰을 수행하여 1차적으로 유산균을 분리하였다. 선별된 균주는 API 50CHL을 이용하여 당 발효능을 조사한 후 균주 동정 프로그램을 이용하여 동정하였다.

● 16s rRNA 서열 분석을 통한 젓산균의 동정

분리된 젓산균을 API kit 50CHL을 이용해 당자화성 특성 및 1차적으로 동정 후 최종적인 동정을 위해 16s rRNA 서열 분석을 수행하였다. 서열 분석을 위해 분리된 젓산균을 Lactobacilli MRS broth에 배양하고 배양액 1.5 ml을 취해 원심 분리한 후 0.8% 멸균생리식염수로 수세하였다. 그리고 genomic DNA kit를 사용하여 chromosomal DNA를 추출하여 PCR을 위한 template DNA로 사용하였으며, 세균의 16s rRNA에 대한 universal primer인 F-341 (CCTACGGGAGGCAGCAG) and 786-R(GACTACCAGGGTATCTAATC)을 사용하였다. PCR 수행 후 PCR product를 전기영동을 통해 450 bp의 증폭 산물을 확인하고 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 염기서열은 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Biosystems, CA, USA)와 ABI 3700 sequencer (Biosystems, CA, USA)에 의해 수행하였으며, primer는 위와 동일하게 사용하였다. 16S rRNA sequence의 homologus의 분석은 National Center for Biotechnology Information (.gov/)의 BLAST search program을 이용하여 DNA database와 비교하였다. 그리고 계통학적 분석은 Clustal X, BioEdit, MEGA 4를 이용하여 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 확인하였다.

나. 실험결과

(가) 유산균의 분리

김치와 타락으로부터 유산균의 분리를 위해 Lactobacilli MRS agar에서 배양된 집락의 형태학적인 특성에 따라 분리한 후 Gram test, catalase test, 현미경 관찰을 통한 형태학적 특성 확인 등을 통해 유산균으로 의심되는 균을 선별하였다. 그리고 API 50 CHL kit를 이용하여 당 발효특성 등의 생화학적 특성을 확인하고 그 결과를 동정 프로그램을 통해 확인하였으며, 동정 결과(%)가 90% 이상인 균주만을 선별하였다. 그 결과 *Lactobacillus curvatus*, *Leuconotoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*를 각각 분리하였다(Table 4-1).

또한 API 50CHL은 생화학적 특성에 의한 동정 방법으로 유산균의 완벽한 동정에는 한계가 있으므로 16s rRNA sequencing을 통한 추가적인 동정이 필요하였다.

Table 4-1. Identification of lactic acid bacteria by API CHL kit

	Strain No.(ID %)																
	① (94.5)	② (99.9)	③ (95.8)	④ (93.2)	⑤ (99.9)	⑥ (98.5)	⑦ (99.6)	⑧ (99.9)	⑨ (97.0)	⑩ (96.8)	⑪ (98.7)	⑫ (96.6)	⑬ (98.1)	⑭ (92.3)	⑮ (94.2)	⑰ (99.6)	
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RIB	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
DXYL	+	+	+	+	+	-	+	?	-	-	+	+	+	+	-	+	+
LXYL	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SBE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
AMY	-	-	?	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
ARB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
CEL	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
MAL	+	?	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
LAC	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
MEL	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
SAC	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RAF	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
TUR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	+	-	-	-	+	-	-	?	+	+	+	+	-	-	+
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“?” be hard to distinguish

Lactobacillus curvatus: ①, ②, ③, ⑦, ⑧, *Lactococcus lactis*: ⑥, ⑫,

Lactobacillus fermentum: ⑬, *Weissella confusa*: ⑨, ⑩, ⑭, *Leuconstoc mensenteroides*: ④, ⑤

Streptococcus thermophilus: ⑮, *Lactobacillus plantarum*: ⑪, ⑰

(나) 16s rRNA 서열 분석을 통한 젓산균의 동정

김치와 타락에서 분리된 다양한 종류의 젓산균들 중 *H. pylori*에 대한 항균 효과가 우수한 균주를 당자화성과 16s rRNA 염기서열 분석한 결과, 김치에서 분리한 LAB kw5는 *Leuconostoc mesenteroides*, 타락에서 분리한 LAB kw15는 *Streptococcus thermophilus*로 동정되었다(Fig. 4-1).

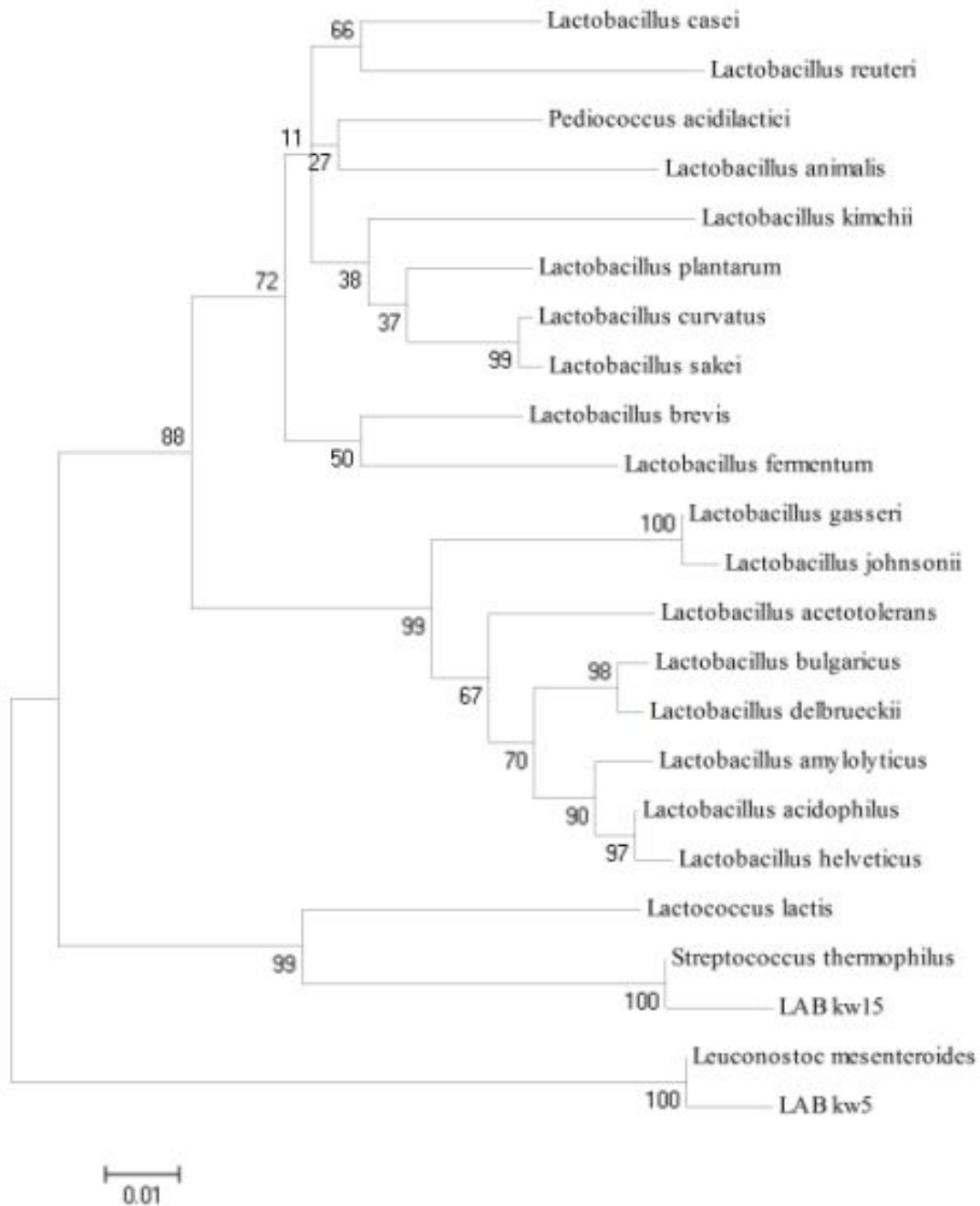


Fig. 4-1. Phylogenetic analysis of lactic and bacteria isolated with 16s rRNA gene

2. 헬리코박터균 생육억제기능의 복합체 재료 및 유산균 확립

(1) 분리된 유산균의 *H. pylori*에 대한 억제 효과

가. 재료 및 방법

● 배양

분리된 유산균의 *H. pylori*에 대한 생육 억제 효과를 확인하기 위해 분리 균주를 24시간 동안 50 ml Lactobacilli MRS broth에서 배양된 배양액을 원심 분리(10000 g, 5분)한 후 상등액을 취해 pH 7.0으로 보정한 후 0.2 μ m membrane filter를 이용하여 제균한 후 사용하였다. 10% FBS가 첨가된 brucella broth에서 48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella agar에 도말한 후 10 μ l의 유산균 제균액을 분주하였다.

● 생육 억제능 확인

37°C에서 미호기 상태에서 48시간 배양한 후 생육 억제를 확인하였다. *H. pylori*에 대한 생육 억제능이 있는 유산균의 배양 상등액이 시간에 따라 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 확인하였다. 미호기 조건에서 48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella broth에 접종 후 pH 7.0으로 보정 후 0.2 μ m membrane filter로 제균된 유산균의 배양 상등액을 첨가하여 시간에 따른 생육 정도를 흡광도 660 nm에서 측정하였다.

나. 실험결과

분리된 유산균에 의한 *H. pylori*의 생육 저해 효과를 확인하기 위해 유산균의 배양 상등액을 pH 7.0으로 보정하여 *H. pylori*에 대한 생육 저해능을 확인하였다(Fig. 4-2, Fig. 4-3, Table 4-2).

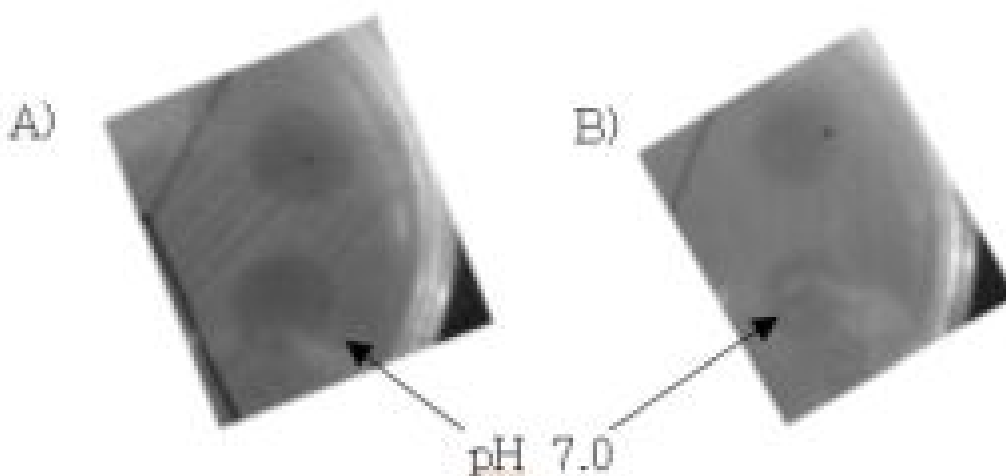


Fig. 4-2. Inhibition of *H. pylori* KCTC12083 by supernatant of lactic acid bacteria.

A) Supernatant of Lactic acid bacteria 5, B) Supernatant of Lactic acid bacteria 15

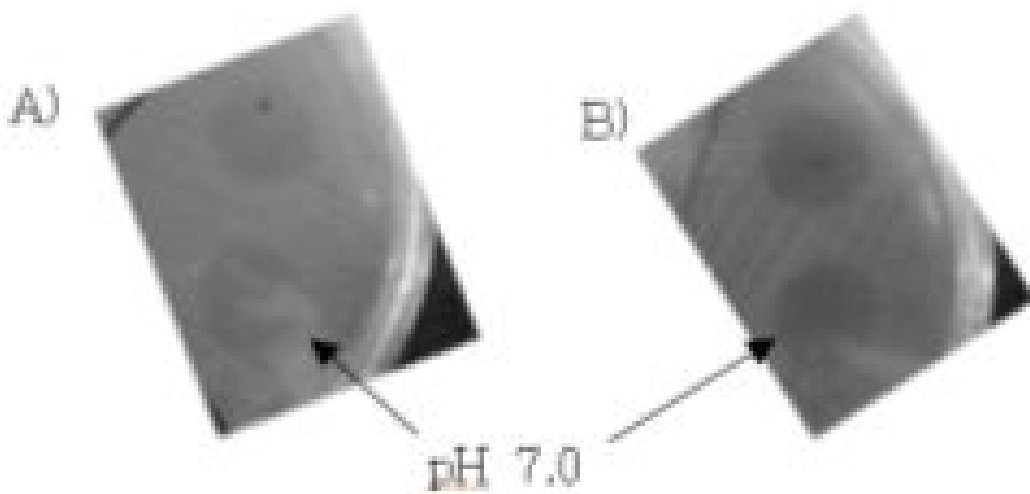


Fig. 4-3. Inhibition of *H. pylori* 52 by supernatant of lactic acid bacteria.

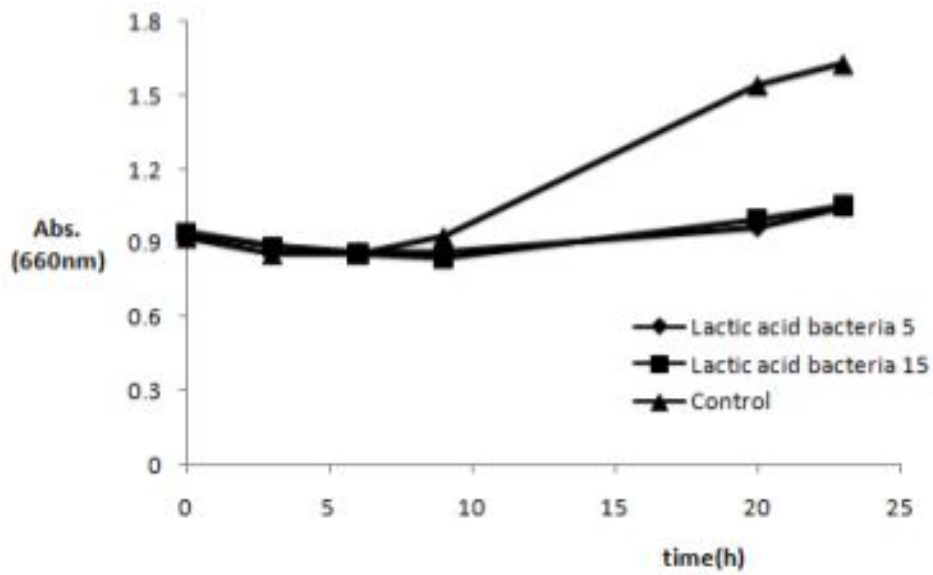
A) Supernatant of Lactic acid bacteria 5, B) Supernatant of Lactic acid bacteria 15

Table 4-2. Inhibition of *H. pylori* by supernatant of lactic acid bacteria

LAB	<i>H. pylori</i>	KCTC 12083		52	
		Drop	well diffusion (inhibition zone)	Drop	well diffusion (inhibition zone)
Lactic acid bacteria 5	No adjustment	o	o (14 mm)	o	o (13 mm)
	pH7	o	o (13 mm)	o	o (14 mm)
Lactic acid bacteria 15	No adjustment	o	o (12 mm)	o	o (13 mm)
	pH7	o	o (13 mm)	o	o (12 mm)

김치와 타락으로부터 분리된 유산균에 의한 *H. pylori*의 생육 억제를 확인한 결과 배양 상등액을 pH 7.0으로 보정했을 때와 그렇지 않은 경우 모두 *H. pylori*의 생육 억제환을 확인할 수 있었다. *H. pylori*의 생육 저해는 유산균이 생성해 내는 항균 물질과 젖산 등에 의한 낮은 pH에 의한 작용인 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 pH 7.0으로 보정 후에도 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 나타낸 것으로 나타나 분리된 유산균은 *H. pylori*의 생육을 억제하는 항균 물질을 생산해 내는 것으로 사료된다. 분리된 유산균의 배양 상등액을 pH 7.0으로 보정하여 *H. pylori* 배양액에 첨가하여 시간에 따라 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 확인한 결과 Fig. 4-4와 같다. *H. pylori*에 배양 상등액을 첨가했을 배양하였을 경우 배양 상등액이 첨가되어 있지 않았을 때와 비교하여 표준 균주와 야생형에서 모두 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4-4).

A)



B)

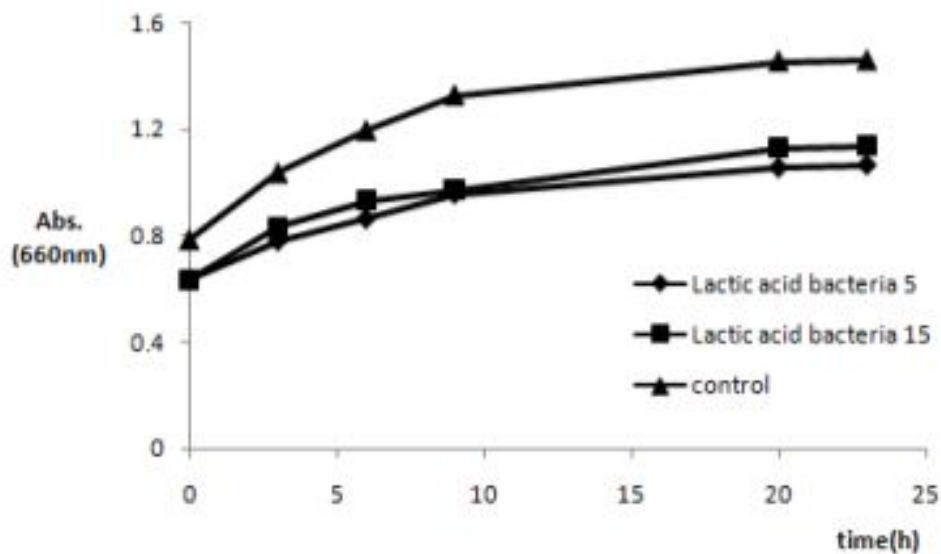


Fig. 4-4. Growth inhibition of *H. pylori* by supernatant of lactic acid bacteria.

A) *H. pylori* KCTC12083, B) *H. pylori* 52

(2) 분리된 젖산균의 *H. pylori*에 대한 생육 저해

가. 재료 및 방법

48시간 고체배지에서 배양된 *H. pylori*를 멸균된 생리식염수로 현탁 후 brucella평판배지에 도말하였다. *H. pylori*가 도말된 brucella평판배지에 멸균된 paper disk(diameter 8.00 mm, Advantec Co., Japan)을 올리고, well(직경 8 mm)을 만들어 pH가 보정되지 않은 유산균 배양

상등액과 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.0로 보정한 유산균 배양 상등액을 각각 10 μ l씩 분주하였다. CO₂ incubator에서 37°C에서 48-72시간동안 배양하여 disk, well, spot의 억제환 생성 유무를 확인 후 억제환의 크기를 측정하였다.

나. 실험 결과

분리된 *L. mesenteroides* LAB kw5와 *S. thermophilus* LAB kw15의 배양 상등액을 pH 7.0으로 조정하여 다음 *H. pylori* 배양액에 첨가하여 시간에 따라 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 4-5). *H. pylori*에 배양 상등액을 첨가하여 배양하였을 경우와 배양 상등액이 첨가되어 있지 않았을 때를 비교하여 표준 균주와 야생형 *H. pylori* 모두에서 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. *L. mesenteroides* LAB kw5이 *H. pylori* KCTC 12083만 배양한 구간에 비하여 약 30%이상, *H. pylori* 52는 배양한 구간에 비하여 약 25% 이상의 높은 생육활성 억제력을 나타냈고, *S. thermophilus* LABkw15는 *H. pylori* KCTC 12083는 배양한 구간에 비하여 약 30% 정도, *H. pylori* 52만 배양한 구간에 비하여 약 20% 이상의 높은 생육활성 억제력을 나타냈다. *H. pylori*의 야생형보다 표준균주에서 생육억제가 더 크게 나타났고, *S. thermophilus* LAB kw15보다 *L. mesenteroides* LAB kw5가 더 높은 *H. pylori* 활성억제력을 확인할 수 있었다. 그러나 *L. mesenteroides* LAB kw5와 *S. thermophilus* LAB kw15의 항균 물질 생산 분비 능력의 차이는 크지 않은 것으로 사료된다.

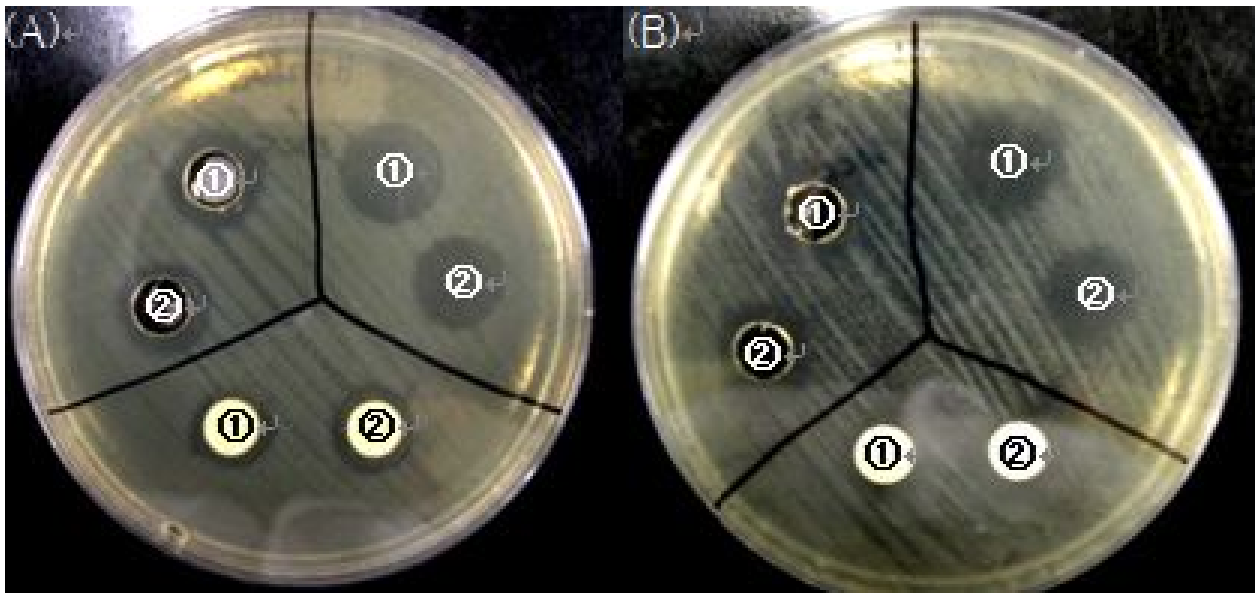


Fig. 4-5. Inhibition of *Helicobacter pylori* KCTC 12083 (A) and wild type *H. pylori* 52 (B) by culture supernatant from LAB isolates with pH adjusted to pH7.0

① *L. mesenteroides* LAB kw5, ② *S. thermophilus* LAB kw15

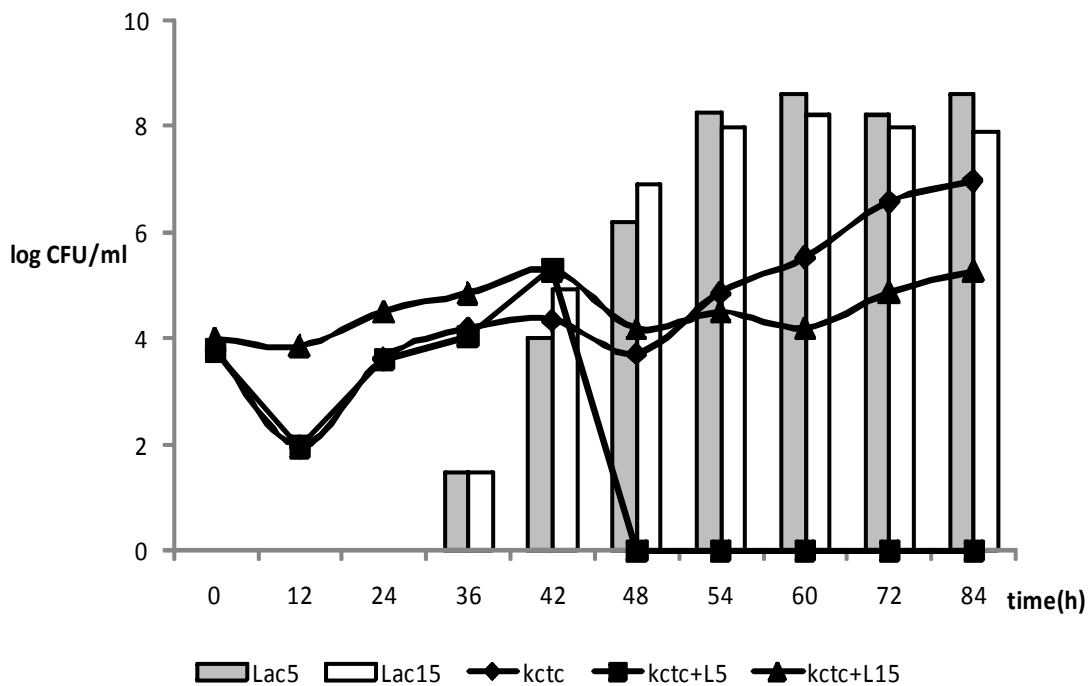
(3) 젖산균 배양액의 항 *H. pylori*의 효과와 혼합배양

가. 실험방법

젖산균과 *H. pylori*의 혼합 배양은 50 ml brucella 액체배지에 *H. pylori*의 single colony를 현탁하고 CO₂ incubator에서 37°C에서 36시간동안 배양하였다. *H. pylori*가 배양된 액체배지에 일정한 비율로 희석된 유산균을 넣어 같이 배양하면서 시간에 따른 *H. pylori*와 유산균의 수를 측정하고 *H. pylori* 저해여부를 알아보았다.

나. 실험결과

분리한 각 유산균들의 배양시간에 따른 저해력의 변화를 측정하였다. 그러나 유산균은 24-36시간, *H. pylori*은 48-72시간으로 각 생육시간대가 다르기 때문에 *H. pylori*가 액체배양이 36시간일 때, 유산균을 10³ /ml로 맞춰서 같이 배양하였다. 유산균이 배양한지 6시간 만에 급격히 증가되었고, 24시간이 되어서 최고점에 달았다. 18시간 전에는 LAB kw 15, 18시간 후로는 LAB kw 5의 배양속도가 더 빨랐다. *H. pylori*에 따라 약간의 차이가 있지만 김치분리유산균은 배양 후 0-6시간부터 저해물질을 분비하기 시작하고 특히, LAB kw 5의 경우 약 6-12시간에는 최대의 저해력을 나타내면서 계속 유지되었다. 그러나 LAB kw 15는 12시간 경과할 때에 약 20-30%정도 저해력이 약해짐을 알 수 있었다. 이것은 *H. pylori*을 억제하기보다 생육속도를 낮추는 것으로 추측된다(Fig. 4-6).



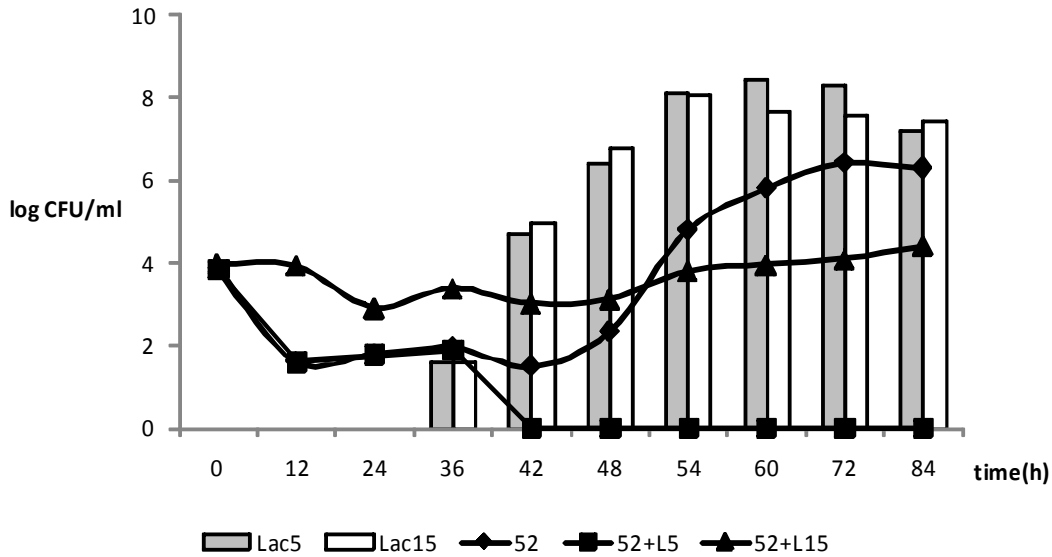


Fig. 4-6. Growth inhibition of *H. pylori* by lactic acid bacteria by culture time
 A) *H. pylori* KCTC12083, B) *H. pylori* 52

(4) *H. pylori* 억제추출물의 효능과 최소효능점

가. 실험방법

젖산균, 목이버섯 추출물의 *H. pylori*에 대한 생육 억제 효과와 최소효능점을 확인하기 위해 5진 희석하여 10% FBS가 첨가된 brucella broth에서 48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella agar에 도말한 후 10 μ l의 난황항체, 유산균, 목이버섯 추출물을 분주하였다. spot의 억제환 생성 유무를 확인 후 억제환의 크기를 관찰하여 최소 효능점을 알아보았다.

나. 실험결과

목이버섯 추출액과 분리된 젖산균 상등액 동결건조액의 *H. pylori*에 대한 생육 억제능 확인을 한 결과, 기존에 보고된 차조기추출물의 경우 5^{-4} 희석액에서까지 저해 효과를 나타낸 반면, 젖산균의 경우 LAB KW5는 5^{-6} , Lab KW15는 5^{-5} 희석액에서 저해 효과가 관찰되어 기존에 보고된 차조기에 비해 *H. pylori*에 대한 저해능이 우수한 것으로 나타났다. 또한 목이버섯의 경우 *H. pylori* KCTC 12083와 야생형인 *H. pylori* 52에서 저해 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 목이버섯을 이용한 *H. pylori*에 대한 저해 효과를 비교한 다른 연구 결과에서도

이와 유사한 결과를 나타내고 있었다. 하지만 목이버섯이 *H. pylori*가 세포에 부착하는 것을 억제하는 효과에 대한 연구 결과가 있으므로, 분리된 젓산균과 목이버섯 추출물과 함께 본 연구를 통해 제조된 IgY의 복합체를 이용하여 *H. pylori*의 생육 저해 및 부착 억제능 등에 대해 synergy 효과를 확인 하는 연구를 진행 하였다(Table 4-3, Fig. 4-7).

Table 4-3. Inhibition of *H. pylori* by lactic acid bacteria, *Perilla frutescens* extract and black fungus extract

		5 ⁰	5 ⁻¹	5 ⁻²	5 ⁻³	5 ⁻⁴	5 ⁻⁵	5 ⁻⁶	5 ⁻⁷	5 ⁻⁸
<i>H.pylori</i> KCTC 12083	<i>Perilla frutescens</i> extract	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	black fungus extract	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	LAB KW 5	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
	LAB KW 15	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
<i>H.pylori</i> 52	<i>Perilla frutescens</i> extract	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	black fungus extract	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	LAB KW 5	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
	LAB KW 15	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-

+++ : strong, ++ : intermediate, + : weak, - : No inhibition

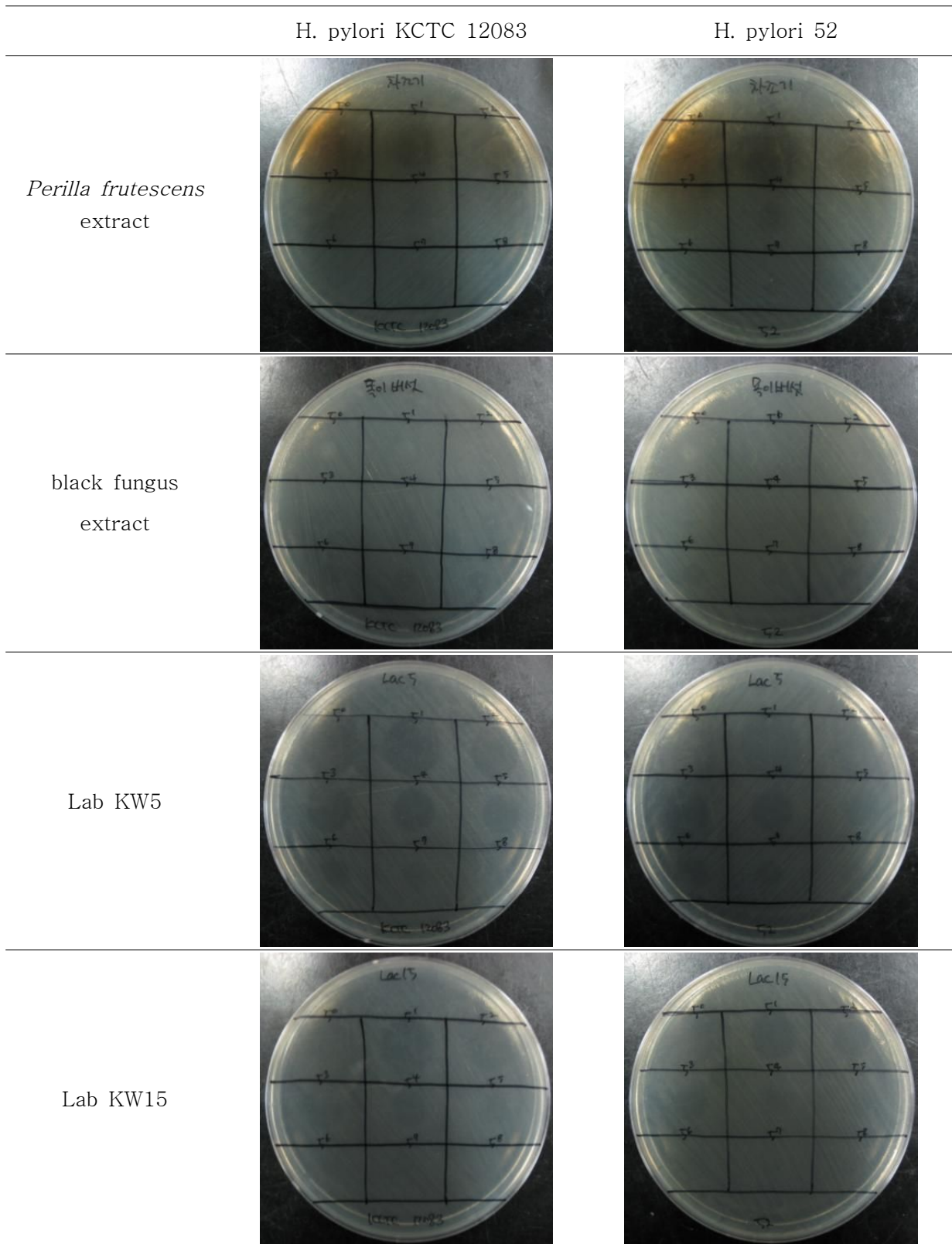


Fig. 4-7. Inhibition of *H. pylori* by lactic acid bacteria, *Perilla frutescens* extract and black fungus extract

(5) 젓산균의 bacteriocin의 정제

가. 실험방법

분리된 젓산균들에 대한 bacteriocin 분리를 위해 동결 건조한 시료를 1 ml의 3차 증류수에 녹이고 0.45 μm 여과지를 통해 여과한 후 0.1% trifluoroacetic acid 용액으로 평형화시킨 C18 칼럼에 주입하여 역상 HPLC로 분리하였다. 실험에 사용한 조건은 다음과 같다.

<Conditions of HPLC analysis>

- Mobile phase: 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in H₂O(A pump)
- Gradient: 0-100% acetonitrile with 0.1% TFA(B pump)
- Running time: 40 min
- Flow rate: 1 ml/min
- Fraction volume: 1 ml
- Injection volume: 50 μl
- Column temp.: RT
- Detection wavelength: 280 nm

<Column>

- ACE 5 C₁₈ column(particle size: 3 μm ; 4.6x150 mm)
-

나. 실험결과

분리된 젓산균 LAB KW5와 LAB KW15의 bacteriocin의 분리하기 위해 동결 건조된 배양 상등액을 HPLC를 통해 분리 정제하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 8과 같다. 배양 상등액을 동결 건조한 것을 HPLC를 이용해 분석한 결과 bacteriocin을 확인하지 못하였다. 젓산균이 생산하는 다양한 bacteriocin에 대한 연구는 오랜 시간 진행 중이며, *L. mesenteroides*의 경우 leucocin, *S. thermophilus*는 thermophilin 등으로 알려져 있다. 하지만 본 연구를 통해 분리된 젓산균들에 대한 bacteriocin의 분리, 정제를 못하였으므로, 보다 다양한 실험을 통해 분리, 정제가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다(Fig. 4-8).

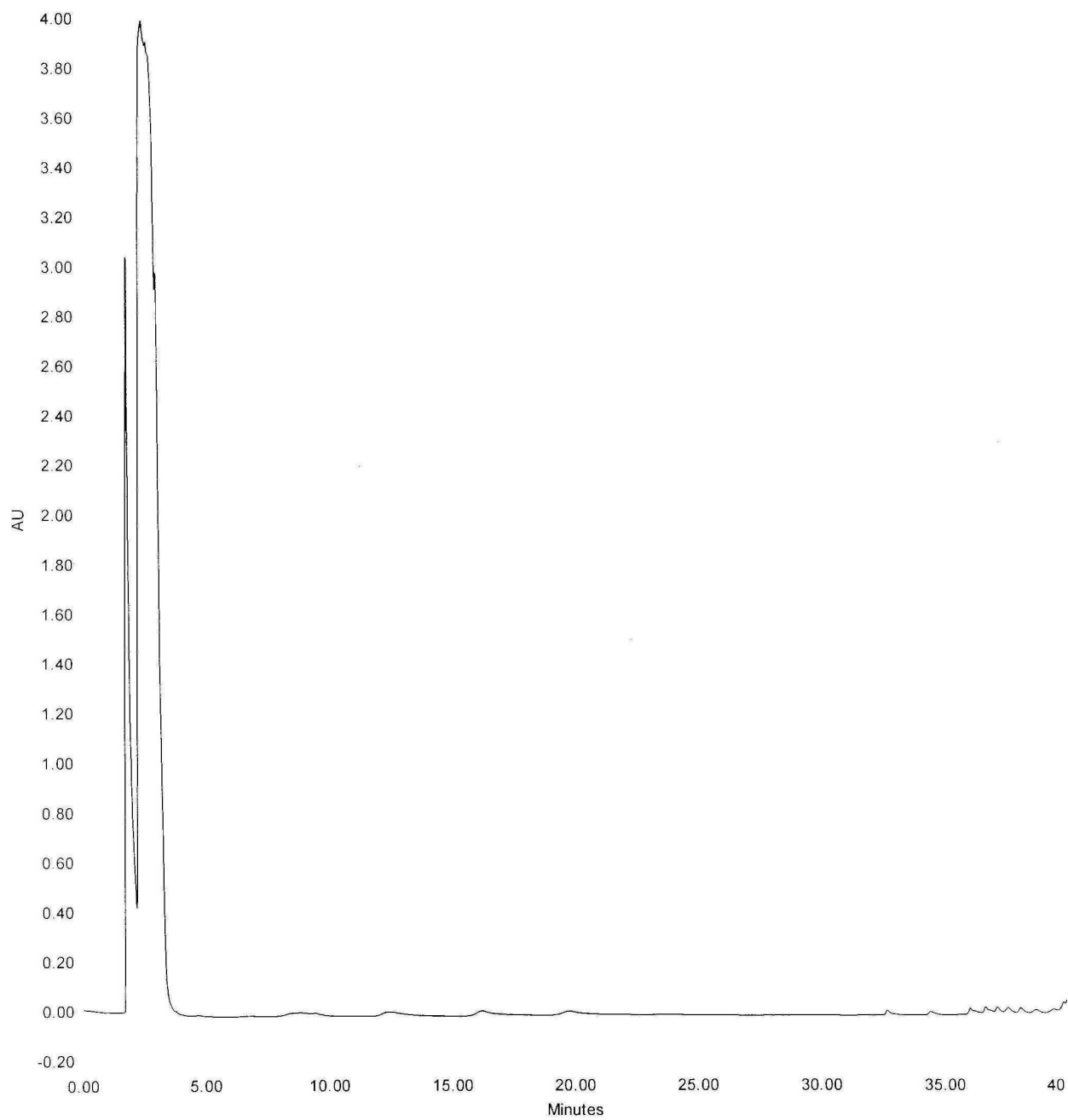


Fig. 4-8. Purification of bacteriocin like substance from lyophilized supernatant of LAB KW5 and LAB KW15 by HPLC

(6) 유산균의 항균물질 분리를 위한 동결 건조와 centricon을 이용한 단백질 분획과 항균 활성

가. 실험방법

(가) 유산균의 항균물질 동결건조

김치로부터 분리된 유산균 *Streptococcus thermophilus* LAB KW15(LAB KW15), *Leuconostoc mesenteroides* LAB KW5(LAB KW5)을 24시간 동안 Lactobacilli MRS broth에서 배양된 배양액을 원심분리(10,000 g, 5분)한 후 상등액을 취해 pH 7.0으로 보정한 후 0.2 um syringe filter를 이용하여 제균하였다. 동결건조기기에서 vac gauge 5, -70℃에서 72시간 동안 동결건조를 통해 농축하였다. 그리고 실험을 위해 동결 건조 분말을 100 mg/ml 농도로 만들어 사용하였다.

(나) Centricon을 이용한 단백질 분획과 항균 활성

동결 건조액을 9 K centricon에 넣고 원심분리한 후 filter 위에 있는 상등액을 취하여 다시 20 K centricon에 넣고 원심분리하였다. 30 K, 50 K, 100 K centricon도 이와 같이 원심분리하여 9 K이하, 9-20 K, 20-30 K, 30-50 K, 50-100 K, 100 K이상의 6가지로 분리하였다. 그리고 분리된 단백질 분획의 항균 활성 여부를 확인하였다. 10% FBS가 첨가된 brucella broth에서 48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella agar에 도말한 후 10 µl의 6가지 분리된 단백질 분획을 분주하였다. 그리고 37℃에서 미호기 상태에서 48시간 배양한 후 생육 억제를 확인하였다. 또한 다른 *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* 등의 식중독 세균에 대한 항균 활성에 대한 실험을 수행하였다.

나. 실험결과

젖산균 상등액의 동결건조액을 centricon을 통해 6가지로 분리하였다. 각 분리한 동결건조액 중에서 *H. pylori*에 대한 생육 저해하는 bacteriocin을 찾기 위해 *H. pylori*에 spot하였다. 그 결과 LAB KW 5은 9-20 K, 50-100 K, 100 K이상에서, LAB KW 15는 50 - 100 K, 100 K이상에서 *H. pylori*에 대한 생육 저해능이 확인되었다. 다른 식중독에서도 spot assay를 수행한 결과 그람음성균 중에서 특히 *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *C. sakazakii*, 등에서 생육 저해능이 확인되었고 특히 *E. coli* O157:H7, *E. coli*는 *H. pylori*와 흡사하게 나타났다. 또한 이와 비슷한 연구의 국내논문에 의하면 *H. pylori*에 저해하는 유산균 상등액이 *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O:157의 그람음성 식중독균을 제어된다고 하였다. 이는 *H. pylori*의 저해능 뿐만 아니라 다른 유해세균에 대해서 강한 항균활성을 보여 식품안전을 위해 사용될 수 있는 특성으로 기대된다(Table 4-4, Table 4-5).

Table 4-4. 단백질 분획의 *H. pylori*의 생육 억제 효과

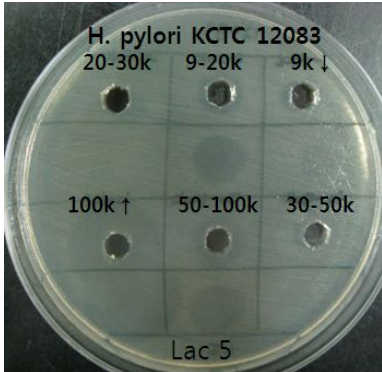
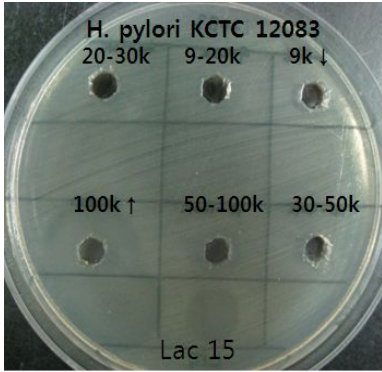
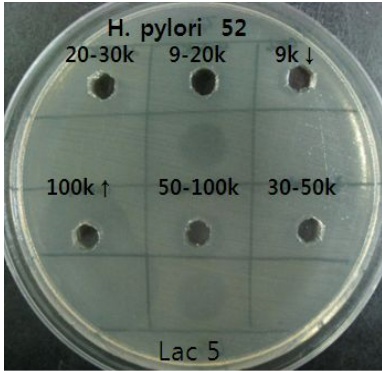
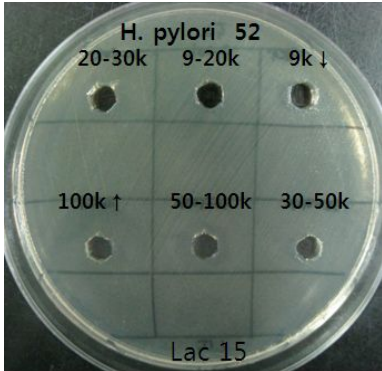
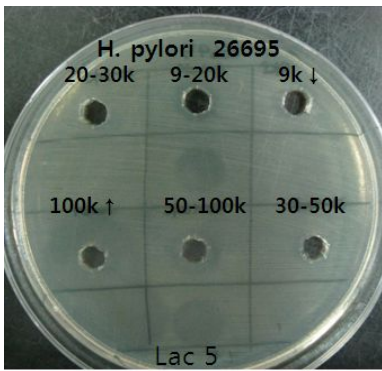
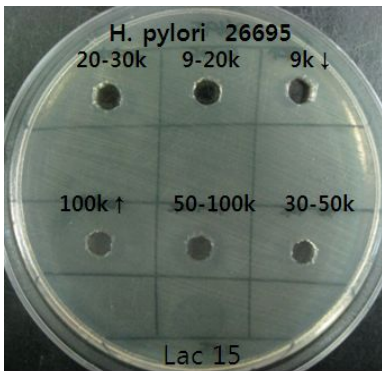
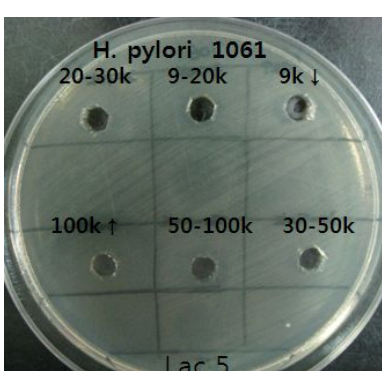
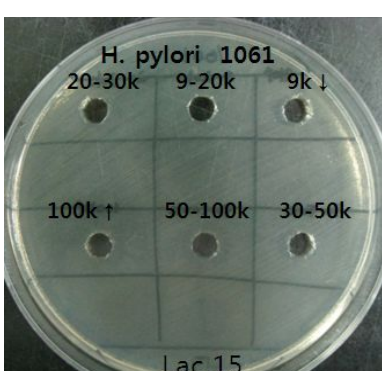
<i>H.pylori</i>	LAB	LAB KW5	LAB KW15
KCTC 12083			
52			
26695			
1061			

Table 4-5. 단백질 분획의 다른 식중독균의 생육 저해

		Protein size					
		< 9k	9-20 k	20-30 k	30-50 k	50-100 k	> 100 k
Bacteria							
<i>H.pylori</i> 12083	L5	-	++	-	-	++	+++
	L15	-	-	-	-	++	+++
<i>H.pylori</i> 52	L5	-	++	-	-	++	+++
	L15	-	-	-	-	++	+++
<i>H.pylori</i> 26695	L5	-	++	-	-	++	+++
	L15	-	-	-	-	++	+++
<i>H.pylori</i> 1061	L5	-	++	-	-	++	+++
	L15	-	-	-	-	++	+++
<i>E.coli</i> 27	L5	+	+	+	+	++	+++
	L15	-	-	-	+	++	+++
<i>E.coli</i> 28	L5	-	+	-	+	++	+++
	L15	-	-	-	+	++	+++
<i>E.coli</i> O157:H7 12079	L5	-	+	+	+	++	+++
	L15	-	-	-	-	++	+++
<i>E.coli</i> O157:H7 505B	L5	-	-	-	-	++	+++
	L15	-	-	-	+	++	+++
<i>E. sakazakii</i> 2949	L5	+	+	+	+	+	-
	L15	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> 1094	L5	-	-	-	-	-	+
	L15	-	-	-	-	-	+
<i>Y. enterocolitica</i> a 23715	L5	-	-	-	-	-	-
	L15	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 12103	L5	-	-	-	-	-	-
	L15	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> 2011	L5	-	-	-	-	-	-
	L15	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> 12118	L5	-	-	-	-	-	-
	L15	-	-	-	-	-	-

+ : 7~9 mm , ++: 10~13 mm , +++: 14~22 mm

(7) 생육 억제 농도 확인(Table 4-6, Table 4-7, Fig. 4-8, Fig. 4-9)

(가) 젖산균의 생육 억제 활성

동결건조액의 100 mg/ml 농도에서 멸균된 D.W로 2진 희석하여 spot한 결과 1.56 mg/ml 이후의 농도에서는 *H. pylori*에 대한 생육 억제능이 나타나지 않았다. 또한 LAB KW 5에서 9-20 K의 생육 억제 농도 350 µg/ml, 50-100 K의 생육 억제 농도는 1250 µg/ml, 100 K이상의 생육 저해 농도는 13.6 µg/ml으로 확인되었다. 9-20 K LAB KW 5에는 *H. pylori*를 최소로 저해할 수 있는 농도가 가장 약하고 다음은 50-100 K, 100 K이상의 순으로 점점 높았다. 특히, 100 K이상의 동결건조액이 최소의 농도로 *H. pylori* 저해능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

(나) IgY의 생육 억제 활성

IgY는 10% FBS가 첨가된 brucella broth 10 ml에서 0.5, 1, 5 mg/ml를 첨가하여 *H. pylori*에 대한 생육 억제 효과를 확인하였다. IgY의 생육 억제 농도는 1 mg/ml로 확인하였고 IgY의 첨가된 농도가 높아질수록 OD값이 감소하는 것으로 보아 유산균 상등액과 더불어 *H. pylori*의 생육억제에도 효과가 있는 것으로 판단되었다.

(다) 목이버섯 추출물의 생육 억제 활성

목이버섯은 10% FBS가 첨가된 brucella broth 10 ml에서 0.5, 1, 5, 10 mg/ml를 첨가하였지만 최소 저해점을 찾지 못하였다. 이는 목이버섯 단독으로 *H. pylori*에 대한 생육 저해에 효과가 없는 것으로 나타났다. 목이버섯을 이용한 *H. pylori*에 대한 저해 효과를 비교한 다른 연구 결과에서도 이와 유사한 결과를 나타내고 있었다.

Table 4-6 . 동결건조액의 *H. pylori* KCTC 12083 의 생육 제어 농도


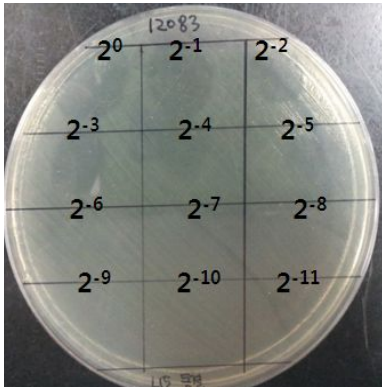
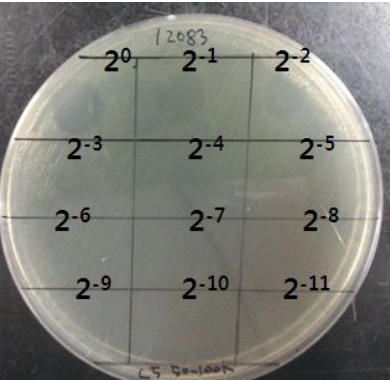
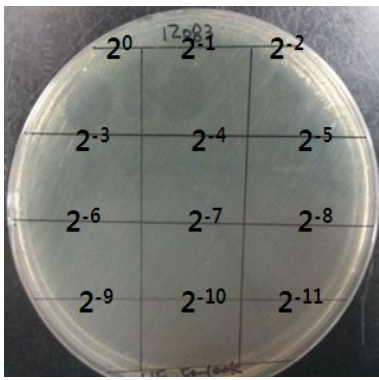
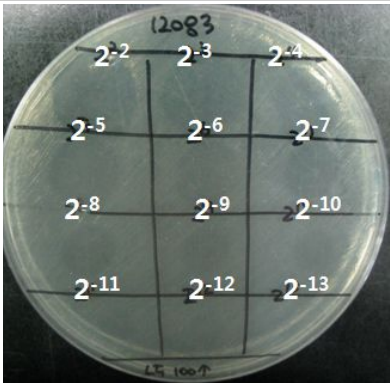
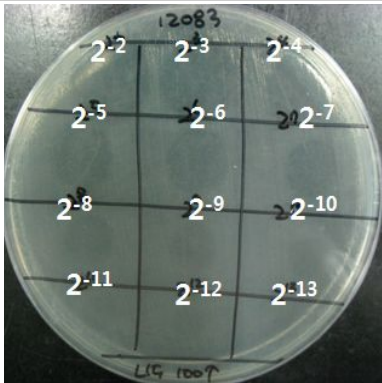
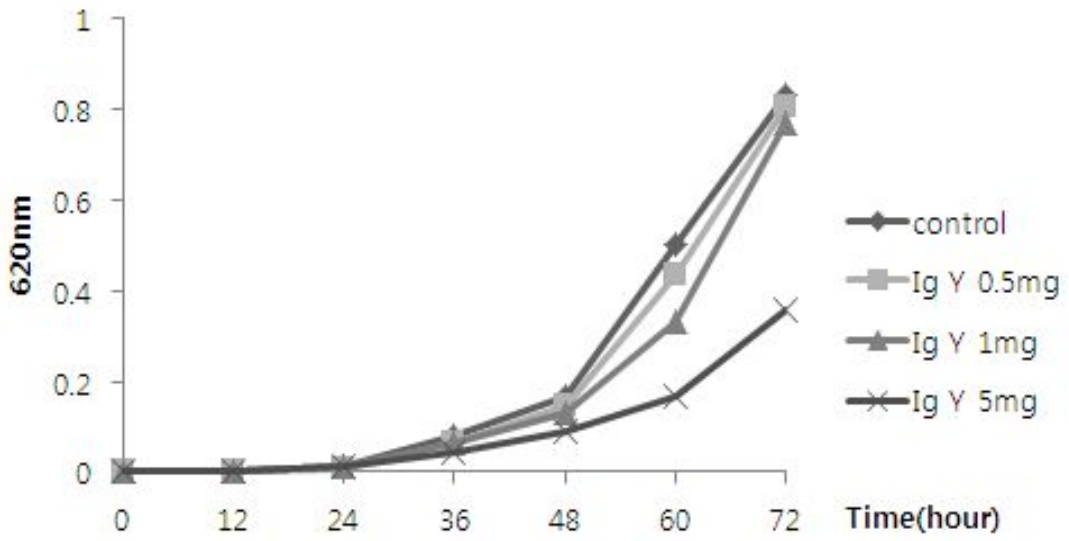
	Lab KW5	Lab KW15
동결건조		
50-100 K		
100 K~		

Table 4-7. 동결건조액이 *H. pylori* 의 생육 제어

<i>H. pylori</i>	LAB	LAB 5	LAB 15	LAB 5	LAB 5	LAB 5	LAB 15	LAB 15
		동결건조	동결건조	9-20 k	50-100 k	100 k~	50-100 k	100 k~
KCTC 12083		1.56 mg/ml	1.56 mg/ml	350 μ g/ml	1250 μ g/ml	13.6 μ g/ml	1250 μ g/ml	13.6 μ g/ml
52		1.56 mg/ml	1.56 mg/ml	350 μ g/ml	1250 μ g/ml	13.6 μ g/ml	1250 μ g/ml	13.6 μ g/ml

Ig Y 최소농도: *H. pylori* KCTC 12083



목이버섯 최소농도: *H. pylori* KCTC 12083

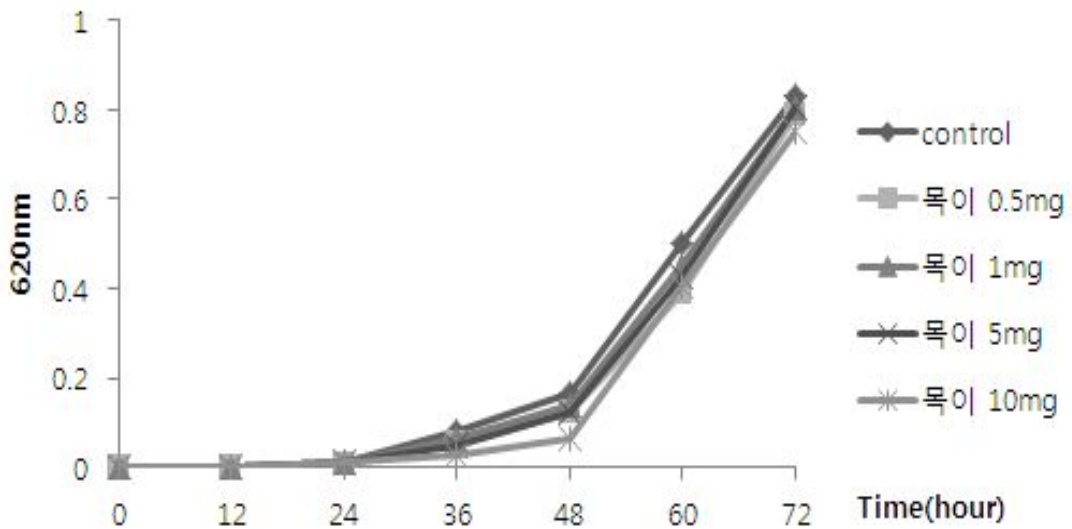
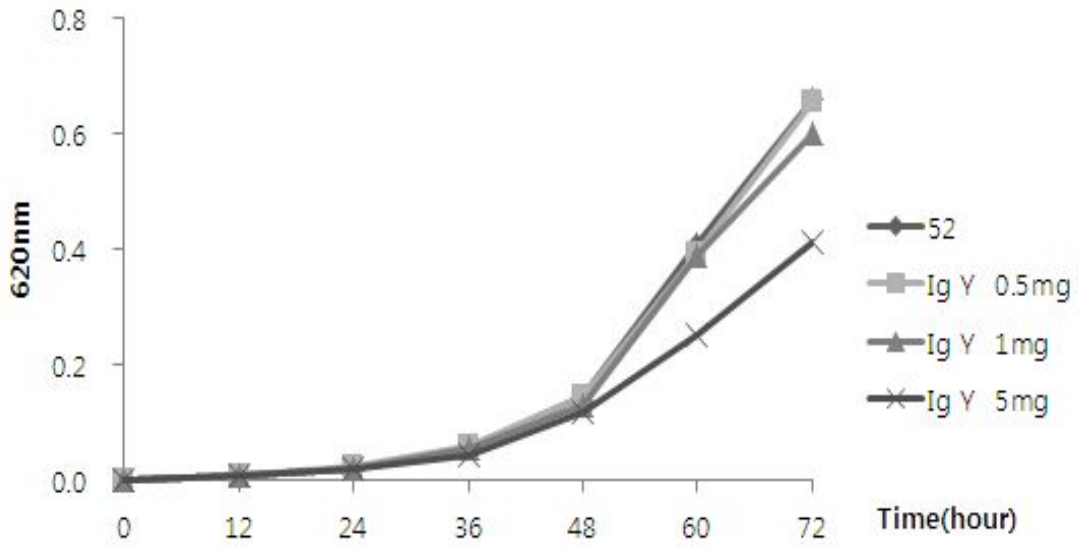


Fig. 4-8. 목이버섯, IgY의 *H. pylori* 생육제어

Ig Y 최소농도: *H. pylori* 52



목이버섯 최소농도: *H. pylori* 52

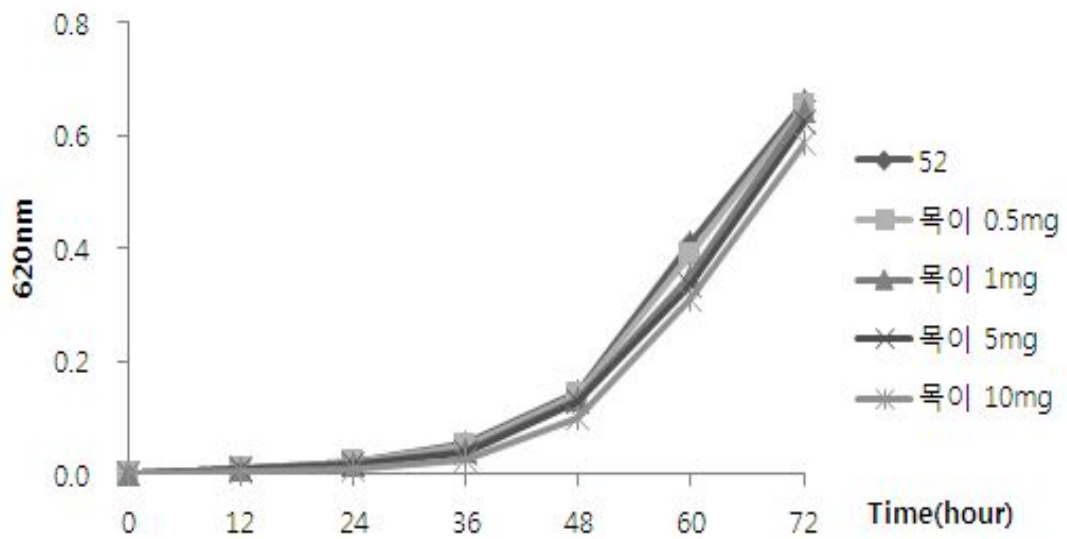


Fig. 4-9. 목이버섯, Ig Y의 *H. pylori* 생육제어

(8) 항균 단백질의 부분 정제

가. 재료 및 방법

항균 활성이 가장 높은 것으로 확인된 단백질 분획을 이온교환 column을 이용하여 부분 정제를 시도하였으며, 용출을 위해 NaCl gradient를 0-1 M의 농도로 순차적으로 분리하였다. 그리고 SDS-PAGE와 zymogram를 통해 확인하고자 하였다.

나. 실험결과

분리된 LAB KW5와 LAB KW15로부터 centricon을 이용한 단백질 분획 중 항균 활성이 가장 우수한 100 kD 이상의 단백질 분획을 이용하여 이온 교환 column을 이용하여 NaCl gradient를 통한 추출물을 SDS-PAGE와 zymogram을 통해 확인한 결과, 분리가 잘 되지 않은 것으로 확인되었다. 이는 기존에 bacteriocin의 분리를 위해 HPLC를 수행했을 때 분자량이 큰 bacteriocin일 것으로 예측했으며, centricon을 이용한 분자량에 따른 단백질 분획물의 경우에서도 100kD 이상의 분획에서 가장 큰 활성을 나타내고 있었다. 하지만 이온 크로마토그래피를 이용한 부분 정제에서도 항균 물질을 분리되지 않은 것은 큰 분자량으로 인해 단백질이 불안정한 상태이거나 이온 크로마토그래피를 통한 분리 방법이 비효과적일 가능성이 있으며, 혹은 단백질이 아닌 지질, 탄수화물 또는 이들의 복합체일 가능성이 있는 것으로 판단된다. 따라서 다양한 효소 처리를 통해 LAB KW5와 LAB KW15의 단백질 분획과 동결 건조액에 대한 특성을 확인하였다.

(9) 항균 물질의 효소 처리

가. 재료 및 방법

● 효소

Amylase, protease, trypsin, chymotrypsin, lipase, viscozyme(carbohydrate hydrolase), BAN(carbohydrate hydrolase), pectin(carbohydrate hydrolase)의 효소 처리를 통한 항균 물질의 특성을 확인하고자 하였다.

● 효소 처리 조건

각각의 효소 용액을 넣고 37°C, 3시간 동안 효소를 반응시킨 후 70°C, 15분 동안 열처리를 하였다. Control은 효소 대신에 멸균된 D.W를 첨가하였다.

● 생육 억제 활성

48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella agar에 도말한 후 효소 처리한 용액을 spot assay를 통해 확인하였다.

나. 실험결과

다양한 proteolytic enzyme, lipidase, carbohydrate hydrolase 효소 처리하여 *H. pylori*에 생육을 저해하는 항균 물질에 대한 특성을 확인하였다. Lipase이외에 단백질 분해 효소인 Protease, Trypsin, Chymotrysin, 탄수화물 분해 효소인 Amylase, viscozyme, BAN, Pectin을 처리한 동결건조액은 *H. pylori*의 생육억제능이 확인이 되어 당, 단백질 등의 물질과 다르다는 것을 알 수 있었다. 반면, Lipase에 처리된 동결건조액에서는 생육 억제능이 보이지 않았다. *H. pylori*에 생육을 저해하는 동결건조액의 물질이 지질의 형태인 것을 알 수 있었다(Fig. 4-10, Table 4-8).

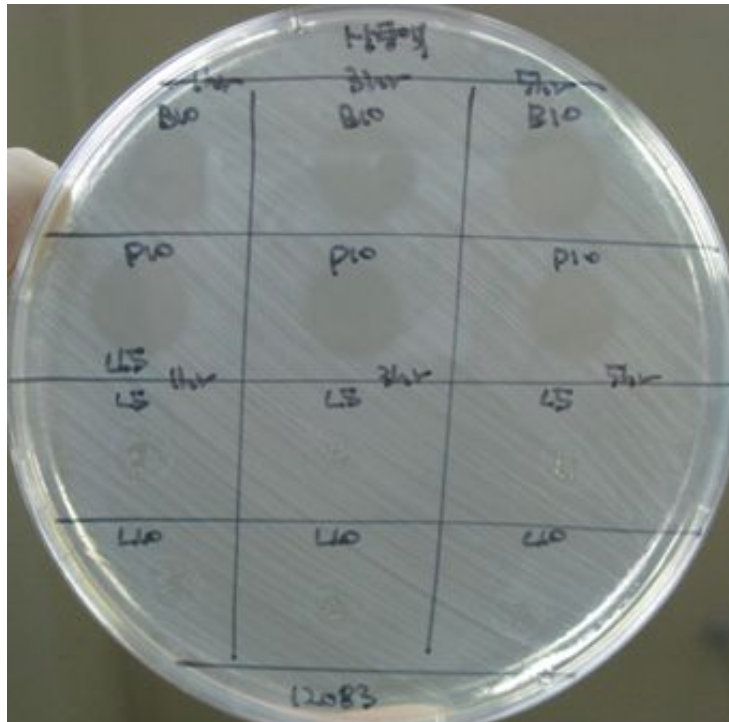


Fig. 4-10. 효소 처리한 유산균 상등액을 *H. pylori* KCTC 12083에 대한 효과

Table 4-8. 효소 처리한 항균 물질의 *H. pylori* KCTC 12083에 대한 효과

	<i>H. pylori</i> KCTC 12083					
	Lipase 5 mg	Lipase 10 mg	Lipase 20 mg	viscozyme	BAN	Pectin
No treatment	O	O	O	O	O	O
1 hour	-	-	-	O	O	O
3 hour	-	-	-	O	O	O
5 hour	-	-	-	O	O	O

	<i>H. pylori</i> KCTC 12083			
	Amylase 10 mg	Protease 10 mg	Trypsin 10 mg	Chymotrysin 10 mg
No treatment	O	O	O	O
1 hour	O	O	O	O
3 hour	O	O	O	O
5 hour	O	O	O	O

(10) 항균 물질의 지방산 조성 분석

가. 재료 및 방법

분리된 항균 물질에 대해 포화 지방산과 불포화 지방산의 조성을 확인하기 위해 GC 분석을 통해 수행하였으며, GC 분석을 위한 조건은 다음과 같다.

Instrument	Agilent 7890 GC system
Detector	FID
Column	SPTM-2560(100m × 0.25mm × 0.20 μ m)
Injection temp.	225 $^{\circ}$ C
Detector temp	285 $^{\circ}$ C
Oven temp.	100 $^{\circ}$ C(4min), 100 $^{\circ}$ C(3 $^{\circ}$ C/min), 240 $^{\circ}$ C(15min)
Carrier gas	He
Column flow	0.75ml/min
split ratio	200:1
Injection Vol.	1.0 μ l

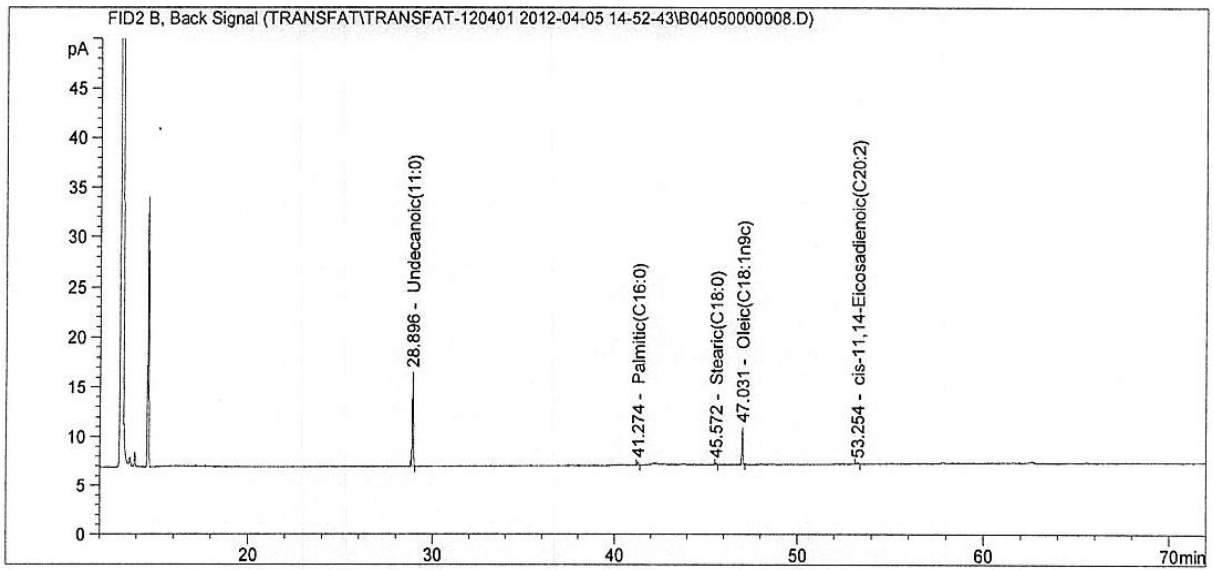
나. 실험결과

동결 건조된 유산균 상등액과 단백질 분획에 대해 포화 지방산과 불포화 지방산의 조성을 확인하기 위해 GC 분석을 통해 수행한 결과는 Fig. 4-11, 4-12와 같다. 동결 건조된 유산균 상등액의 지방산 조성은 undecanoic acid(C11:0), palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1)가 LAB KW5와 LAB KW15에서 모두 확인되었으며, eicosadienoic acid(C20:2)는 LAB KW5에서만 나타났다. 최근 다양한 유리지방산에 Gram (-), Gram (+) 세균에 대한 생육 억제, 항곰팡이, 항바이러스 등 다양한 미생물에 대하여 생육 억제의 효과가 보고되고 있으며, 소수성 부분의 길이가 늘어남에 따라 높아지는 것으로 알려져 있다. 현재 유리지방산의 항 미

생물 효과에 대한 명확한 기작이 알려져 있지는 않지만, 지금까지 보고에서는 미생물의 electron transport chain의 파괴, 영양분 흡수 저해, 효소 활성 억제, 세포내 지방산 합성 저해, autolysis 유발, 대사산물의 유출, 산화적 인산화의 간섭 등에 의한 것인 것으로 알려져 있다. 그리고 보고된 Gram (-) 세균에 대한 유리지방산들은 C10:0, C12:0, C14:0, C16:1 C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:4, C20:4, C20:5, C22:0, C22:4, C22:5 등이 알려져 있으며, 다른 Gram (+) 세균에도 효과적인 것으로 보고되 있다. 단백질을 분자량에 따라 분리, 농축하는데 많이 사용되는 centricon이 많이 사용되고 있다. Centricon 만을 사용하여 순수한 단백질만을 분리하는 것은 사실상 어려움이 있으며, 분리하고자 하는 시료에 지질, 탄수화물의 제거를 위한 처리를 하지 않으면 완벽하게 제거가 안된다. 따라서 centricon을 이용해 분리한 100 kD 이상의 단백질 분획에도 유리지방산이 포함되어 있는 것으로 보여지며, 남아 있는 유리지방산에 의해 *H. pylori*가 생육 억제가 된 것으로 판단된다.

본 연구에서 확인된 유산균 상등액에 존재하는 유리 지방산에 의한 *H. pylori*의 생육 억제에 대한 연구 결과는 첫 보고이며, 추후에 보완 연구를 통해 보다 높은 학술적 가치를 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 상업적으로도 우수한 결과를 나타낼 것으로 판단된다.

(A)



(B)

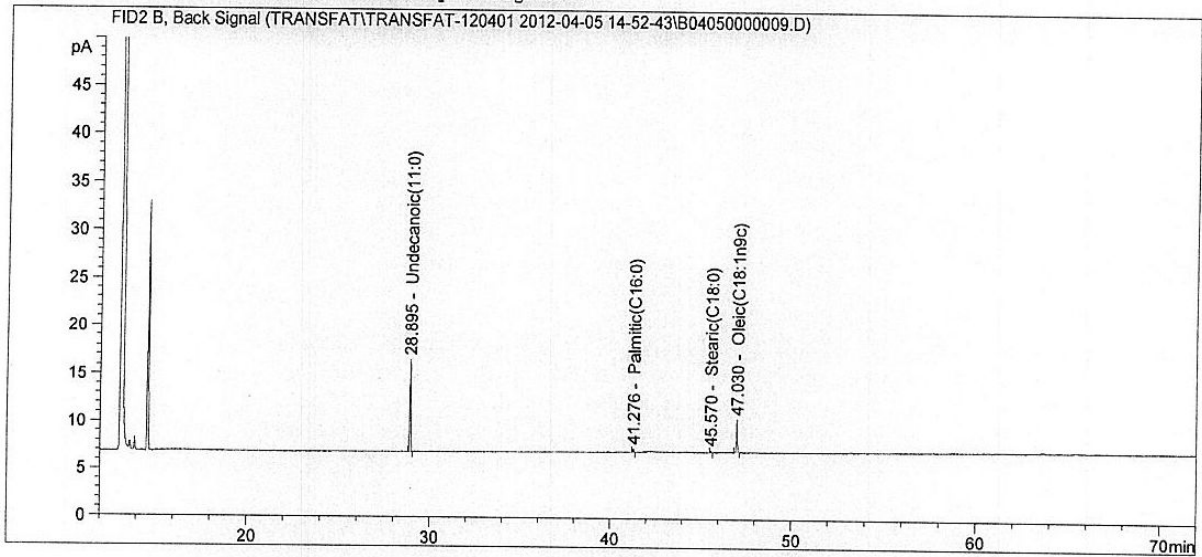
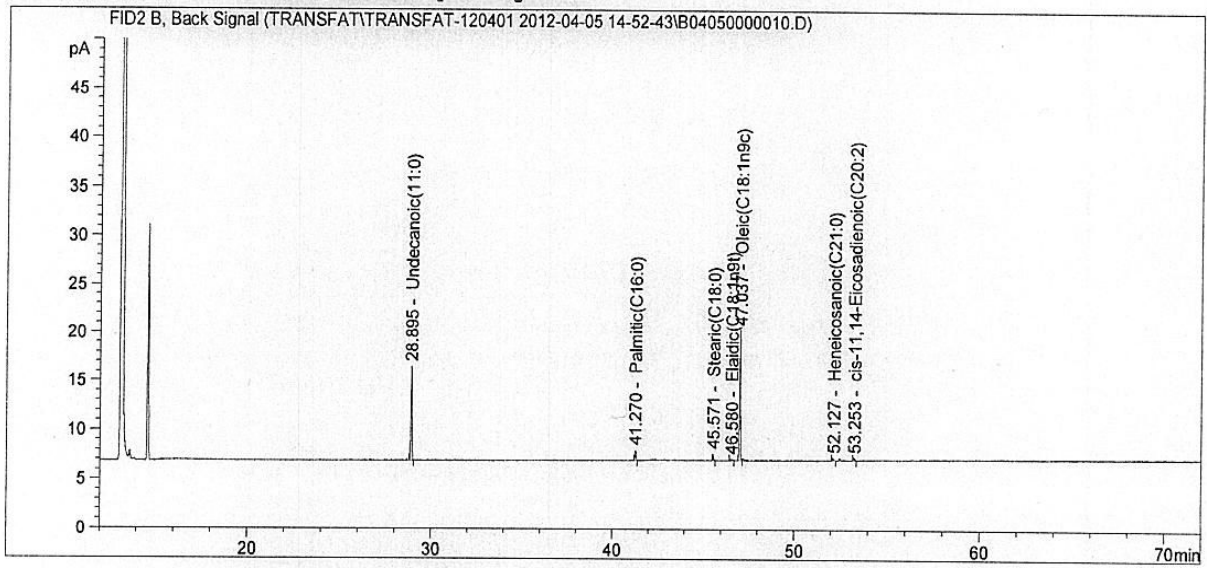


Fig. 4-11. 유산균 상등액의 지방산 조성 분석.

(A) LAB KW5, (B) LAB KW15

(A)



(B)

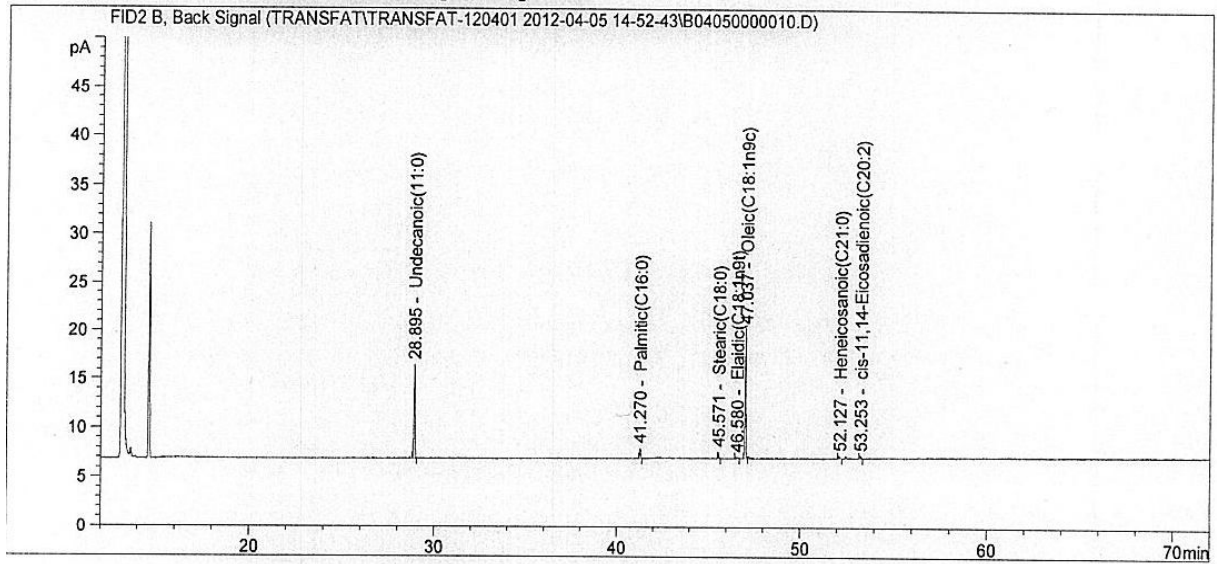


Fig. 4-12. 100 kD 이상 단백질 분획에 대한 지방산 조성 분석.

(A) LAB KW5, (B) LAB KW15

3. 난황항체, 유산균, 목이버섯 추출물 복합체 synergy 효능 확인

(1) 혼합액에 의한 *H. pylori* 생육 억제 synergy 효과

가. 재료 및 방법

● 흡광도 측정

목이버섯과 IgY, 유산균 상등액들을 혼합하여 *H. pylori*에 대한 synergy 효과를 확인하고자 하였다. 최소 효능점으로 *H. pylori*의 생육제어를 위해 목이버섯 최종농도 1 mg/ml, IgY 최종농도 0.1 mg/ml으로 설정하고 동결건조액 최종농도 1.56 mg/ml, 0.78 mg/ml, 0.39 mg/ml와 100 K이상 동결 건조액 최종 농도 13.6 µg/ml, 6.8 µg/ml, 3.4 µg/ml을 조합한 후 96 well microplate에 200 µl 씩 분주하였다. CO₂ incubator에 넣고 72시간까지 OD값을 측정 후 조합이 다른 실험군과 값을 비교하여 생육억제 synergy를 알아보았다.

● Spot assay를 통한 확인

48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella agar에 도말한 후 동결 건조액, 목이버섯, IgY를 하나씩 분주, 두 가지를 혼합액으로 만든 후 분주, 세 가지를 혼합액으로 만든 후 분주하여 spot의 억제환 생성 유무를 확인 후 억제환의 크기를 관찰하여 생육억제 synergy를 알아보았다.

● 배지에 혼합액 처리에 따른 효과

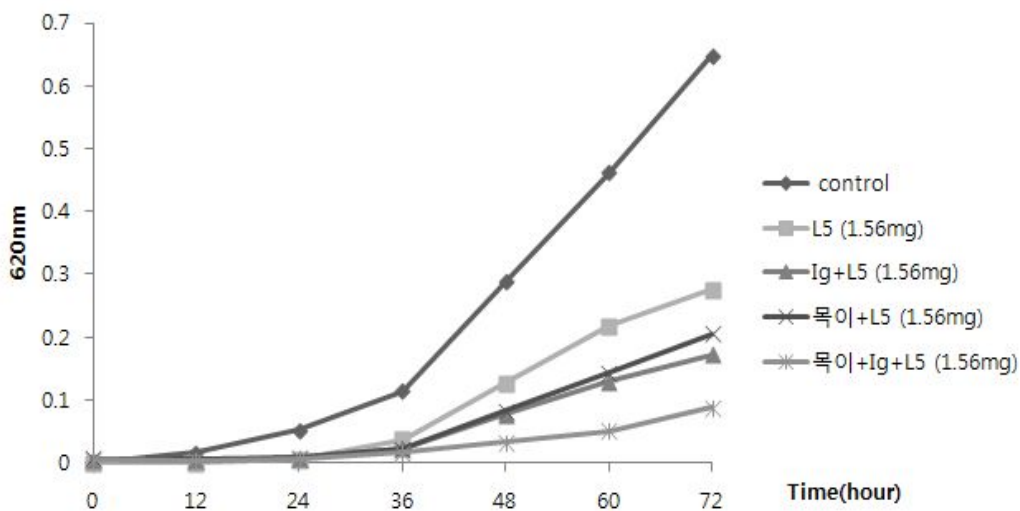
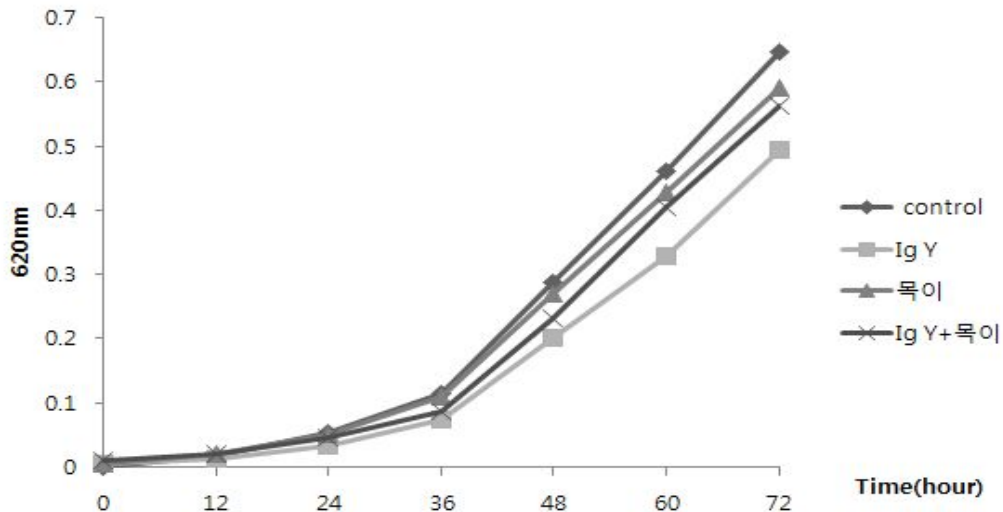
Petri dish에 동결건조액(3.12 mg/ml, 1.56 mg/ml, 0.78 mg/ml), 목이버섯, IgY를 하나씩 분주, 두 가지를 혼합액으로 만든 후 분주, 세 가지를 혼합액으로 만든 후 분주하였다. 20 ml의 10% FBS가 첨가된 brucella agar를 petri dish에 넣고 혼합액과 충분히 섞으면서 배지를 만들었다. 배지를 굳힌 후 48시간 배양된 *H. pylori*를 10³ CFU/ml로 희석하여 각 배지에 균일하게 도말하였다. CO₂ incubator에서 37°C, 48시간 동안 배양한 후 꺼내서 colony의 수를 확인하여 생육억제 synergy를 알아보았다.

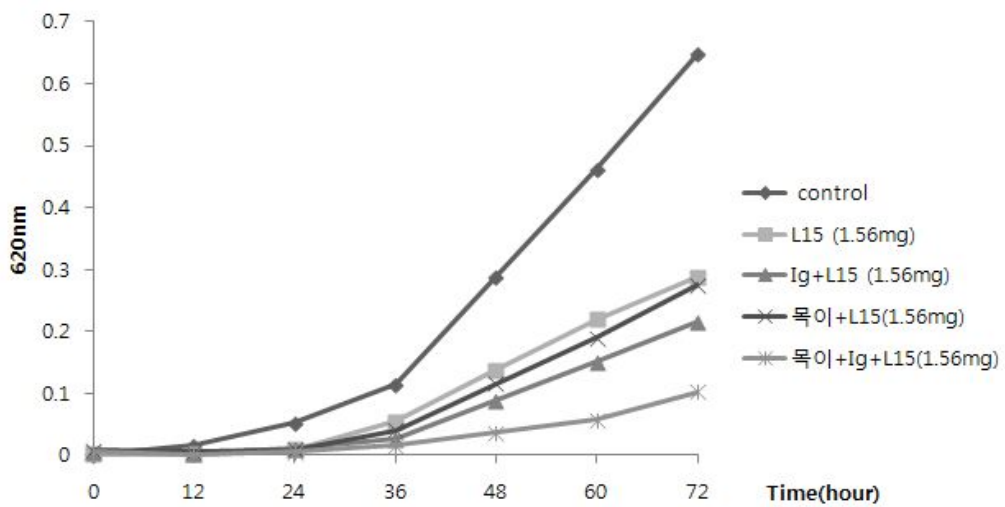
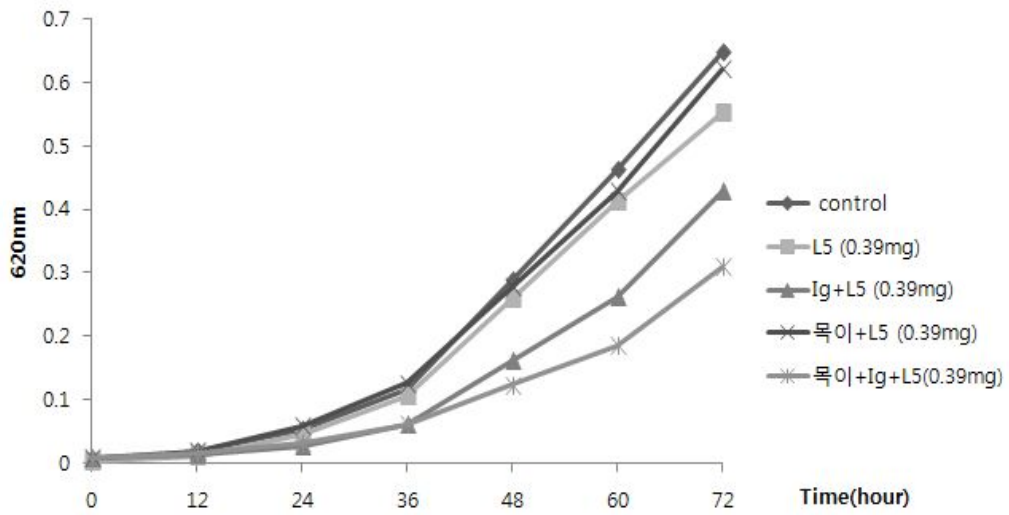
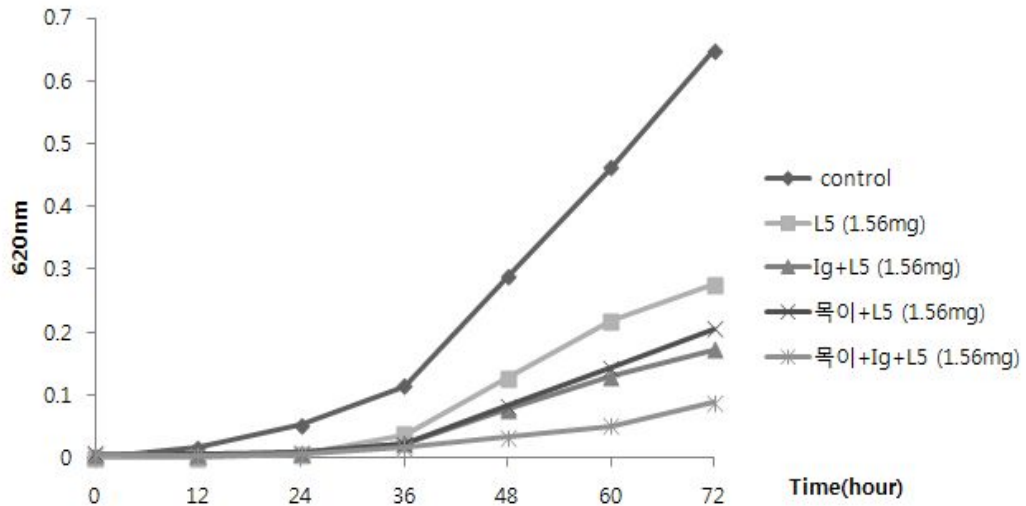
나. 실험결과

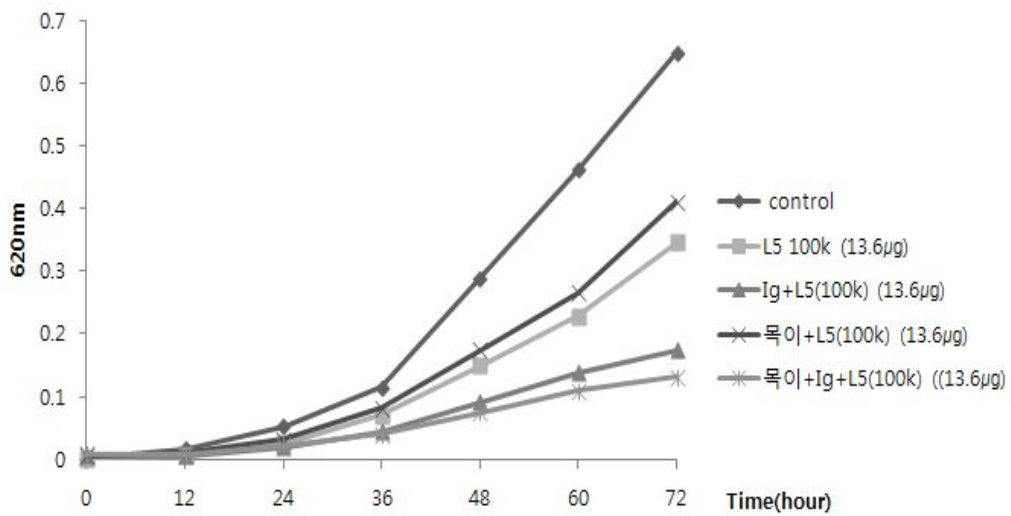
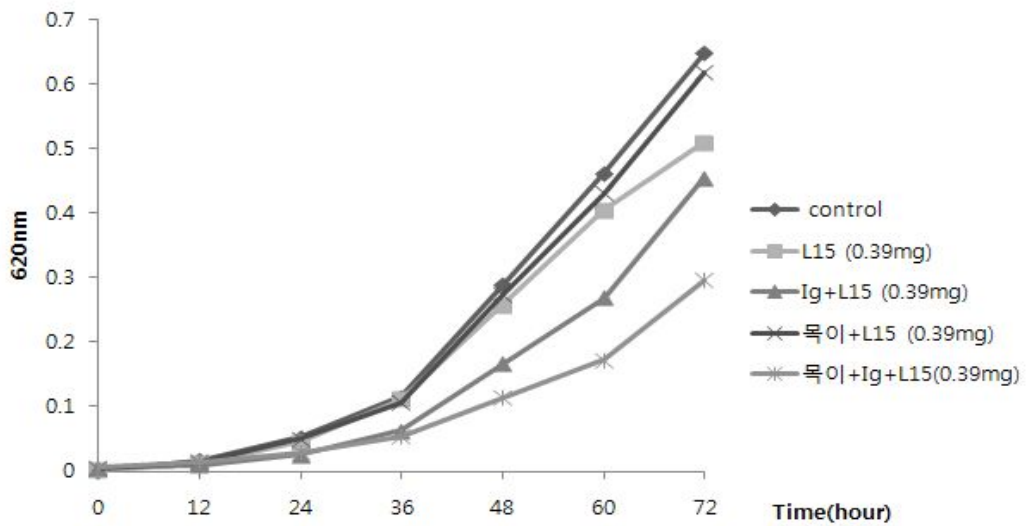
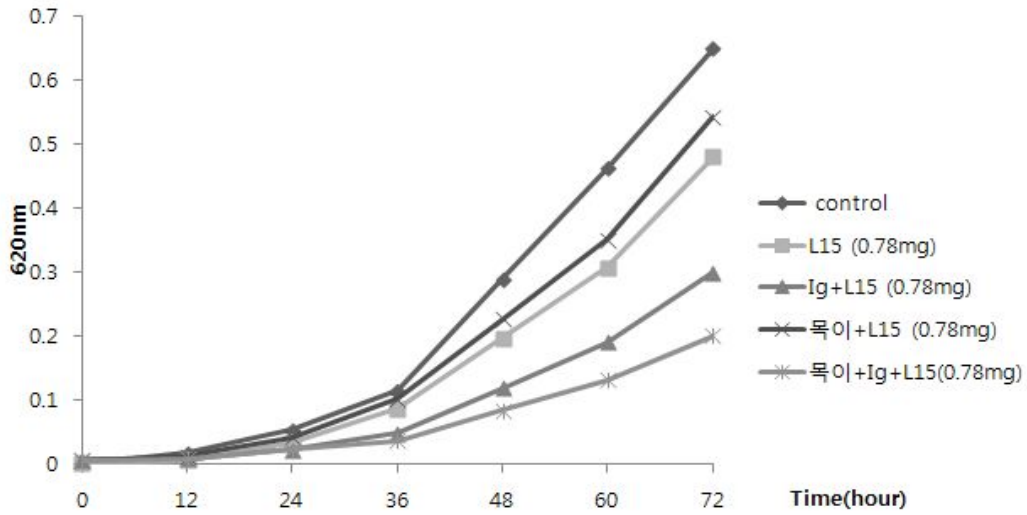
● 흡광도 측정

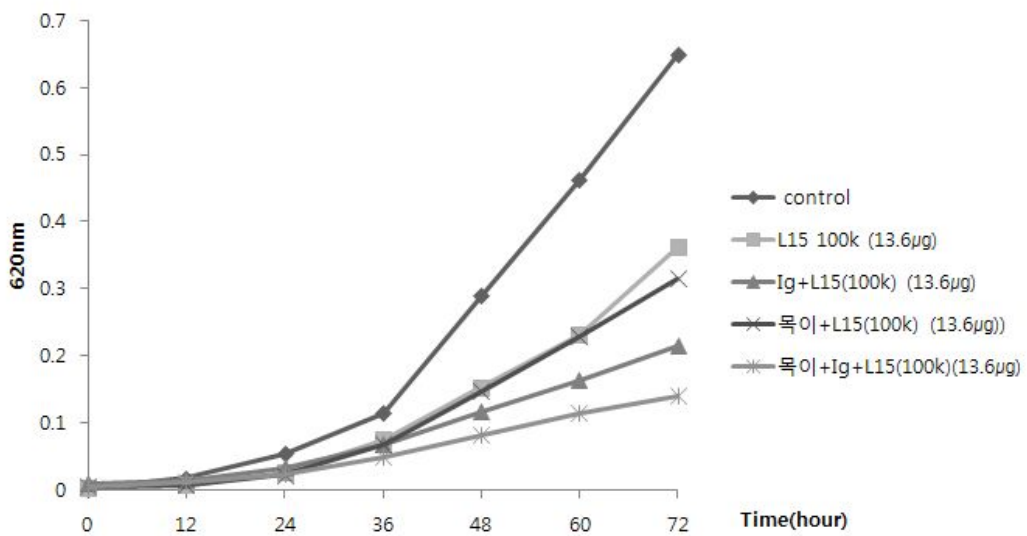
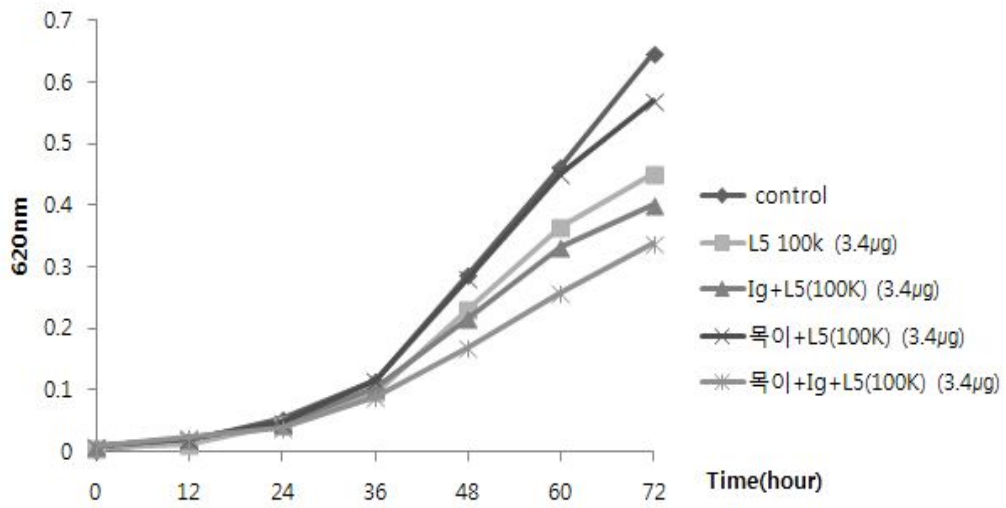
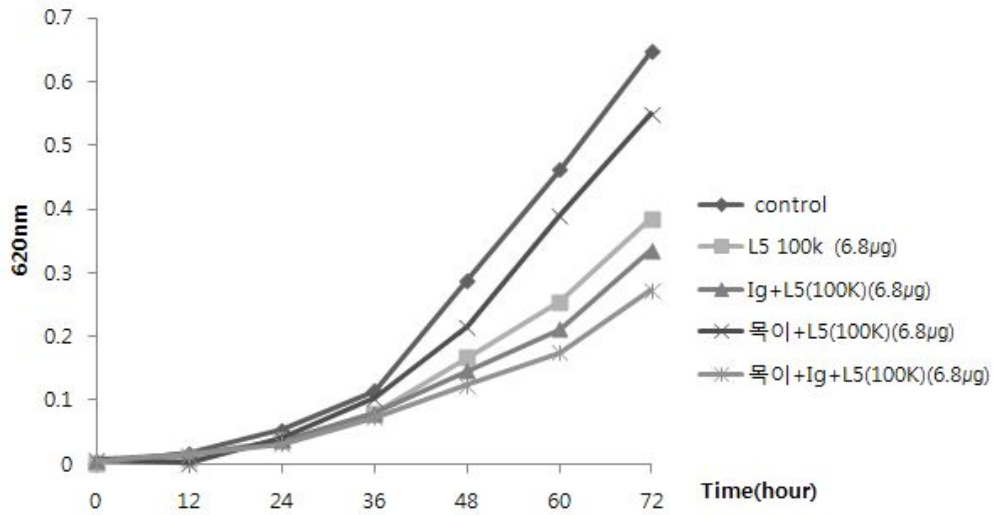
유산균상등액을 제외한 IgY를 단독으로 첨가한 경우 23.6%의 *H. pylori* 생육 저해율이 보이는 반면, 목이버섯, IgY + 목이버섯에는 *H. pylori*의 생육저해가 효과적이지 못하였다. 최소 효능점인 동결건조액 1.56 mg/ml에서 LAB KW5과 LAB KW15의 단독 처리는 각각 57.4%, 55.5%이고, IgY + LAB 첨가한 경우 73.3%, 66.8%, 목이버섯 + LAB 첨가한 경우 68.2%, 57.4%, IgY + 목이버섯+ LAB 첨가한 경우 각각 86.3%, 84.1%의 생육 저해율이 나타났다. 그 외에도 단일물질로 처리할 때 보다 2가지의 복합물질이 더 효과가 높고 2가지의 복합물질보다는 3가지의 복합물질이 훨씬 효과가 높게 나타났다. 그러므로 3가지인 IgY + 목이버섯 + LAB 첨가하였을 때 *H. pylori* 생육 저해에 탁월한 synergy 효과를 보여주었다. 외국 논문에서 Serum

albumin의 면역에 의해 난황에 유도된 항체(IgY)을 이용하여 IgY는 타겟이 되는 특정 *Campylobacter jejuni*의 생육을 감소한다고 하였다. 또한 국내연구에서 비교적 낮은 농도의 난황 항체(0.5 mg/ml)에서도 균체의 경우 90% 가량이 그리고 외막 단백질의 경우 60%가량의 *H. pylori*가 부착 억제되었다고 보고하였다. 따라서 유산균 상등액과 IgY와 혼합하였을 때 synergy효과가 나타났으며 *H. pylori*의 예방에 효과적을 대체할 수 있다고 판단된다.









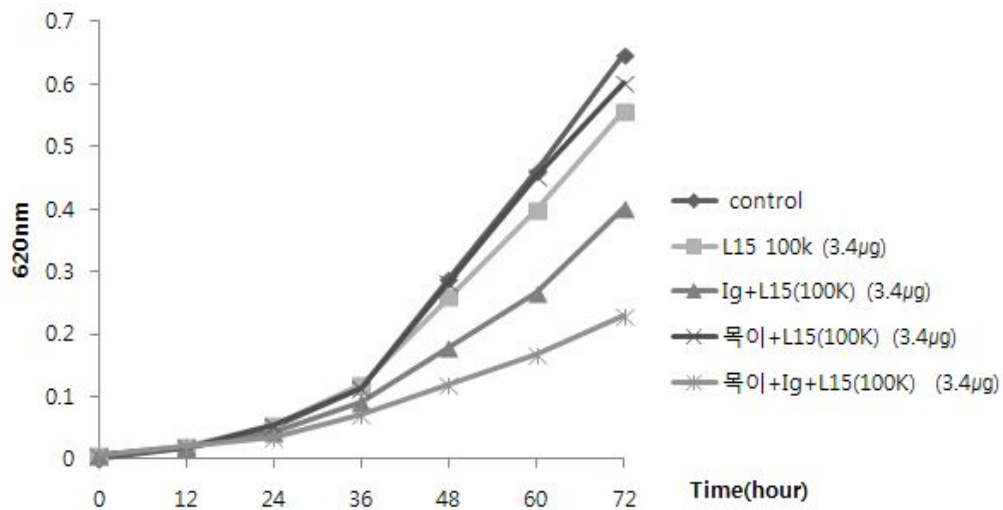
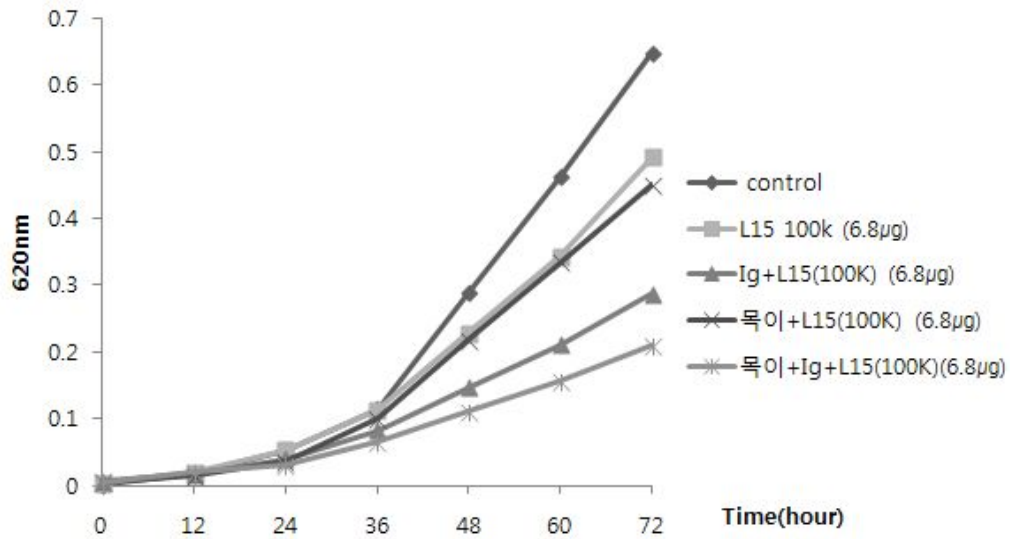


Fig. 4-13. 혼합 처리에 따른 *H. pylori* KCTC 12083생육 억제 synergy 효과

● Spot assay를 통한 확인

최소 효능점 1.56 mg/ml의 LAB KW5, 15에는 유산균 상등액을 단독으로 분주한 것과 IgY + LAB, 목이버섯 + LAB, IgY + 목이버섯 + LAB 혼합하여 분주한 것이 동일하게 *H. pylori* 억제능이 나타났고 환의 크기도 같았다. 0.78 mg/ml의 LAB KW5, 15에는 유산균 상등액을 단독으로 분주하였을 때 환의 모습은 보이나 흐릿하여 *H. pylori*의 생육억제 효과가 없는 것으로 판단된다. 반면, 세 가지 물질 IgY + 목이버섯 + LAB을 혼합하여 분주하였을 경우, 억제환이 투명하게 나타나 유산균 상등액을 단독으로 분주한 것보다 *H. pylori*의 생육억제가 더 효과가 높은 것으로 판단된다(Table 4-9, Table 4-10).

Table 4-9. 혼합 처리에 따른 *H. pylori* KCTC 12083 생육 억제 synergy 효과

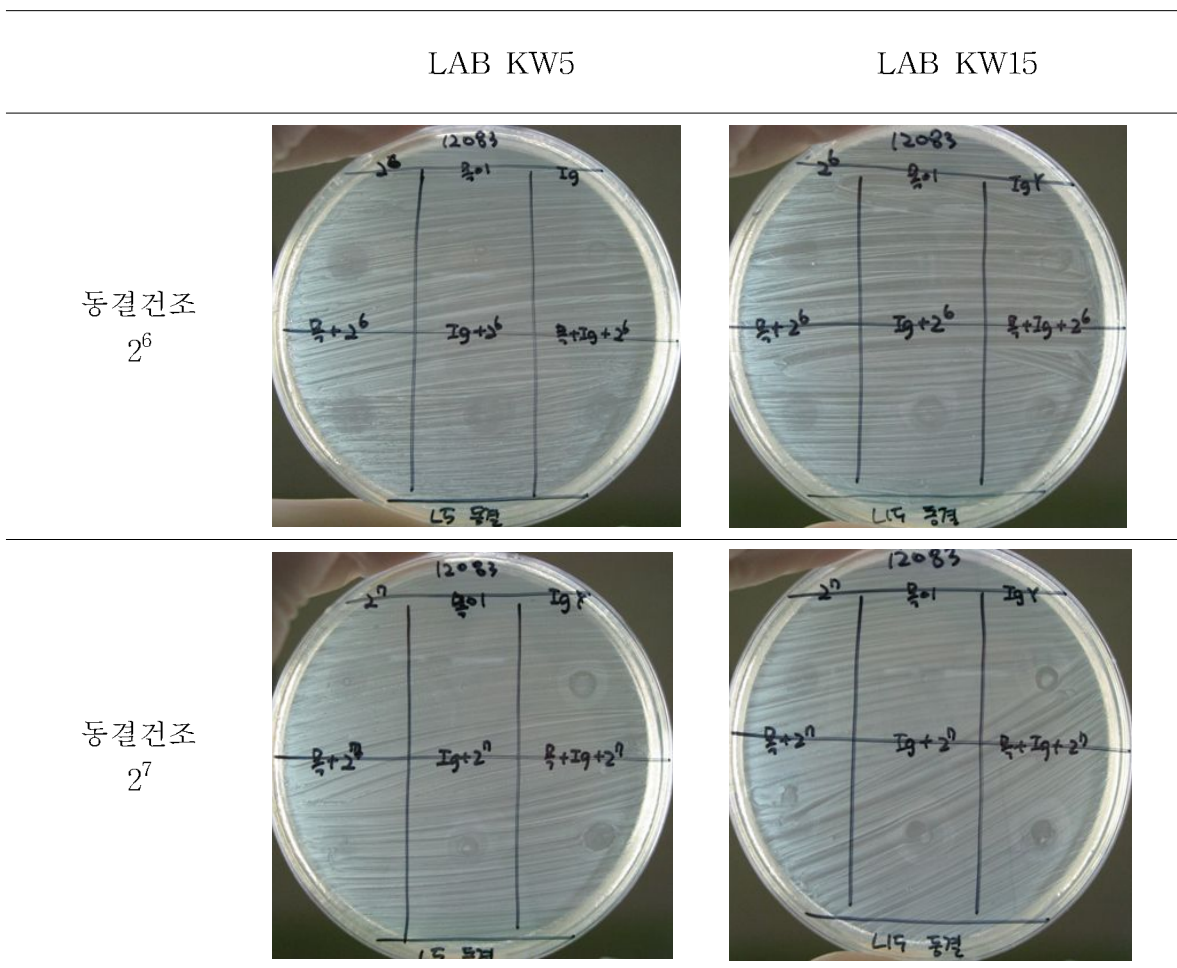
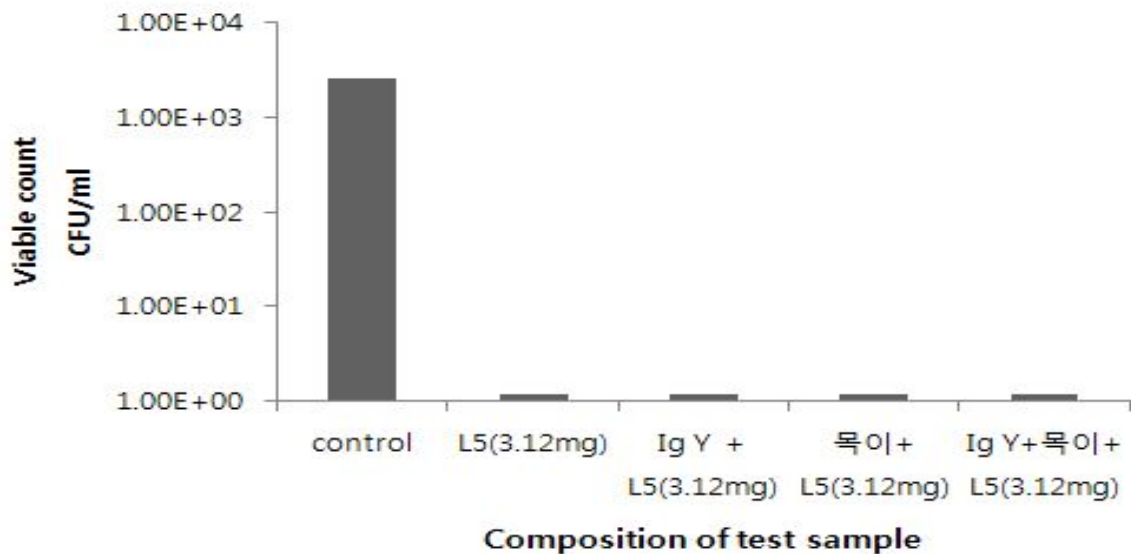
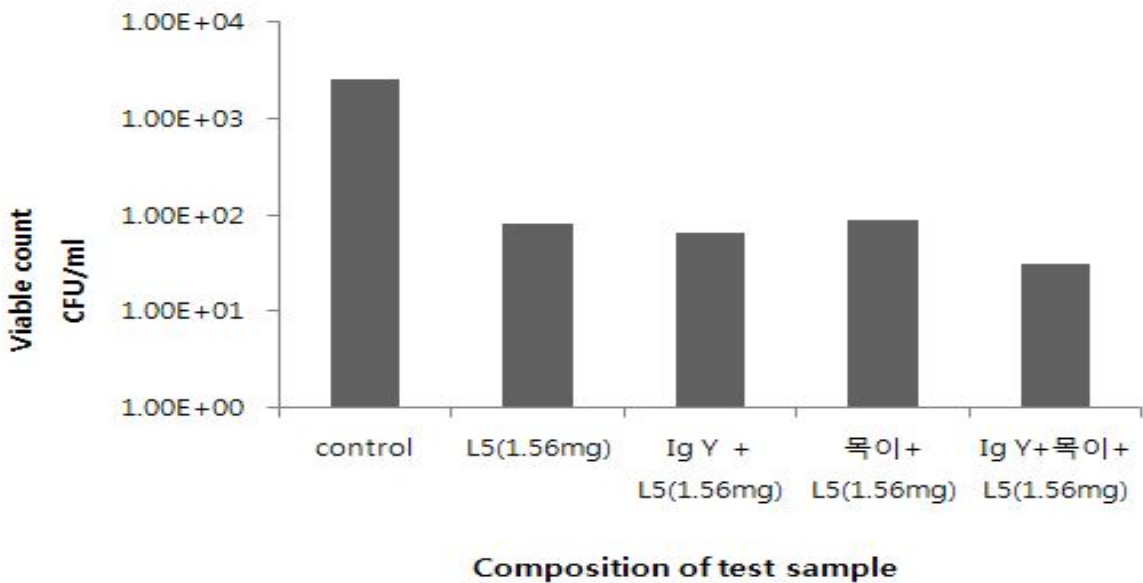


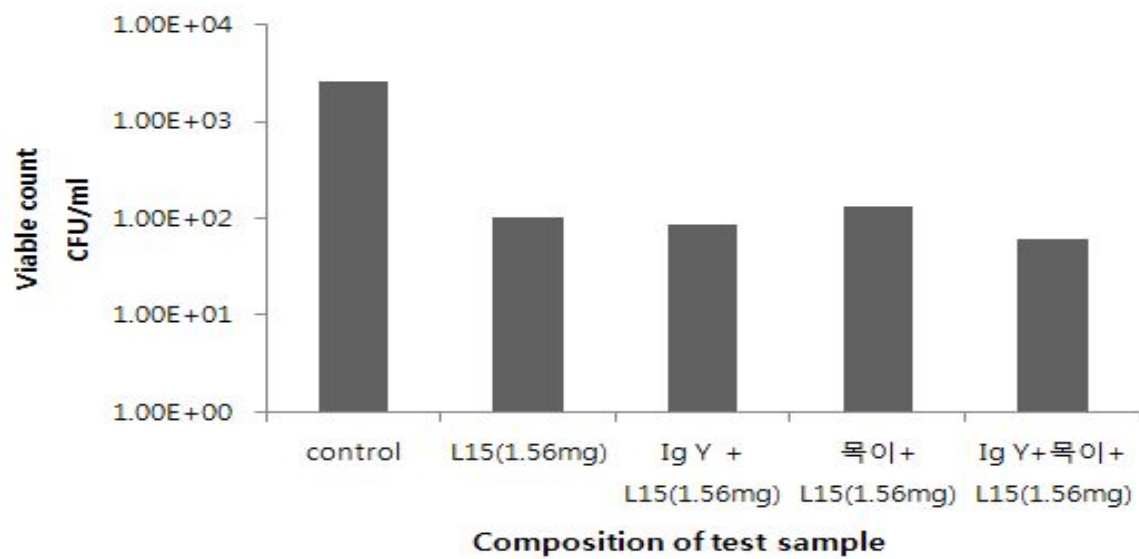
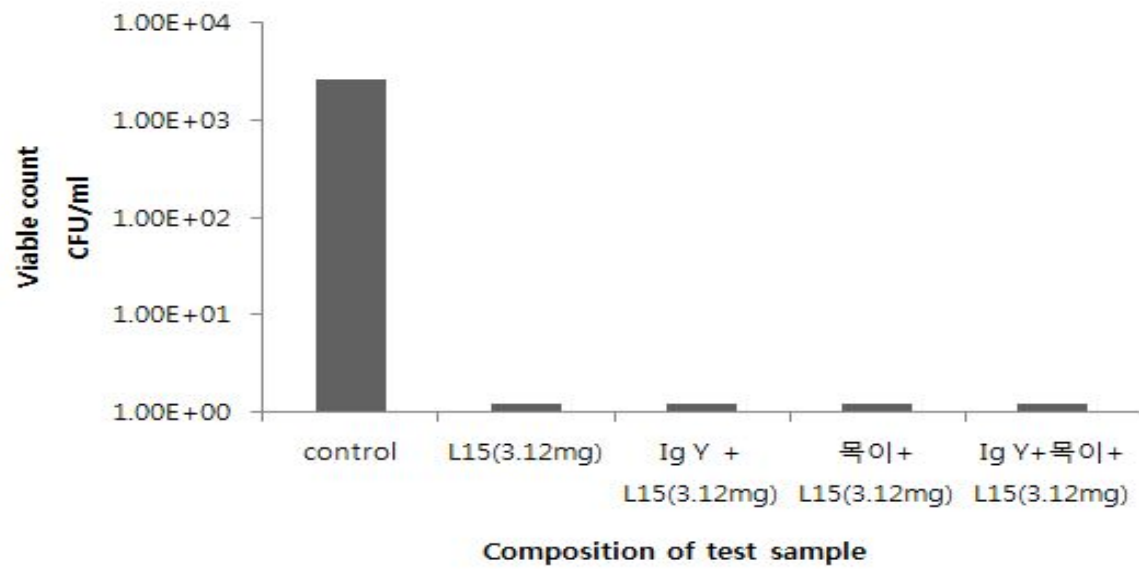
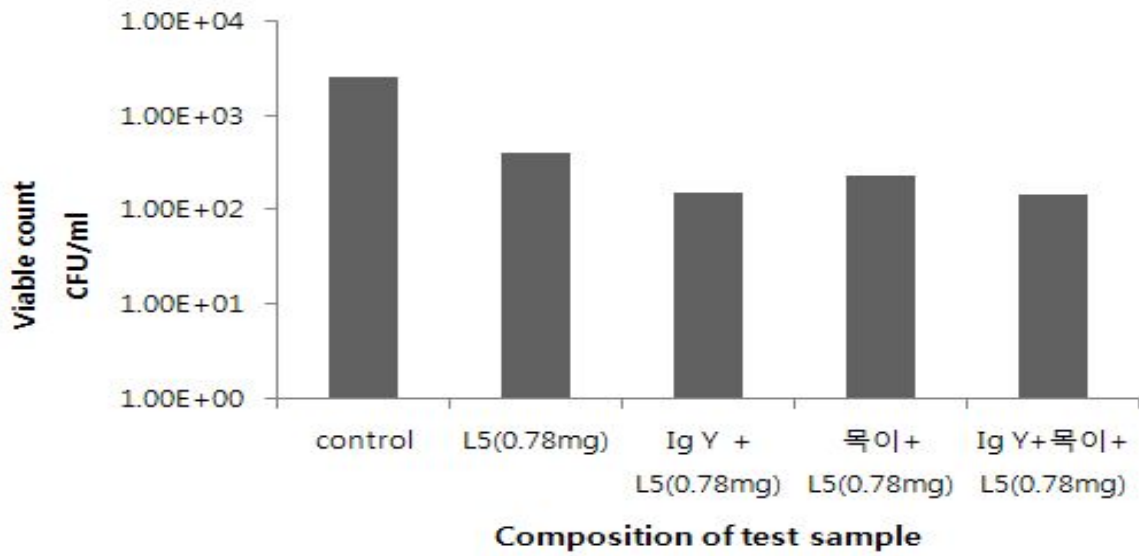
Table 4-10. 혼합 처리에 따른 *H. pylori* KCTC 12083 생육 억제 synergy 효과

	<i>H. pylori</i> KCTC 12083 (synergy 효과: spot)			
	L5 2 ⁻⁶ (1.56 mg/ml)	L5 2 ⁻⁷ (0.78 mg/ml)	L15 2 ⁻⁶ (1.56 mg/ml)	L15 2 ⁻⁷ (0.78 mg/ml)
동결건조액	O(10 mm)	O(7 mm)	O(10 mm)	O(7 mm)
IgY	O(5 mm)	O(7 mm)	O(5 mm)	O(6 mm)
목이	-	-	-	-
LAB + IgY	O(10 mm)	O(6 mm)	O(10 mm)	O(6 mm)
LAB + 목이	O(10 mm)	-	O(10 mm)	O(7 mm)
LAB + IgY+ 목이	O(10 mm)	O(7-8 mm)	O(10 mm)	O(7-8 mm)

● 배지에 혼합액 처리에 따른 효과

3.12 mg/ml의 LAB KW5, LAB KW15를 첨가한 경우와 IgY, 목이버섯과 혼합한 경우에도 *H. pylori*는 나타나지 않았다. 최소 효능점인 1.56 mg/ml의 LAB KW5, LAB KW15를 단독 첨가한 경우 96.9%, 96%, IgY + LAB 첨가한 경우 97.5%, 96.7%, 목이버섯 + LAB 첨가한 경우 96.5%, 95%, IgY + 목이버섯 + LAB 첨가한 경우 98.8%, 97.6%의 *H. pylori* 생육 감소율이 나타났다. 0.78 mg/ml의 LAB KW5, LAB KW15를 단독 첨가한 경우 85.8%, 81.6%, IgY + LAB 첨가한 경우 94%, 88.7%, 목이버섯 + LAB 첨가한 경우 91.3%, 83.2%, IgY + 목이버섯 + LAB 첨가한 경우 94.5%, 92%의 *H. pylori* 생육 감소율이 나타났다. 따라서 단일 또는 두 가지 혼합물을 첨가할 때 보다 IgY, 목이버섯, 유산균 상등액을 모두 첨가했을 때 *H. pylori* 생육 감소 효과가 가장 높았다. 그러므로 세 가지 혼합물을 첨가하여 보다 상승적인 효과가 나타난다고 생각된다(Fig. 4-14).





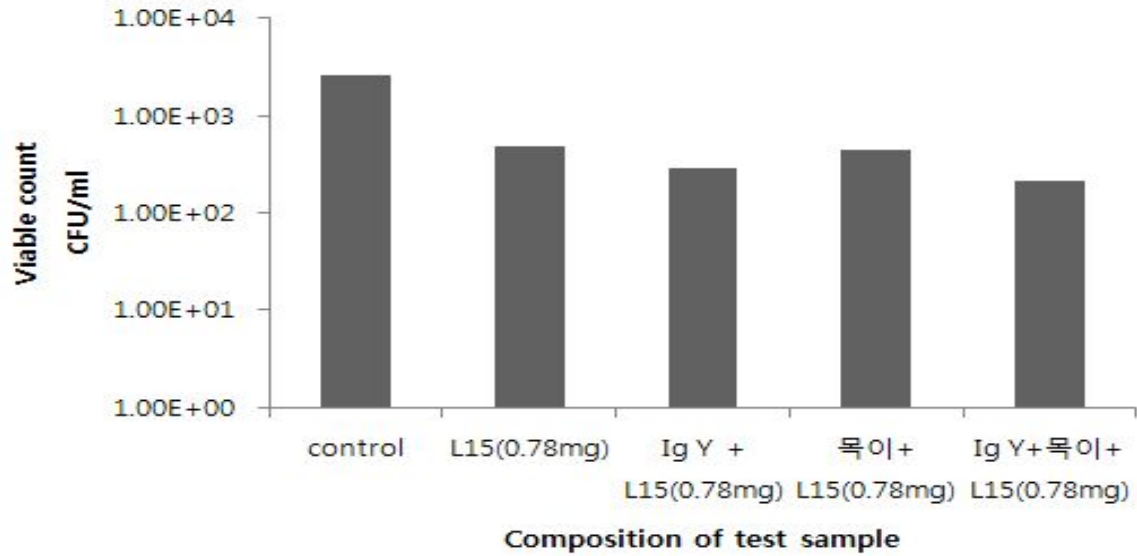


Fig. 4-14. 배지에 혼합액 처리에 따른 *H. pylori* KCTC 12083의 생육 저해 synergy 효과

(2) 유산균의 대량 배양

분리된 유산균 LAB KW5와 LAB KW15에 대해 효과적인 생산을 위한 다양한 영양원에 대해 생육 정도를 비교하였다. 유산균의 활성화를 위해 사용된 배지조성과 종배양(seed culture), 주배양(main culture)에 사용된 배지 조성은 다음과 같다(Table 4-11, Table 4-12, Table 4-13).

Table. 4-11. 유산균 활성용 배지 조성

배지성분	첨가농도 (g/l)
Beef extract	0.500
Yeast extract	2.000
Cesein peptone	1.000
Soypeptone	1.000
MSG	0.050
L-Cysteine-HCl	0.050
Lactose	3.500
Ascorbic acid	0.050
K ₂ HPO ₄	0.100
Sodium acetate	0.100
Ammonium citrate	0.100
MgSO ₄	0.010
MnSO ₄	0.0050
Tween 80 (Polysorbate 80)	0.100
pH	6.80

Table 4-12. 유산균 중 배양에 사용된 배지 조성 (단위:%)

배지성분	BL modified media	TSD media	sPCR media	MRS modified media
Beef extract	0.8	0.5	-	0.8
Yeast extract	1	0.5	1	0.4
Cesein peptone	1.5	1	2	1
Soypeptone	0.3	1	0.5	-
MSG	-	-	-	-
L-cysteine-HCl	0.05	-	-	-
무수포도당(glucose)	1	3	3	2
Lactose	-	-	-	-
옥수수전분	0.05	-	-	-
아스코르빈산	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1	0.2
KH ₂ PO ₄	0.1	-	-	-
Sodium acetate	-	0.1	0.1	0.5
Ammonium citrate	-	-	0.1	0.2
NaCl	0.001	-	-	-
MgSO ₄	0.02	0.01	0.01	0.02
MnSO ₄	0.0007	0.005	0.005	0.005
FeSO ₄	0.001	-	-	-
트윈 80 (Polysorbate 80)	0.1	-	-	0.1
pH	6.8	6.8	6.8	6.8

Table 4-13. 유산균 주 배양에 사용된 배지 조성 (단위:%)

배지성분	Amn	Cmn	Tmn	Pmn
함수결정포도당	-	3.00	-	4.00
유당	3.00	-	3.00	-
소이펩톤	1.50	1.00	0.50	1.00
카제인펩톤	-	-	1.20	-
효모추출물	3.00	1.00	1.00	1.00
글루타민산	0.05	-	0.02	-
시스테인	0.05	-	-	-
아스코르빈산	0.05	-	0.05	-
제2인산칼륨	0.10	0.10	0.10	0.10
초산나트륨	0.50	-	0.05	-
구연산칼륨	0.10	0.10	-	0.10
중조	-	-	-	-
황산마그네슘	0.01	0.01	0.01	0.01
황산망간	0.01	0.01	0.005	0.01
황산제1철	-	-	-	-
염화칼슘	0.05	-	-	-
트윈80	0.10	-	-	-
pH	6.80	6.80	6.80	6.80

유산균의 대량 배양을 위한 다양한 배지 조건 설정을 위해 종배지와 주배지들에 대한 실험을 수행하였다. 종배지에 따른 LAB KW5의 생육 정도를 확인한 결과 BL modified, Tsd, Psd >> MRS modified >> Asd 순으로 생육이 좋다. 따라서 배지조성이 간단한 Psd을 일단 종배지로 채택하여 다음의 주(main)배지 실험의 종(seed)배지로 사용하였다. 그러나 전체적으로 생육이 약하였다. 이 data로 봐서는 BL modified, Tsd, Psd 중 하나를 종배지로 사용할 수 있을 것 같으며, MRS modified 및 Asd는 종배지로서 적당하지 않다. Asd에서 생육이 좋지 않은 이유를 검토해 볼 필요가 있다. Asd은 lactose 분해능이 좋지 않아서 그런 것 같고, MRS modified은 유기질소원 첨가량이 적기 때문으로 보인다. 또한 주배지의 경우 Pmn 및 Cmn이 배양성이 좋았으나, 영양이 좋은 Amn 및 Tmn이 성적이 좋지 않은 이유를 배지조성표로부터 분석할 필요가 있을 것으로 보인다.

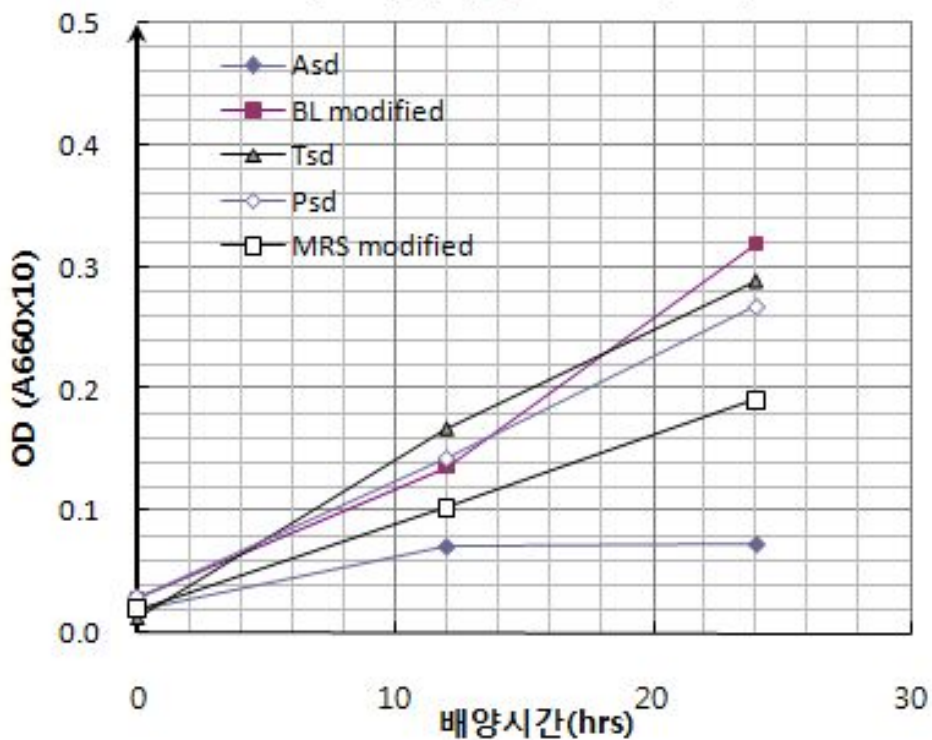


Fig. 4-15. 각 종 배지에서 LAB KW5의 생육

Table 4-14. 종 배지에 따른 LAB KW5의 생육 정도

배지 \ 배양시간 (hrs)	Asd		BL modified		Tsd		Psd		MRS modified	
	pH	OD A660x10	pH	OD A660x10	pH	OD A660x10	pH	OD A660x10	pH	OD A660x10
0	6.82	0.019	6.39	0.029	6.17	0.013	6.00	0.029	6.05	0.020
12	5.83	0.071	4.92	0.136	4.53	0.168	4.84	0.143	5.29	0.103
24	5.64	0.073	4.26	0.318	4.02	0.289	4.15	0.268	5.01	0.191

Table 4-15. 주 배지에 따른 LAB KW5의 생육 정도

배지	Amn		Cmn		Tmn		Pmn	
	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)
0	6.43	0.049	6.26	0.006	6.45	0.033	6.18	0.004
12	5.65	0.106	4.10	0.189	5.91	0.050	4.11	0.186

그리고 LAB KW5의 종 배지에서의 생육 정도를 비교한 결과 BL modified > Tsd > MRS modified > sPCR 순으로 생육이 좋으나 전반적으로 좋지는 않았다. 우선 Tsd을 종배지로 채택하여 다음의 주배지 실험의 종배지로 사용하였다. 또한 주 배지의 경우는 영양이 좋은 Tmn 및 Amn에서 성장이 좋았다. 이는 유기질소원 첨가량이 많음에 기인할 수도 있으며, 또한 lactose를 유일 탄소원으로 할 때, glucose보다 젖산 생성이 적어서 pH의 급격한 하락이 적기 때문일 수도 있을 것으로 보여진다.

Table 4-16. 종 배지에 따른 LAB KW5의 생육 정도

배지	BL modified		Tsd		sPCR		MRS modified	
	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)
0	6.29	0.024	6.04	0.012	5.89	0.034	6.05	0.009
12	4.36	0.217	4.65	0.177	4.64	0.136	4.81	0.153

Table 4-17. 주 배지에 따른 LAB KW5의 생육 정도

배지	Amn		Cmn		Tmn		Pmn	
	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)	pH	OD (A660x10)
0	6.43	0.049	6.26	0.006	6.45	0.033	6.18	0.004
12	5.65	0.106	4.10	0.189	5.91	0.050	4.11	0.186

각 주배지에서 kw-15의 생육

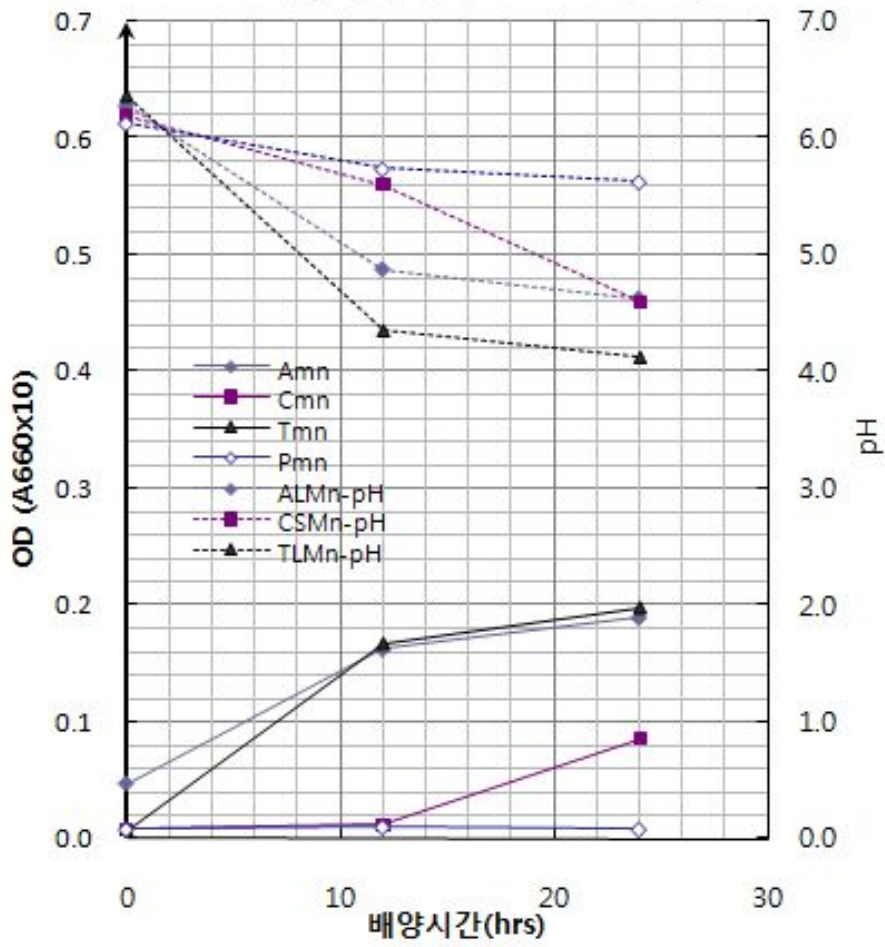


Fig 4-16. 각 주 배지에서 LAB KW15의 생육

제 5 절 제1위탁과제: *H. pylori*에 대한 고역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 기능성 식품의 개발

세부과제에서 제공받은 목이버섯 추출물, 난황항체 IgY, 분리 유산균 상등액을 이용하여 *in vitro* 세포실험으로 *H. pylori*균의 위벽세포 부착 억제 및 생육억제 효과를 확인하였고, 각 물질들의 복합체를 제조하여 synergy 효과를 확인하였다.

1. *In vitro* 실험을 통한 난황항체 복합물의 synergy 효능 확인

가. 재료 및 방법

(1) 세포배양

한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 분양받은 위암 세포주인 AGS cell을 10% FSB와 penicillin, streptomycin이 포함된 RPMI을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다. 이 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 실험에 사용하였다.

(2) 균주 및 배지

H. pylori 26695 및 52는 *H. pylori* 분리균주은행(*H. pylori* Korean Type Culture Collection(HpKTCC))에서 제공받아 사용하였다. 각 균주는 5% horse serum이 첨가된 brucella agar(Difco)를 주요배지로 하여 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 24시간 마다 계대 배양 하며 차후 실험에 사용하였다.

(3) 실험에 사용된 시료

구분	내용
난황항체	제 1협동 연구기관인 비케이바이오에서 제공받았음. 추출 방법은 난황 100 g에 DW 700 ml을 교반/추출 후 원심분리하여 얻은 상등액으로 실험에 사용된 시료의 최종 농도는 ml 당 3 µg의 specific IgY를 함유하고 있음.
목이버섯 추출물	제 1협동 연구기관인 비케이바이오에서 제공받았음. 열수 추출에 의해 추출되었으며 본 실험에 사용하기 위해 제균 방법으로 autoclave를 실시한 시료를 제공받았음.
Lactic acid bacteria (LAB)	L-15 유산균 상등액은 동결건조 된 상태로 제공받았으며 제 3협동 연구기관인 경원대학교에서 분리된 균주로 MRS broth에서 24시간 배양 후 상등액을 모아 제균 후 동결 건조된 것임. 본 실험에 사용하기 전 pH를 7.0으로 조정하였음.
	L-5

(4) *In vitro* AGS cell에 대한 *H. pylori*의 부착 억제능 측정

위암세포주인 AGS cell에 대한 부착 억제능 측정은 urease 활성변화로 측정하였다. 먼저 AGS 세포주의 농도를 2×10^5 cells/ml로 조절하여 100 μ l 씩 96 well plate에 접종하여 24시간 전배양하여 단일층을 형성하게 하였다. 실험에 사용된 3종류의 시료는 RPMI 배지를 이용하여 적정 농도로 희석하여 PBS buffer로 현탁시킨 *H. pylori*균을 접종하고 15분간 전 배양한 후 AGS cell이 배양된 96 well plate에 250 μ l 첨가하여 2시간 동안 37°C, 10% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 AGS cell에 부착되지 않은 *H. pylori*균을 제거하기 위하여 PBS buffer로 3번 세척하였다. 이렇게 준비된 96 well plate에 urea broth를 각 well 당 200 μ l 씩 첨가하여 37°C에서 2시간 반응한 후 540 nm 에서 발색정도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition effect} \text{ 는 } \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

이때 AGS cell에 부착된 *H. pylori*균이 많을수록 urease의 활성이 높기 때문에 urea broth의 색이 붉은색으로 변화되며 변화 정도로 부착 억제능을 평가하였다. 데이터 값은 3 반복에 의해 나온 결과로 평균값을 이용하였다.

나. 실험 결과

(1) 위암 세포주 AGS cell내 *H. pylori* 균에 대한 부착 억제능 확인

제공받은 세 종류의 시료에 대해 개별적인 부착 억제능 실험을 실시한 결과, 난황 항체인 IgY 시료의 경우 최고농도인 0.15 μ g/ml에서도 부착 억제능이 관찰되지 않았으며 positive control로 사용한 일본 IgY 시료 역시 부착 억제능을 관찰할 수 없었다.

유산균 상등액 역시 40 mg/ml 이하의 농도에서는 *H. pylori* 균에 대한 부착 억제능이 관찰되지 않았다. 유산균 상등액의 경우 *H. pylori*균의 생육저해에 대한 연구가 보고된바 있지만 부착 억제능은 나타나지 않는 것으로 밝혀졌다.

Table 5-1에 나타났듯이 목이버섯 추출물의 경우 0.5 brix에서는 두 균주 모두에서 60% 이상의 높은 부착 억제능을 보였으며, 0.125 brix까지도 미세한 부착 억제능을 관찰할 수 있었다. 현재 보고된 연구 결과에 의하면 *H. pylori*가 위상피세포 표면에 선택적으로 부착될 때 부착 리셉터를 인식하여 부착되게 되는데 이때 리셉터와 유사한 물질을 부착 억제제로 사용하게 되면 *H. pylori*가 위상피세포로 부착되는 것을 막을 수 있다고 알려져 있다. 목이버섯추출물의 경우 역시 추출물에 대부분을 차지하고 있는 당성분이 부착 억제제로 작용하는 것으로 사료된다.

Table 5-1. Effect of 목이버섯 on adhesion of *H.pylori* strains to human gastric mucus

Sample	Inhibition effect(%)	
	<i>H. pylori</i> 26695	<i>H. pylori</i> 52
목이버섯 0.5 brix	62.76%	61.14%
목이버섯 0.25 brix	54.92%	51.63%
목이버섯 0.125 brix	27.81%	17.91%
목이버섯 0.0625 brix	13.28%	1.92%
목이버섯 0.03125 brix	9.20%	-

$$\text{Inhibition effect(\%)} = (\text{OD}_c - \text{OD}_s) / \text{OD}_c * 100$$

(2) 위암 세포주 AGS cell내 *H. pylori* 균에 대한 부착 억제능 synergy효과 확인

앞의 결과를 보면 각 시료에 대한 부착 억제능은 목이버섯 추출물을 제외하고 뚜렷하게 나타나지 않았다. 본 연구에서는 효과가 미흡한 시료를 토대로 복합체를 제조하여 각 시료들에 대한 시너지 효과를 관찰하였다. 이때 사용된 *H. pylori* 균주는 표준 균주인 *H. pylori* 26695 하나만을 선택하여 사용하였다.

먼저 Table 5-2의 경우 생육저해효과를 나타내지는 유산균 상등액과 난황항체 IgY를 바탕으로 2가지 복합체를 제조 후 부착억제능 효과를 측정된 결과, 복합체 최종 농도가 10 mg/ml 유산균 상등액 + 0.15 µg/ml IgY를 함유하는 복합체에서 약 30% 정도의 부착 억제능을 나타내었으며, 5 mg/ml 유산균 상등액 + 0.15 µg/ml IgY를 함유하는 복합체의 경우 약 10% 정도의 부착 억제능을 나타내었다. 유산균 분리균(L-15, L-5) 두 균주에 대해서는 별다른 차이를 관찰 할 수 없었다.

Table 5-2. Effect of combination sample on adhesion of *H. pylori* strains to human gastric mucus

Sample	Inhibition effect(%)
10 mg/mL LAB(L-15) + 0.15 µg/mL IgY	35.38
5 mg/mL LAB(L-15) + 0.15 µg/mL IgY	21.21
10 mg/mL LAB(L-5) + 0.15 µg/mL IgY	25.13
5 mg/mL LAB(L-5) + 0.15 µg/mL IgY	8.73

단일 물질에서도 효과를 보인 목이버섯 추출물과 난황항체 IgY 복합체의 경우 최종 농도가 0.125 brix 목이버섯 + 0.15 µg/ml IgY 복합체에서 약 69%정도의 높은 부착 억제능을 보였으며 이는 목이버섯 단독으로 실험했을 때 나타난 효과(0.125 brix 목이버섯 = 약 27%)에 비해 훨씬 높은 부착억제능을 관찰하였다(Table 5-3).

Table 5-3. Effect of combination sample on adhesion of *H. pylori* strains to human gastric mucus

Sample	Inhibition effect(%)
0.125 brix 목이버섯 + 0.15 µg/ml IgY	69.25
0.0625 brix 목이버섯 + 0.15 µg/ml IgY	53.48
0.03125 brix 목이버섯 + 0.15 µg/ml IgY	28.52

Table 5-4, 5-5는 유산균 상등액과 목이버섯 추출물의 농도를 다르게 하여 혼합, 제조한 복합체의 *H. pylori* 균의 부착 억제능을 측정 한 결과로 목이버섯의 최종 농도를 0.125 brix로 고정하고 유산균 상등액의 농도를 10, 5, 2.5 mg/ml로 조절하여 복합체를 제조한 경우 부착 억제능이 약 40% 정도 나타났으며 유산균 상등액의 농도에 따른 효과차이는 크지 않은 것으로 나타났다.

반대로 유산균 상등액의 최종 농도를 10 mg/ml로 고정하고 목이버섯 추출물의 농도를 조절하여 실험한 결과 10 mg/ml의 유산균 상등액과 0.125 brix 목이버섯 추출물 복합체에서 약 40%정도의 부착 억제능을 보이며 목이버섯 추출물의 농도가 낮아짐에 의해 부착 억제능의 효과도 감소하는 것을 관찰하였다.

Table 5-4. Effect of combination sample on adhesion of *H. pylori* strains to human gastric mucus

Sample	Inhibition effect(%)
10 mg/ml LAB(L-15) + 0.125 brix 목이버섯	41.18
5 mg/ml LAB(L-15) + 0.125 brix 목이버섯	40.02
2.5 mg/ml LAB(L-15) + 0.125 brix 목이버섯	39.13
10 mg/ml LAB(L-5) + 0.125 brix 목이버섯	38.68
5 mg/ml LAB(L-5) + 0.125 brix 목이버섯	29.50
2.5 mg/ml LAB(L-5) + 0.125 brix 목이버섯	26.74

Table 5-5. Effect of combination sample on adhesion of *H. pylori* strains to human gastric mucus

Sample	Inhibition effect(%)
0.0625 brix 목이버섯 +10 mg/ml LAB(L-15)	7.40
0.03125 brix 목이버섯 +10 mg/ml LAB(L-15)	6.60
0.0625 brix 목이버섯 +10 mg/ml LAB(L-5)	16.67
0.03125 brix 목이버섯 + 10 mg/ml LAB(L-5)	13.81

유산균 상등액의 농도변화에는 부착 억제능의 차이가 보이지 않았지만 목이버섯 추출물의 농도변화에는 부착 억제능의 차이가 나타나는 것으로 보아 복합체에 의한 *H. pylori* 부착 억제능 역시 목이버섯 추출물이 많이 관여한다고 생각되어진다.

제 6 절 위탁과제: 헬리코박터 퇴치 및 위염증 개선효능 평가

본 연구는 제시된 시험물질(IgY 함유 난황액, *Streptococcus thermophilus* 건조분말 및 목이버섯(*Auricularia auricula*) 추출물로 구성된 요거트)이 *Helicabacter pylori* 균 증식을 억제하고, 그 항균효능이 균으로부터 분비되는 urease의 활성도를 억제하여 얻어지는 효과인지를 확인함은 물론, 실험적으로 H. pylori에 감염된 동물모델에서 균을 퇴출시킴으로써 위의 염증을 개선시켜 주는지를 표준모델을 이용하여 입증하는 데에 그 목적이 있다.

가. 재료 및 방법

(1) 시험물질

시험물질인 요거트는 남양유업(주)로부터 공급받아 냉장상태로 보관하면서 사용하였다. 본 시험물질은 요거트 1병인 150 mL 내에 IgY 난황액 1.0 g(6.7 mg/mL), *Streptococcus thermophilus* 균 분말 0.02 g(133 µg/mL), 그리고 목이버섯 추출물 0.1 g(667 µg/mL)이 함유되어 있다.

(2) *H. pylori* 배양 및 동정

실험에 사용한 *H. pylori* 균은 표준균주인 ATCC 49503를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 분양받아 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 선택배지인 Brucella with 5% sheep blood (vancomycin 10 mg, amphotricin B 10 mg, cefsulodin 5 mg/L)와 brain heart infusion (BHI) broth를 사용하였으며, 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂의 조건에서 37°C와 충분한 습도를 유지하면서 7일간 배양하였다. *H. pylori*는 광택이 있는 반투명의 미소집락을 형성하므로 1개의 검체 당 의심되는 집락을 조균하여 2장의 혈액한천배지에서 순수배양하였다. 이 중에서 1장은 호기배양을, 나머지 1장은 분리배지에 배양함과 동시에 다시 미호기성 배양을 계속하여 2일간 배양 후 2장의 배지를 관찰하였다. 미호기성 배양을 한 배지에서 발육한 균을 Gram 염색을 포함한 생화학적 동정을 통하여 분균주가 *H. pylori*임을 확인하였다.

(3) *in vitro* 항균효능 평가

*H. pylori*에 대한 항균효능은 CLSI guide line에서 제시하는 표준시험법인 Agar-dilution method로 평가하였다. 먼저 *H. pylori*를 유지하거나 증식시키기 위해서 Brucella agar (1.5% agar, 10% FBS) plate에 접종한 후, 37°C, 10% CO₂, 100% 습도 환경에서 계대 배양하였다. Agar dilution test을 위하여 시험물질인 요거트를 IgY 농도를 기준으로 연속희석(90 mg/mL - 90 µg/mL)하여 10% fetal bovine serum (FBS) 함유 Mueller-Hinton agar 배지를 제작한 후, McFarland를 사용하여 탁도 2.0에 맞추어 *H. pylori*를 접종하였다. 접종 후 72시간 동안 배양한 다음 균체 성장이 완전히 억제된 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 확인하였다(Ha et al., 2009; Malekshahi et al., 2011; Yang et al., 2012).

(4) *in vitro* urease 억제 효능 평가

Urease 활성도 억제효능을 평가하기 위해, 1 x 10⁸ CFU/mL의 *H. pylori* 균주에 요거트를 IgY 농도를 기준으로(90 mg/mL - 350 µg/mL)로 가하고, 50 rpm으로 교반하면서 6시간 동안 배양하였다. 50 µl의 urease base(2% urea 및 0.03% phenol red 함유)를 가한 후 30분 동안 반응시킨 다음 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다(Malekshahi et al., 2011). Urease 활성도를 50% 억제하는 농도 (median inhibitory concentration. IC₅₀)를 제시하였다.

(5) 실험동물

수컷 C57BL/6 마우스(체중 20 - 24 g)를 대한바이오링크(음성, 한국)에서 구입하여 온도 22±2°C, 상대습도 40-70%, 12시간 광주기로 150-300 lux 밝기의 동물실에 수용하였다. 펠렛사료와 정제수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물실험계획서는 충북대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받아 모든 동물실험은 표준작업순서에 따라 수행되었다.

(6) *H. pylori* 감염 및 투여

24시간 절식 후 마우스(n=10/군)에 *H. pylori* (1 x 10⁸ CFU/1 mL/마우스)를 2일 간격으로 3회 경구접종하여 감염시켰다(Hahm et al., 2003; Aristoteli et al., 2006; Yang et al., 2012). 14일 후 일부의 동물(2수/군)을 희생시켜 CLO 헬리코박터 키트(아산제약, 서울, 한국)로 균체감염을

확인하였다. 균체 확인 후 IgY 난황액, *Streptococcus thermophilus* 분말 및 목이버섯 추출물 함유 요거트[3 mL(22.4 mg)/kg, 10 mL(74.6 mg)/kg 또는 30 mL(224 mg)/kg]를 14일간 매일 2회 경구투여하였다. 또 비교물질로는 시험성분이 함유되지 않은 요거트 위약(10 mL/kg) 또는 비교시판제품(10 mL/kg)을 동일 일정으로 경구투여하였다.

(7) 생검 및 균체 동정

최종 시험물질 투여 24시간 후에 동물을 희생시키고 *H. pylori* 검출을 위해 위점막을 생검하였다. 위 유문부 생검조직(3 x 3 cm)을 잘게 자른 후 CLO 키트에 떨어뜨리고 35°C에서 24시간 반응시켜 urease 활성도에 따른 반응을 관찰하였다(Yang et al., 2012). 발색반응으로 밝은 황색은 음성, 진한 황색은 위(부분)양성, 그리고 진한 적색은 양성으로 판정하였다.

추가적인 생검조직을 면봉을 이용하여 20% glycerol 함유 배지에 접종하여 배양한 다음, 아래와 같은 혈청학적 지표를 기준으로 *H. pylori* 균체를 동정하였다(Yang et al., 2012):

Oxidase: Platinum-loop를 이용하여 집락을 따서 여과지에 묻힌 다음 p-phenylenediamine dihydrochloride 시약을 떨어뜨려 indolphenol blue 생성에 따른 청색반응을 보이는 경우 양성으로 판정하였다.

Catalase: 선택배지에서 배양된 집락을 슬라이드 위에 올려놓고 3%의 H₂O₂를 떨어뜨려 기포가 발생하면 양성으로 판독하였다.

Nitrate reduction: 배양된 집락을 nitrate broth에 접종하고 35°C에서 48시간 배양하였다. α-Naphthylamine과 sulfanilic acid를 넣어 적자색으로 변하면 양성으로 하였다. 단, 음성인 경우라도 zinc 분말을 넣은 후 무색이면 양성(배지 중의 NO₃⁻가 다 소모되었음), 적색이면 음성(NO₃⁻가 소모되지 않았음)으로 판독하였다.

H₂S: 잘 분리된 집락 한 개의 중앙 부위를 백금선으로 취해서 Triple sugar iron(TSI) 배지 중앙에 천자하고 사면의 바닥으로부터 3-5 mm까지 접종하고 사면에도 발라 주었다. 공기가 통하도록 뚜껑을 약간 열어 놓고 37°C에서 24시간 배양한 다음 검은 색으로 변하면 H₂S를 생성하는 것으로 판정하였다.

(8) 조직병리학적 검사

시험 종료일에 적출한 위 조직을 중성 formalin 용액에 고정한 후 조직처리 과정을 거쳐 paraffin 조직 슬라이드를 제작하였다. 조직 슬라이드를 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(9) 통계학적 분석

시험결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 통계학적 검증은 Windows v.10.0의 SPSS 프로그램으로 분산분석(analysis of variance, ANOVA)한 다음 $P < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

나. 실험결과

(1) *In vitro* 항균효능

IgY 난황액 (6.7 mg/mL), *Streptococcus thermophilus* 균 분말 (133 µg/mL) 및 목이버섯 추출물 667 µg/mL이 함유된 요거트를 IgY 함량을 기준으로 연속희석하여 *H. pylori*에 대한 항균효능을 평가한 결과, 45.0 mg/mL까지는 의미있는 효과를 나타내지 못하였으나 90.0 mg/mL에서는 균 증식을 완전하게 억제하여(Fig 6-1.), 이 농도가 최소억제농도(MIC)로 확인되었다.

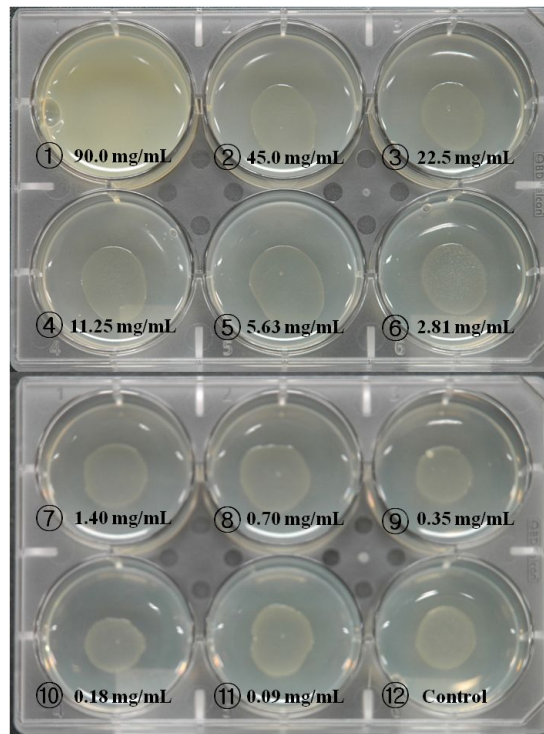


Fig 6-1. Inhibition by Yogurt containing IgY, *Streptococcus thermophilus* and *Auricularia auricula* extract of *H. pylori* growth in Agar-dilution assay. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined to be 90.0 mg/mL as IgY concentration.

(2) In vitro urease 억제효능

IgY 난황액(6.7 mg/mL), *Streptococcus thermophilus* 균 분말(133 µg/mL) 및 목이버섯 추출물 667 µg/mL이 함유된 요거트를 IgY 함량을 기준으로 연속희석하여 *H. pylori*의 urease에 대한 억제효능을 평가한 결과, $y = -0.1263x + 0.8907$ ($R^2 = 0.8512$)(Fig 6-2)의 억제곡선을 나타내었다. 따라서 IC50은 약 70 mg/mL로 계산되었다.

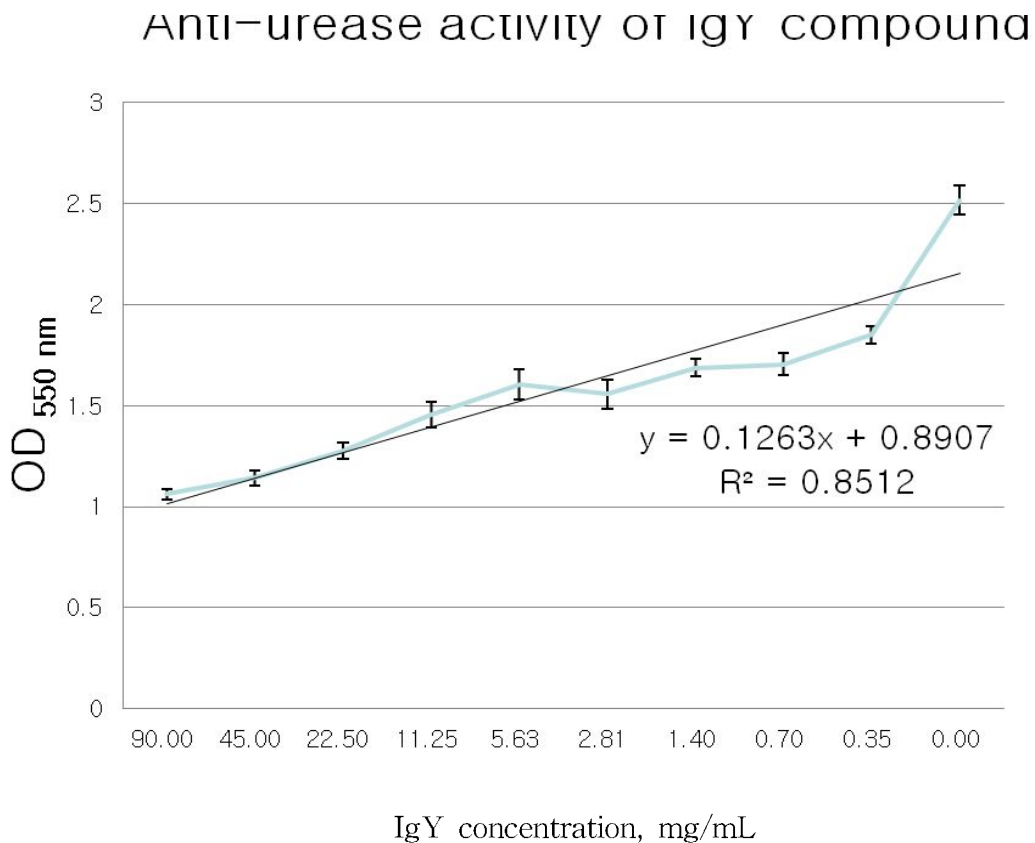


Fig 6-2. Inhibition by Yogurt containing IgY, *Streptococcus thermophilus* and *Auricularia auricula* extract of *H. pylori* urease activity. Median inhibitory concentration(IC50) was determined to be 70 mg/mL.

(3) *In vivo* CLO kit test

C57BL/6 마우스에 반복적으로 *H. pylori* (1×10^8 CFU, 3회)를 위 내로 감염시키고, 14일 후 CLO kits로 검출한 결과 진한 적색의 양성 발색반응을 보임으로써 균체가 위 내에 잘 정착한 것으로 확인되었다.

한편 감염된 마우스에 14일간 1일 2회 시험물질이 함유되지 않은 Yogurt(10 mL/kg)를 투여했을 때 8마리 중 6마리의 동물에서만 양성반응을 보여 25%의 퇴치율을 보였다(Table 6-1). 이에 비해 시험물질 22.4 mg/kg을 함유한 Yogurt를 투여했을 때는 37.5%(3/8), 64.7 mg/kg 투여군에서는 62.5%(5/8), 그리고 224 mg/kg 투여군에서는 75.0%(6/8)의 균체 제거율을 나타내었는 바, 224 mg/kg에서 비교시판제품 10 mL/kg과 유사한 효능을 보여 주었다.

Table 6-1. Reactivity in CLO test on the gastric mucosa of mice infected with *H. pylori* followed by treatment with egg yolk IgY or pantoprazole.

Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	Positive ratio
Control	●	●	●	●	●	●	●	●	8/8
Placebo Yogurt (10 mL/kg)	●	●	●	●	●	●	○	○	6/8
Yogurt (22.4 mg/kg)	●	●	●	●	●	○	○	○	5/8
Yogurt (64.7 mg/kg)	●	●	●	○	○	○	○	○	3/8
Yogurt (224 mg/kg)	●	●	○	○	○	○	○	○	2/8
비교 시판제품 (10 mL/kg)	●	●	○	○	○	○	○	○	2/8

○, negative; ●, positive.

(4) 위점막 균체 배양

위점막 생검조직을 배양하였을 때, 용매만을 투여한 대조군에서는 모든 동물에서 균이 증식하였다(Table 6-2). 이에 비해 시험물질이 함유되지 않은 Yogurt만을 투여했을 때에도 25%(2/8)의 균체 퇴치율을 보여 주었다. 이에 비해 시험물질 함유 Yogurt 투여군에서는 용량의존적인 균체 제거율을 나타냈는데, 22.4 mg/kg에서 37.5%(3/8), 64.7 mg/kg에서 62.5%(5/8), 그리고 224 mg/kg에서는 75.0%(6/8)의 퇴치율을 보여 주어, 224 mg/kg에서 비교시판제품 10 mL/kg과 같은 효능을 발휘하였다.

Table 6-2. Identification of *H. pylori* through culture of gastric mucosa from mice infected with *H. pylori* followed by treatment with egg yolk (IgY) or pantoprazole.

Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	Positive ratio
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8
Placebo Yogurt (10 mL/kg)	+	+	+	+	+	+	-	-	6/8
Yogurt (22.4 mg/kg)	+	+	+	+	+	-	-	-	5/8
Yogurt (64.7 mg/kg)	+	+	+	-	-	-	-	-	3/8
Yogurt (224 mg/kg)	+	+	-	-	-	-	-	-	2/8
비교시판제품 (10 mL/kg)	+	+	-	-	-	-	-	-	2/8

-, negative; +, positive.

(5) *H. pylori* 동정

생검조직으로부터 배양된 콜로니가 *H. pylori* 인지를 확증하기 위해 혈청학적 동정을 실시하였다. Urease 반응에서 모든 콜로니는 양성반응을 보여 CLO test와 일치하는 *H. pylori* 로 확인되었다. 하지만 모든 대조군과 시험처치군을 포함하여 모든 동물이 oxidase와 catalase에 양성반응을 보였는데, 이는 점막조직이나 *H. pylori* 이외의 다른 미생물로부터의 효소에 기인하는 것으로 여겨진다. 반대로 *H. pylori*에서 음성반응지표인 nitrate reduction과 H₂S formation는 모든 동물에서 음성반응을 나타내어 위점막에 nitrate 환원 및 H₂S생성 미생물이나 조직 내 효소가 없는 것으로 판단되었다.

(6) 조직병리학적 소견

H. pylori 감염은 위점막 용모의 위축 및 탈락현상을 초래하였다(Fig 6-3). Placebo Yogurt 투여는 효과가 거의 없었으나, 시험물질 함유 Yogurt는 용량의존적으로 위점막 손상 및 염증반응을 완화시켜 주었는데, 224 mg/kg에서는 정상적인 건강한 위점막을 보여 주었다. 한편 비교시판제품(10mL/kg) 역시 우수한 장손상 및 염증 완화 효과를 나타내었다. 하지만 이러한 염증억제 효과는 CLO test와 균체 동정에서 확인된 세균 퇴치와 일치함으로써 균체 제거가 위점막 회복에 직접적으로 관련되는 것으로 확인되었다.

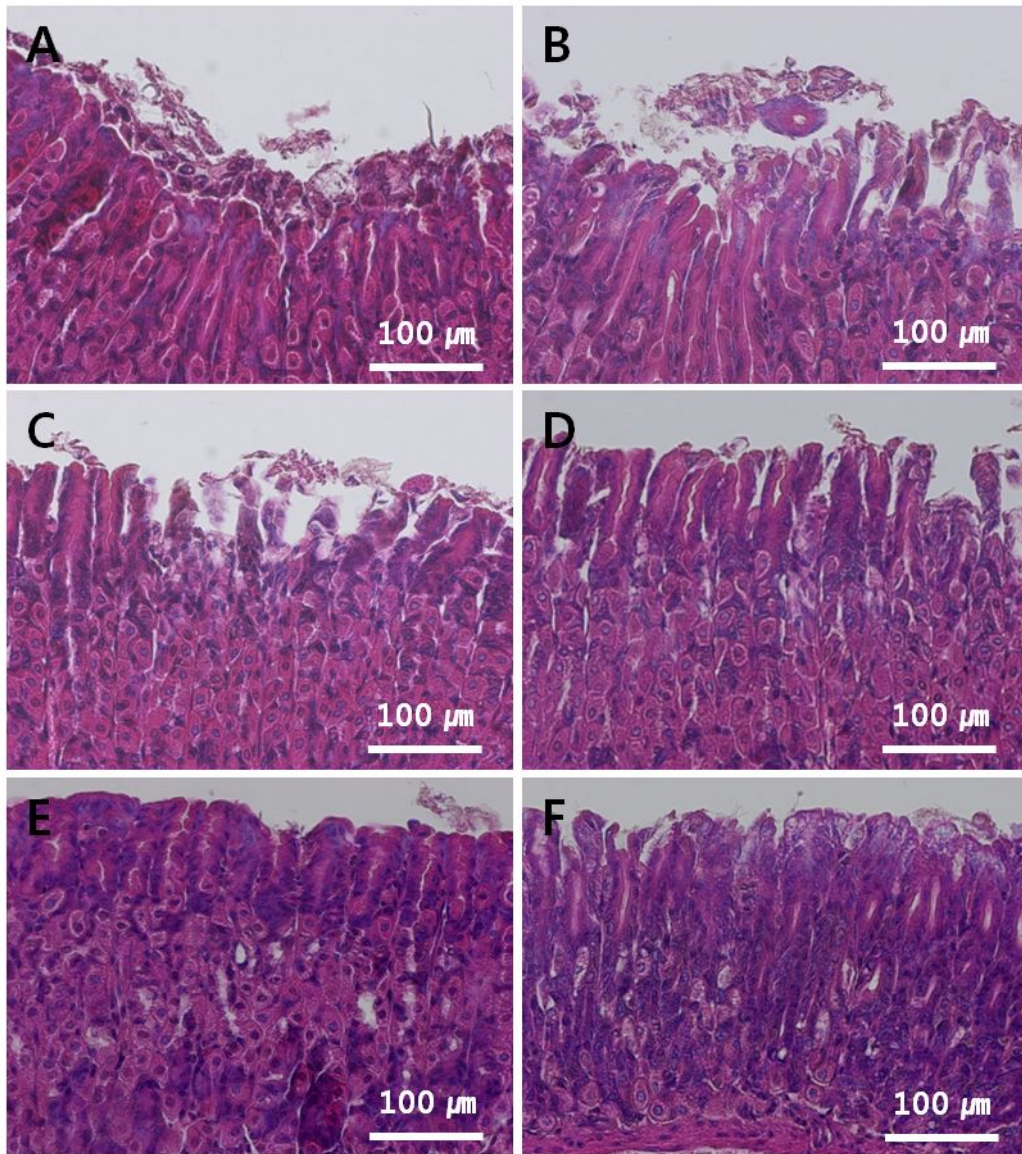


Fig 6-3. Representative microscopic findings of the gastric mucosa of mice infected with *H. pylori* followed by treatment with IgY(50-200 mg/kg) or pantoprazole(30 mg/kg). (B) in vehicle group, in comparison with light sloughing of villi at a low(50 mg/kg) dose of IgY (C) and near-normal features at high doses of IgY (D, 100 mg/kg; E, 200 mg/kg) or pantoprazole (F, 30 mg/kg).

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009 - 2010)	항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발	안정화 및 관능평가, 제형개발	100	- 기능성원료의 유효한 함량 확정 - 발효유 제품에서 안정화 및 관능평가 확인
	헬리코박터균 항원 및 항체복합체 개발	헬리코박터균 항원개발	100	- 배양된 <i>H. pylori</i> 로부터 균체를 회수하 여 초음파 파쇄를 이용한 whole cell 항 원 제조
		헬리코박터균 생육억제기능의 난황항체 제조	100	- 제조된 항원을 닭에게 면역한 후 면역 란을 회수 - 면역란으로부터 항체를 분리하고 ELISA로 항체 역가를 분석
		헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 제조방법 확립	100	- 열수량, 효소 처리, 에탄올 처리 등 다 양한 조건으로 목이버섯을 추출하여 대 량생산에 적합한 제조방법을 확립
	항-헬리코박터균 난황항체 생산	사항 및 계란 생산조건 확립	100	- 산란계 산란율 측정 - 면역항원 접종 주기설정
		헬리코박터균 생육억제기능의 난황항체 제조	100	- 계란수거 및 액란살균 조건 설정
	항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능 확인	헬리코박터균 생육억제기능의 복합체 재료 및 유산균 screening	100	- In vitro 실험으로 각종 유산균에 대한 헬리코박터균 생육억제 screening

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
2차년 도(20 10- 2011)	항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발	항체복합체 발효유, 건강식품류 등에 적용	100	- 항-헬리코박터 존스니균과 난황항체의 시너지 작용을 이용하여 발효유를 시험 생산 및 저장기간별 안정성 테스트
		건강기능식품 인증을 위한 구체적인 목표설정	100	- 유산균 발효유의 경우 식품이 아닌 축 산물로 유형이 분리되어 있어 기능성축 산물로 준비중
		헬리코박터균 저해 효능 평가(<i>in vitro</i>) - 위탁연구	100	- <i>In vitro</i> 를 통한 헬리코박터균 세포부작 억제능력테스트
	헬리코박터균 항원 및 항체복합체 개발	헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 대량생산	100	- 목이버섯으로부터 농축액 제조 시 분 쇄, 침지, 가열, 여과, 농축 단계별 scale-up을 통한 최적 공정 확립 및 제 조된 농축액 및 분말화를 통한 규격설 정, 제형개발, 포장법, shelf-life 시험 수행
		헬리코박터균 부착억제 효과를 가지는 목이버섯 추출물 정제 및 분석	100	- 산업화를 위한 2백수 분량의 닭으로부터 면역란을 얻은 후 specific IgY함량 정량과 특정 항체를 얻기 위한 항체 정 제 및 농축 조건 확립
		헬리코박터균 항원 대량제조 및 난황 항체 정제, 농축	100	- 항체 역가측정을 객관적으로 평가할 specific IgY함량 정량과 특정 항체를 얻기 위한 항체 정제 및 농축 조건 확 립
		헬리코박터균 난황항체(specific IgY) 정량 분석법 확립	100	- 항체 역가측정을 객관적으로 평가할 specific IgY 정량분석과 validation을 통한 분석법 검증 - 제품 제형에 따른 specific IgY 함량 분 석법과 안정성 확인
	항-헬리코박터균 난황항체 생산	헬리코박터균 난황항체 대량생산	100	- 200수 산란계를 통한 대량 항원 접종 및 면역란 획득 - 획득된 면역란에 가염 또는 가당을 하 여 제품화 완성 - 최종 제품별 포장법, shelf-life 시험
	항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능 확인	유산균의 헬리코박터균 생육 억제 조건 확립	100	- 헬리코박터균의 생육을 억제하는데 효 과가 우수한 젓산균을 16s rRNA sequence를 통해 분리, 동정하였으며, <i>H. pylori</i> 와 동시 배양과 배양액에 의 한 효과를 확인
		유산균과 복합체의 헬리코박터균 생장억제에 대한 synergy 확인 및 최적 조건 확립	100	- 유산균별 IgY, 목이버섯 추출물의 복합 적용을 통해 헬리코박터균 생장억제에 대한 효과적인 농도 설정 및 실험 조건 확립을 통한 최적 농도 확정 실험

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2011- 2012)	항-헬리코박터 항체복합체를 포함하는 건강기능식품 개발	발효유 제품 생산 및 생산제품	100	- 최종 제품 선정(발효유) 및 제품 생산 시 공정 단계별 규격 적합성 - 영양성분검사, 보존검사, 관능검사
		간이 임상실험을 통한 효과검증	100	- 간이 임상 대상자 선정 및 진행방법 협의 - 생산제품을 통한 간이 임상실험 - 최적 용량 시험
	헬리코박터균 항원 및 항체복합체 개발	정제, 농축된 난황항체 정제 및 농축 확립과 고순도, 고역가 난황항체 제품 생산	100	- 산업화를 위한 효율적 항체 정제 방법 확립 - 대량생산에 맞는 Ultrafiltration을 이용한 항체 농축 방법의 조건 설정
		헬리코박터균 부착 억제 효과를 가지는 항체복합체 임상시험 평가 지원	100	- 임상시험용 난황항체, 목이버섯추출물, 유산균 생산 - 임상시험용 난황항체, 목이버섯 추출물의 품질평가
		항-헬리코박터 유산균의 산업화 연구	100	- 기능이 확인된 유산균의 산업적 생산을 위한 제품화 연구
		헬리코박터 표면 특이단백질에 대한 항원 개발	100	- 헬리코박터에 부착 특이성이 높은 항체 개발을 위한 monoclonal antigen 개발 - 항원 종류에 따른 항체 역가 및 함량 비교, 분석
	항-헬리코박터균 난황항체 생산	항-헬리코박터균 난황항체 생산 및 난황액 제조	100	- 임상시험용 면역란 생산 - 난황항체 정제, 농축시험용 면역란 생산 - 면역란 생산 시스템 구축
	항-헬리코박터 유산균 개발 및 항체복합체 효능 확인	유산균별 최적 배양 조건 설정 및 lab scale 산업화 배양 연구	100	- 식품용 배지 조건에 따른 배양 - Jar-fermenter 수준의 lab scale up 적용하여 배양 안정화 조건 설정
		대량 생산된 유산균의 항-헬리코박터 기능 검증	100	- Scale-up 공정에 의해 배양된 유산균의 항-헬리코박터 기능 확인

제 2 절 관련분야에의 기술발전예의 기여도

본 연구과제를 통하여 *H. pylori*에 의한 고역가 항체와 생육억제 복합물을 활용한 위장질환 개선 기능성 소재 개발의 기초 자료를 제시하였다. 또한 복합물 각각의 기능성 식품 원료로서 활용이 가능한 소재의 개발 공정을 확립하여 식품산업에 있어 다양하고 새로운 종류의 제품을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.

기존 기술 개발의 단일 소재로 쓰였던 소재들의 복합적 synergy 효능 뿐 아니라 기능성 식품으로의 적용에 필요한 최적의 용량 또한 본 연구를 통하여 입증하였다.

본 연구를 통하여 *H. pylori*의 생육억제 기능이 우수한 재료 및 유산균을 확립하였다. 또한 위벽세포에 대한 *H. pylori* 부착억제 기능이 우수한 목이버섯 추출물의 구조를 확립하고 생산하였다.

이를 바탕으로 *H. pylori* 생육을 억제하는 항체 복합체를 개발하였으며, 위염 개선효과가 있는 기능성 유제품, 건강기능 식품으로 개발하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연차별 연구성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 생산 입판 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도										
2차년도	1							1		
3차년도										
계	1							1		

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자		학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	공동저자				
2010	김치와 타락에서 분리한 젓산균의 <i>Helicobacter pylori</i> 에 대한 항균 효과	이영덕	유혜림 외 3명	한국식품영양학 회지	vol 23, No 4, pp664~669	국내	학진 등재지

3. 특히 성과

특히 출원 성과					
출원연도	특히명	출원인	출원국	출원번호	비고
2011	<i>Helicobacter pylori</i> 에 대한 항균 효과를 가지는 유산균	남양유업 외	대한민국	출원 예정	

4. 실용화*산업화 계획

- 소재 제품화 계획

본 과제를 통하여 개발된 항 헬리코박터 난황항체 제품 생산을 실시 할 계획이다. 최우선적으로 건강기능식품 및 기능성 유제품 등의 완제품과 기능성 원료를 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획이다.

나아가 *H. pylori* 표면 특이단백질에 대한 항원 분리, 정제하여 항원성을 높힌 특이성이 높은 항체를 개발하여 생산할 계획이다.

5. 교육*지도*홍보 등 기술 확산 계획 등.

- Sales kit

항 헬리코박터 난황항체 복합체의 Sales kit를 작성, (주)비케이바이오의 소재 영업망을 통하여 제품을 적극 적으로 홍보할 예정이다. Sales kit 작성 및 샘플 제공을 통하여 각 식품회사에서 제품 개발에의 적용을 적극 추진하고 신규 매출 확보를 목표로 한다.

- 해외 전시회 참가.

중소기업 지원제도를 활용하여 해외 전시회 참가를 통한 난황항체의 해외 홍보를 적극적으로

추진할 계획이다. 또한 현재 (주)비케이바이오와 협력중인 유럽 및 아시아 등의 해외업체와의 co-marketing을 추진하여 수출을 도모할 계획이다.

6. 추가연구, 타연구에 활용 계획

제품의 품질향상, 제조원가 절감 등을 위한 추가 연구를 통하여 up-grade를 추진 계획이다. 또한 수용성 쌀 단백질의 기능성에 관한 추가 *IN-VIVO* 및 *IN-VITRO* 실험을 실시하고, 개별 인증형 등록을 목표로 연구를 진행하며 식품관련 정부출연기관들의 개별인증형 지원사업 등에 적극적으로 참여할 계획이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

1. 해외 IgY 제품 개발 사례

가. Ovalgen HP

- 일본에서 개발된 제품으로 난황의 IgY를 이용한 기능성 식품원료이다. 항체생성 기전은 모체의 항체가 태반을 통해 태아에게 전달되듯이 닭의 항체가 난황으로 전달되며 닭을 통해 항체를 생성하여, 다른 동물, 인간에게 수동 면역 작용을 하게된다.
- H. pylori에 유발되는 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 위암 등의 예방목적으로 섭취하게 되며, 유제품, 캔디 등에 적용하여 판매되고 있다.

● 쥐 대상 실험 결과

농도별 쥐에게 섭취를 시키고 일정 시간이 지난 후 위 내 세균 수를 측정한 결과이다.

Treatment	Log ₁₀ CFU / 0.1g gastric tissue / mouse	Negative mouse / Total mouse
Negative control	0.00±0.00	6 / 6
Positive control	3.64±0.39	0 / 10
0.25% Ovalgen®HP	3.08±0.79	0 / 10
2.5% Ovalgen®HP	1.26±1.47**	5 / 10#
25% Ovalgen®HP	0.94±1.53**	7 / 10##

**; p<0.01 compared to positive control group value, T test
#, ##; p<0.05 and 0.01 compared to positive control group, chi-square test

나. Ovalgen DC

- S. mutans에 의해 발생하는 충치의 예방효과를 가지고 있다. S. mutans가 치아에 부착하기 위해 glucan을 형성해야하는데 S. mutans가 분비하는 GTase는 숙주가 섭취하는 scrose에 의해 활성화하여 glucan을 형성하게되며, 이 glucan으로 인해 S. mutans는 항체나 환경 스트

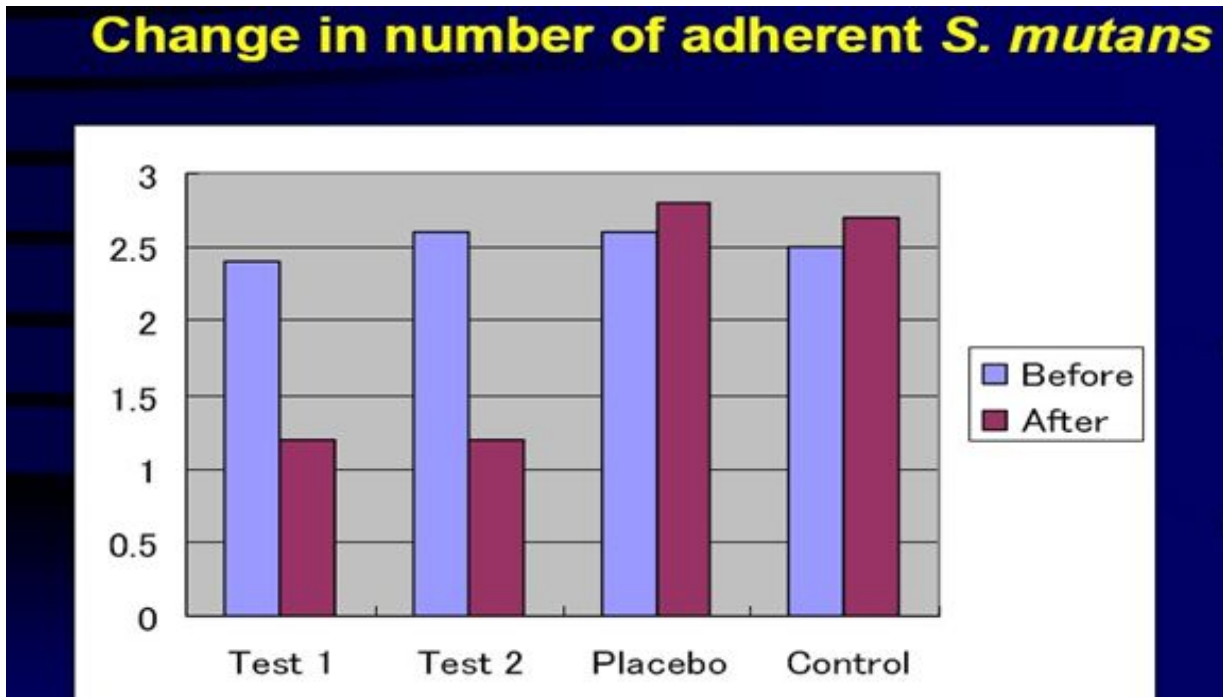
레스로부터 저항을 하여 생육을 하게된다.

- Ovalgen DC는 GTase를 항원으로 면역화한 항체이기 때문에 *S. mutans*가 분비하는 GTase의 활성을 저해함으로써 치아부착능력을 억제할 수 있다.

● 임상실험 결과

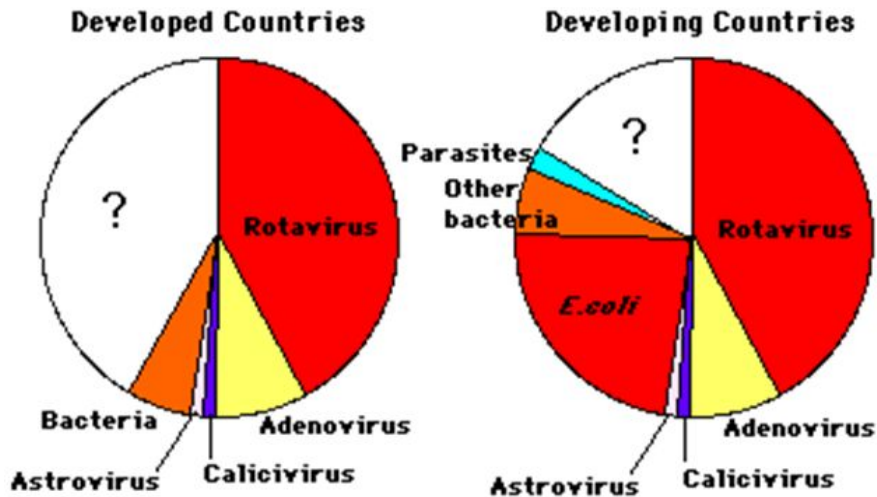
대상자는 Ovalgen DC 트로키제를 5일간 하루 5회 제공받고, 부착 충치균 수, 총 충치균 수, 총 혐기성균 수를 측정하였다.

Control군과 복용전에 비해 유의적으로 충치균이 감소한 것을 볼 수 있다.



다. Ovalgen RV

- Rotavirus는 선진국 및 개발도상국 유아(5세미만)의 가장 큰 설사원인으로 알려져있다.



- 본 소재는 항-로타이러스 IgY를 첨가한 분유 등에 적용하여 유아 설사를 유발하는 로타바이러스에 직접 작용하여 감염성을 저해하는 기능성 소재로 접근 가능

제 7 장 참고문헌

- C Y Hachem, J E Clarridge, D G Evans, D Y Graham., Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol(1995) 48:741-716
- Calin Stoicov, Reza Saffari, JeanMarie Houghton., Green tea inhibits Helicobacter growth in vivo and in vitro. International Journal of Food Microbiology(2009) 473-478
- CS Goodwin, ED Blincow, JR Warren, TE Waters, CR Sanderson., Ebaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J Clin Pathol(1985) 38:1127-1131
- Deisy Hervert-Hernandez, Concepcion Pintado, Rafael Rotger, Isabel Goni., Stimulatory role of grape pomace polyphenols on Lactobacillus acidophilus growth. International Journal of Food Microbiology(2009) 119-122
- F. Javier Hernandez-Campos, E. Brito-De la Fuente, B. Torrestiana-Sanchez., Prification of egg yolk immunoglobulin(IgY) by ultrafiltraion: Effect of pH, Ionic Strength, and Membrane Properties. J. Agric. Food Chem(2010) 58:187-193
- Katsuhiro Mabe, Masami Yamada, Itaro Oguni, Takahashi., In vitro and In vivo activities of tea catechins against Helicobacter pylori. Antimicrobial agents and chemotherapy(1999) 1788-1791
- P.D. Midolo, J.R. Lambert, R. Hull, F. Luo, M.L. Grayson., In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by orgarnic acids and *lactic acid bacteria*. Journal of Applied Bacteriology(1995) 79:475-479
- Per Hansen, Judith A. Scoble, Brendon Hanson, Nicholas J. Hoogenraad., Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. Journal of Immunological Methods(1998) 1-7
- Surasak Boonyaritichaij, Kentaro Kuwabara, June Nagano, Kiyoshi Kobayashi, Yasuhiro Koga., Long-term administration of porbiotics to asymptomatic pre-school children for either the eradication or the prevention of *Helicobacter pylori* infection. Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter(2009) 14:202-207
- Shobna J. Bhatia, Neena Kochar, Philip Abraham, Nirmala G. Nair, Ajita P. Mehta., *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. Journal of

Clinical Microbiology(1989) 2328-2330

Shu Pang Chou, R. Dular, Shanti Kasatiya., Effect of Ferrous Sulfate, Sodium Metabisulfite, and Sodium Pyruvate on Survival of *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology(1983) 986-987

T. Ulf Westblom, Eli Madan, Bentley, R. Midkiff., Egg Yolk Emulsion Agar, a New Medium for the Cultivation of *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology(1991) 819-821

Wee Tee, Stephen Fairley, Richard Smallwood, Brian Dwyer., Comparative Evaluation of Three Selective Media and a Nonselective Medium for the Culture of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsies. Journal of Clinical Microbiology(1991) 2587-2589

Yuichi Akai, Noriko Nakajima, Yoko Ito, Teruaki Matsui, Ariyosi Iwasaki, Yasuyuki Arakawa., Green tea polyphenols reduce gastric epithelial cell proliferation and apoptosis stimulated by *Helicobacter pylori* infection. Nihon university school of medicine(2006)

Yeonhee Lee, Enjoo Shin, Jinhui Lee, Jaehak Park., *Lactobacillus acidophilus* inhibits the *Helicobacter pylori* adherence. J. Microbiol. Biotechnol(1999) 9(6):794-797

김인호, 이용택, 이청희, 정봉현., 계란 면역 단백질(IgY)의 정제 연구. 한국생물공학회지(1999) 6:677-681

박민정, 김주성, 임정윤, 정현채, 송인성, 유은실, 이정준, 허철성, 백영진., *Lactobacillus*가 함유된 발효유에 의한 인체 위점막에서의 *Helicobacter pylori* 억제효과. 대한소화기학회지(2001) 38:233-240

이주연, 이만형., Affinity Chromatography를 이용한 재조합 *Helicobacter pylori* urease의 분리 정제. Korean Journal of Life Science(2003) 67-72

정후길, 강응률, 전석락., *Helicobacter pylori*의 생육을 특이적으로 억제하는 유산균 선발. The Korean Journal of Microbiology, Vol 37(2001) 151-157