

최 종
연구보고서

산란계를 이용한 항-살모넬라 갈리나룸 IgY 개발 연구

Development of IgY against *Salmonella gallinarum* using layers

연 구 기 관
한 국 식 품 개 발 연 구 원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산란계를 이용한 항-살모넬라 갈리나룸 IgY 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 노 정 해

연 구 원 : 김 영 봉

연 구 원 : 한 찬 규

연 구 원 : 성 기 승

위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 지 차 호

연 구 원 : 모 인 필

요 약 문

I. 제 목

산란계를 이용한 항-살모넬라 갈리나룸 IgY 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

가금 티프스의 원인균인 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*) 항원을 산란계에 접종하여, 난황 특수 면역 단백질을 생산한 후, 이 특수 면역 단백질을 함유한 수용성 단백질을 사료나 물에 첨가하여 가금 티프스병 예방 소재로 활용한다.

2. 연구의 필요성

가금 티프스의 발병 빈도는 증가되고 있으나 현재까지 완벽한 가금 티프스 예방약이 개발되어 있지 않다. 가금 티프스를 예방접종을 실시한 경우에도 가금 티프스가 유행되면 산란 중인 닭에 항생제나 항균제를 과용으로 사용하여 계란에 잔류약제 성분이 일부 이행되어 계란을 식용으로 이용할 수가 없다. 따라서 잔류약제 성분이 전혀 없는 계란을 생산하기 위한 기술 개발이 시급하다.

산란계 한 마리당 질병 예방 치료약값은 산란전까지 평균적으로 420원이 소요되며 그중에서도 가금 티프스 예방을 위해서는 170원

이 든다. 가금 티프스 예방 약값이 전체 예방 약값의 무려 40% 이상이나 차지하는 셈이 된다. 그러나 이 병은 근절이 안되고 일단 감염되면 그 농장 산란계는 거의 폐사하므로 10만수 농가의 경우에 10억원이상 손해를 보며, 전국적인 피해 단위는 대단히 크다.

현재 사용되고 있는 각종 가금 티프스를 위한 예방약이나 항생제 등에 의해서 난황 내에 이와 같은 물질이 잔류되는 문제점을 완화함으로써 식용 가능한 안전한 식품을 생산공급 할 수 있다. 주부들이 소비자 보호원 등에 계란을 식용 불가능한 식품으로 고발 및 신고하는 사회적 문제점을 최소화시킬 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도

항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 생산

가금 티프스를 실제적으로 발생시키는 살모넬라 갈리나룸 균주를 확보하고 배양하여 백신을 마련하여 항원화 기술을 확립한다. 특수 사료를 개발하여 산란계에 급여시험을 수행한다. 난황내의 항체 함량을 높이기 위해 사료 첨가제를 일반사료와 혼합하여 급여한 후, 첨가수준별 total IgY와 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 함량을 분석한다. 효율적인 면역 프로그램 정립을 위하여 백신 주사 시 adjuvant 종류, target 균 외의 첨가균의 여부에 따른 계란 내의 총 IgY 함량과 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 함량을 분석한다. 산란계의 면역 연령에 따른 산란율을 비교하여 면역처리에 따른 산란율 감소를 최소화한다. 기존 예방법 시험 결과에 대한 IgY 이용 방법의 상호 비교 분석을 실시한다.

2차년도

항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 특성

1차년도에 확립된 항원화 기술과 면역처리 기술에 따라 산란계를 공시하여 IgY 생산한다. 면역처리된 계란으로부터 특수 면역단백질을 추출 정제한 후 항체 분자량을 측정한다. 면역항체의 열 안정성과 pH 안정성을 시험한다. 생산된 specific IgY의 효과를 면역침강법, ELISA 법 등에 의해 조사하고 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 선택성을 살모넬라 갈리나룸과 유사한 균들을 비교하면서 분석한다.

3차년도

항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 효능

중규모 시험 농장에서 산란계를 사용하여 특수항체를 생산한다. 대량생산된 계란으로부터 조항체를 대량 분리하고 조항체의 냉동 건조와 잔존 역가를 실시한다. 산란계 사료에 specific IgY를 활용하기 위한 시험으로 조항체 분말의 사료 내 안정성을 평가한다. 산란계용 IgY의 가금 티프스에 대한 예방 및 치료 효과 시험한다. 위의 결과들을 바탕으로 경제성 분석과 종합적 평가를 실시한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가금 티프스의 원인균인 *Salmonella gallinarum*(ATCC 9148) 균주를 배양하여 백신 항원으로 사용한 결과 계란으로부터 성공적으로 *Salmonella gallinarum*에 선택적으로 작용하는 항체가 생성되었다.

참숫 0.5%, 0.25%를 일반사료에 첨가 시 total IgY 및 specific IgY 함량이 모두 증가하였고 참숫의 급여가 많을수록 IgY함량이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 참숫의 급여는 백신투여에 의한 산란계의 산란을 감소를 효과적으로 억제한 것으로 나타났다.

산란계 면역 투여 시 Freund's adjuvant가 가장 많은 total IgY 및 specific IgY를 생산하였으며, 여기에 BCG를 함께 투여시 보다 많은 total IgY와 specific IgY를 생산하는 상승효과를 나타내었다.

국내분리 가금 티프스균에 대한 항생제에 대한 감수성이 급격히 저하되어 현장에서 사용할 수 있는 항생제가 매우 제한되어 있음을 알 수 있다. 또한 겔, 오일백신에 의한 사독백신 프로그램은 어느 정도 효과는 있지만 전반적으로 가금 티프스를 방제할 수 있지는 못하다는 것으로 나타났다. 현재까지의 가금 티프스 예방방제 방법들을 비교할 때 가금 티프스 사독백신 접종을 2회 실시하고 생균제 투여를 어린 병아리에서부터 투여하는 방법이 지금까지의 방법 중에서는 가장 효과적인 것으로 나타났다.

가금 티프스 발생균인 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) 항원을 산란계에 접종하여, 제2차 사양시험을 실시하였다. 계란으로부터 이 특수 면역단백질을 함유한 수용성 단백질을 분리하고 분리된 시료는 동결건조를 통해 분말화하였다. Total IgY는 84.2 mg/mL로 76.7 mg/mL의 대조구보다 약간 높은 경향을 나타내었다. Specific IgY는 *Salmonella gallinarum* 처리구의 경우 대조구에 비해 약 190배 정도 높은 함량을 나타내다.

SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 Chick IgG band는 140 kDa과 232 kDa 사이에서 나타났다. 180 kDa의 band의 density를 전체 band들의 density의 합으로 나누어서 순도를 측정한 결과 natural gum 방법은

약 20%가 IgY로 밝혀졌다. Sepharose CL-6B을 이용하여 난황항체 IgY solution의 chromatography를 실시한 결과 3개의 peak가 나타났으며 2 번째 peak fraction이 chicken IgY로 확인되었다.

pH안정성을 검토한 결과 *Salmonella gallinarum* 처리구의 total IgY 및 specific IgY 모두 pH 4~10까지 대체로 안정된 경향을 나타내었다. Total IgY는 60℃에서 10 min간 열처리를 하는 경우에도 88.6%의 높은 잔존량을 보여주었다. Specific IgY 또한 50℃와 60℃에서 모든 처리구가 약 87.4~99.7%의 높은 함량으로 유지됨이 관찰되었다. 세 종류의 *Salmonella* 균주 (*gallinarum*, *typhimurium*, *enteritidis*)에 대한 특이항체의 균주 특이성을 비경합 간접 ELISA로 조사한 결과, 특이항체와 반응성이 가장 뛰어난 균주는 *S. gallinarum*이었으며 다음으로 *S. enteritidis*였고 *S. typhimurium*은 시험한 균주 중 가장 낮은 반응성을 나타내었다.

중규모 농장 시험으로 특수항체를 생산해 내었으며 대량 생산된 IgY 분말의 사료 또는 음수 중에 섞었을 때의 안정성을 조사한 결과 48시간 내에는 역가의 변화가 없는 것으로 나타났다. 항-살모넬라 갈리나룸 IgY는 살모넬라 갈리나룸의 성장을 늦추는 것으로 나타났으며, 살모넬라 갈리나룸과 IgY가 선택적으로 결합하여 커다란 균괴를 이루고 있는 모습을 관찰하였다. 실험실적으로는 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 효능이 입증되었으나 산란계로의 직접 투여 시 낮은 농도의 IgY 투여로는 뚜렷한 효과를 증빙하기에 부족함이 있었다.

2. 활용에 대한 건의

계란으로부터의 항체생산은 그 생산비가 저렴하고 지속적이며, 이 연구를 통하여 현장에서 곧바로 적용할 수 있는 기술이 확립되었으

므로 중소기업, 농가, 벤처회사 등에서의 기술이전을 쉽게 유도할 수 있다. 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 생산기술은 다른 항원을 이용한 생산 기술에 응용할 수 있어 추후 다른 기술 개발에 적극적으로 활용될 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of IgY against *Salmonella gallinarum* using layers.

II. Objectives and Rationales of the study

1. Objective

The objective of this study is to prevent the main disease of layers, fowl typhoid, using immunoproteins in egg yolk which produced by vaccination of *Salmonella gallinarum* to laying hens.

2. Rationale

Fowl typhoid has been shown the most predominant outbreak among the salmonellosis in Korea during a year. However, there is no effective method to prevent fowl typhoid. Immunoproteins instead of antibiotics which are not allowed will lessen the risk of fowl typhoid in a layer farm and will provide safe foods to consumers.

III. Research scope

1. Production of anti-*Salmonella gallinarum* IgY

- Applying feed additives to increase immunoproteins
- Vaccines of *Salmonella gallinarum*
- Establishing vaccine schedule
- Separating water soluble protein fraction from egg yolk
- Preventing decrease of laying rate
- Non Competitive Sandwich ELISA

2. Properties of anti-*Salmonella gallinarum* IgY

- Producing IgY with laying hens
- Separating water soluble protein fraction from egg yolk
- Purifying IgY by ion exchange chromatographic system
- Measuring molecular weight by SDS-PAGE
- Stability of pH & heat
- Selectivity of IgY on *Salmonella gallinarum*

3. Effectiveness of anti-*Salmonella gallinarum* IgY

- Producing IgY with laying hens
- Antimicrobial activity of IgY by ELISA method
- Binding ability to antigen
- Producing additives for layer feeds
- Preference test with layers
- Analyzing effect of IgY in field test

- Analyzing the cost of IgY production

IV. Results

1. Result

Salmonella gallinarum which collected from the chicks suffering from fowl typhoid. Vaccination of *Salmonella gallinarum* to layers resulted in production of anti-*Salmonella gallinarum* IgY successfully in eggs. Additives to feeds of laying hens, such as wood charcoal increase total & specific IgY in eggs. Addition of BCG and application of Freund's adjuvant in vaccine enhanced IgY activity. *Salmonella gallinarum* found in fowl typhoid in Korea showed insensitivity to antibiotics.

Salmonella gallinarum was vaccinated to layers to produce anti-*Salmonella gallinarum* IgY. Water soluble fraction(WSF) which was rich in anti-*Salmonella gallinarum* IgY from yolks was separated and powder of WSF was prepared by freeze-drying. IgY band was observed between 140 kDa & 220 kDa in non-reducing SDS-PAGE. Around 20% of protein from water soluble fraction was IgY. There were three peaks by ion exchange chromatography and the second peak assigned to IgY. 89% of total IgY remained after heating at 60°C for 10 min. IgY was relatively stable at pH 4~10. IgY was susceptible to bind *Salmonella gallinarum* exclusively.

Anti-*Salmonella gallinarum* IgY was produced in farm scale. Powder of anti-*Salmonella gallinarum* IgY was relatively stable when it was mixed with feed or water. Anti-*Salmonella gallinarum* IgY retarded the growth of *Salmonella gallinarum* and large coagulation with anti-*Salmonella gallinarum* IgY and antigens were observed by microscopic results. Field test inconsistently corresponded to laboratory test and IgY showed insufficient effect to decrease fowl typhoid. Cost to produce IgY powder from an egg was about 150 won/egg.

2. Suggestions

Production of antibody using layers was economical and causing no side-effect. The techniques to produce anti-*Salmonella gallinarum* IgY can be applied to other antigens and induce further progress in the industrial field easily.

CONTENT

Chapter 1. Introduction	17
Part 1. Objective & Scope of the study	17
1. Rationale of the study	17
2. Objective of the study	18
3. Scope of the study	19
Part 2. State-of-the-art	21
1. International status	21
2. Domestic status	34
Chapter 2. Production of anti- <i>Salmonella gallinarum</i> IgY	40
Part 1. Introduction	40
Part 2. Materials and method	41
Part 3. Results and Discussion	47
Chapter 3. Properties of anti- <i>Salmonella gallinarum</i> IgY	70
Part 1. Introduction	70
Part 2. Materials and method	71
Part 3. Results and Discussion	78
Chapter 4. Effectiveness of anti- <i>Salmonella gallinarum</i> IgY	104
Part 1. Introduction	104
Part 2. Materials and method	105

Part 3. Results and Discussion	114
Reference	150

목 차

제 1 장 서 론	17
제1절 연구개발의 목적과 범위	17
1. 연구의 필요성	17
2. 연구개발의 목적	18
3. 연구의 범위	19
제2절 기존 연구사례	21
1. 국외현황	21
2. 국내현황	34
제 2 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 생산	40
제1절 서론	40
제2절 재료 및 방법	41
제3절 결과 및 고찰	47
제 3 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 특성	70
제1절 서론	70
제2절 재료 및 방법	71
제3절 결과 및 고찰	78
제 4 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 유효성	104
제1절 서론	104
제2절 재료 및 방법	105

제3절 결과 및 고찰	114
참고문헌	150

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

가금 티프스의 발병 빈도는 증가되고 있으나 현재까지 완벽한 가금 티프스 예방약이 개발되어 있지 않다. 가금 티프스를 예방접종을 실시한 경우에도 가금 티프스가 유행되면 산란 중인 닭에 항생제나 항균제를 과용으로 사용하여 계란에 잔류약제 성분이 일부 이행되어 계란을 식용으로 이용할 수가 없다. 따라서 잔류약제 성분이 전혀 없는 계란을 생산하기 위한 기술 개발이 시급하다.

농진청 수의과학연구소에서 가금 티프스에 대한 예방약을 개발하여 1995년 8월 생산기술을 5개 백신 제조업체에 전수시켰다. 사균겔백신과 오일백신으로 2회 접종하고 있지만 가금 티프스 예방에 어느정도 효과는 인정되나, 이 병이 근절되고 있지는 않으며, 가금 티프스를 방제하는데 아직도 많은 어려움이 있다. 특히 산란계에 가금 티프스가 왔을 때는 Terminator를 사료에 첨가하여 주고 있지만 속수 무책이며, 아직도 계란에 이행되는 약제 잔류 성분이 오일백신에서 왔는지, Terminator에서 왔는지, 항생제에서 왔는지 규명이 안되고 있으나, 약 냄새나고 혀가 아리는 계란에 대한 소비자들의 고발은 계속되고 있다. 이런 현상은 현재 사용하고 있는 가금 티프스 예방약으로는 안전한 계란을 생산하는데 한계가 있다는 것

을 의미하며, 새로운 타입의 예방을 위한 신제품 개발을 요구하고 있다.

나. 경제·산업적 측면

산란계 한 마리당 질병 예방 치료약값은 산란전까지 평균적으로 420원이 소요되며 그중에서도 가금 티프스 예방을 위해서는 170원이 든다. 가금 티프스 예방 약값이 전체 예방 약값의 무려 40%이상이나 차지하는 셈이 된다. 그러나 이 병은 근절이 안되고 일단 감염되면 그 농장 산란계는 거의 폐사하므로 10만수 농가의 경우에 10억원이상 손해를 보며, 전국적인 피해 단위는 대단히 크다.

한편 산란계는 동물 코스트면이나 사료 코스트 면에서 비교적 저렴하여 난황으로부터 면역단백질을 비교적 저렴한 가격으로 생산해 낼 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

현재 사용되고 있는 각종 가금 티프스를 위한 예방약이나 항생제 등에 의해서 난황 내에 이와 같은 물질이 잔류되는 문제점을 완화함으로써 식용 가능한 안전한 식품을 생산공급 할 수 있다. 주부들이 소비자 보호원 등에 계란을 식용 불가능한 식품으로 고발 및 신고하는 사회적 문제점을 최소화시킬 수 있다.

2. 연구개발의 목적

가금 티프스의 원인균인 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*) 항원을 산란계에 접종하여, 난황 특수 면역 단백질을 생산한 후, 이 특수 면역 단백질을 함유한 수용성 단백질을 사료나 물에

첨가하여 가금 티프스병 예방 소재로 활용한다.

3. 연구의 범위

가. 1차년도

1) 살모넬라 갈리나룸 항원화 기술

가금 티프스를 실제적으로 발생시키는 균주를 확보하고 배양하여 백신을 마련한다.

2) 총 IgY 및 specific IgY 역가 측정

- 난황에서 water soluble protein fraction 분리

난황에는 단백질 외에도 인지질이 많이 존재하여 IgY의 항원항체 반응을 저해한다. 그러므로 난황에서부터 인지질을 제거하고 IgY가 많이 존재하는 water soluble fraction을 분리한다.

- Non Competitive Sandwich ELISA

수용성 단백질 분획을 여러 단계로 희석하여 total IgY와 specific IgY 함량을 non-competitive sandwich 방법으로 측정한다.

3) 난황 내 항체 제고 기술 개발

특수사료를 개발하여 산란계에 급여시험을 수행한다. 난황내의 항체 함량을 높이기 위해 사료 첨가제를 일반사료와 혼합하여 급여한 후, 첨가수준별 total IgY와 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 함량을 분석한다.

4) 산란계 면역처리기술

- 효율적인 면역 프로그램 정립

백신 주사 시 adjuvant 종류, target 균 외의 첨가균의 여부에 따른 계란 내의 총 IgY 함량과 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 함량을 분석한다.

- 산란율 감소방지기술

산란계의 면역 연령에 따른 산란율, 계란 내의 총 IgY 함량과 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 함량을 분석한다.

5) 현행예방법 효율성 비교

사독백신투여농장, Terminator 사용농장, 쌀콘사료 투여농장, 일방향생제 (겐타마이신)투여 농장, 경쟁적 배제제제 투여 농장, 복합적 방법 사용농장에 대한 기존 예방법 시험 결과에 대한 상호 비교 분석을 실시한다.

나. 2차년도

1) 산란계를 공시하여 IgY 생산 시험

1차년도에 확립된 항원화 기술과 면역처리 기술에 따라 항-살모넬라 갈리나룸 IgY를 생산한다.

2) 면역처리된 계란에서 특수 면역단백질 분리 정제

계란 난황으로부터 인지질 제거한 수용성 조단백의 추출하고 이를 chromatography에 의해 정제한다. SDS-PAGE 전기영동에 의해 항체 분자량 등을 측정한다.

3) 면역항체의 stability 측정

IgY 수용액과 IgY powder solution의 열 안정성과 pH 안정성을 시험한다.

4) Specific IgY의 유효성 검사

ELISA 방법에 의한 antimicrobial activity 조사하고 *Salmonella gallinarum* 성장을 통한 IgY 효과 조사한다.

5) 면역항체의 균주 선택성

개발된 IgY의 *Salmonella* 에 관한 균주 선택성을 조사한다.

다. 3차년도

1) 중규모 시험을 통한 특수항체 생산 시험

시험 농장 단위의 산란계 사육에 의해 특수항체를 생산한다.

2) 수용성 단백질 및 항체 대량 분리 시험

조항체를 대량 분리하고 냉동 건조한 후 잔존 역가를 평가한다.

3) 산란계 사료에 Specific IgY 활용시험

조항체 분말이 사료와 음수 내에서 안정한가 평가한다.

4) 산란계 사료에의 활용 시험

산란계 시험을 통한 기호성 및 용법용량 시험을 실시한다. 또한 산란계의 가금 티프스 예방 효과를 비교한다.

5) IgY 생산비 분석

IgY의 생산비용을 산출하여 경제성 분석과 종합적 평가를 실시한다.

제2절 기존 연구사례

1. 국외현황

가. 가금 티프스

가금 티프스 백신에는 생균백신과 사균백신이 있다. 일반적으로 사균백신 보다는 생균백신이 세포성 면역에도 우수한 것으로 보고되고 있으나, 양쪽 모두에 문제점을 가지고 있는 것도 사실이다. 생균백신은 1950년대 말에 개발되어 전반적인 오염이 심한 남미나 중동 및 아프리카 등을 중심으로 이용되어 왔으며, 사균백신은 오

염이 미약한 지역에서 박멸의 전단계로서 이용되어 왔다.

생균백신으로 이용되는 균주는 실험실내에서 병원성을 떨어뜨린 것으로서 9R균주와 9S균주가 있으며, 이 중 9S균주는 항체 형성능이 9R균주 보다는 우수하나 어린 병아리에서의 간 및 비장등에서의 병변과 산란율 감소 등의 부작용이 있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 이유로 9R균주가 가끔 티프스 상재지역에서 비교적 널리 이용되어 왔으나 야외 강독주에 대해서는 방어효과가 제한적이며, 백신주 자체의 강독주로의 전환 가능성과 난계대에 의한 병아리에서의 피해 가능성 등의 위험성이 내포되고 있다.

사균백신은 균체를 포르말린으로 사멸시킨 것이며, 겔백신과 오일백신이 생산되고 있다. 일반적으로 겔백신은 부작용이 덜하고 흡수가 빠르고 효과가 빨리 나타날 수 있으나 면역지속 기간이 짧은 단점이 있다. 반면 오일백신은 겔백신 보다 면역지속 기간이 긴 장점이 있으나 흡수가 느리기 때문에 특히 육계의 경우 상품적 가치를 떨어뜨릴 수 있으며, 대부분의 닭에서 발열과 거동불안, 산란율 저하 및 사료섭취 감소 등의 부작용이 다양하게 나타날 수 있다. 그러나 사균백신은 세포면역에는 발효 안되는 문제점이 있다. 독일 수의과학연구소의 Habil Horst Meyer 박사(1995)는 살모넬라균 억제 방안으로서 생독 백신 접종을 통한 감염 예방, 생균제 투여로 장내 유산균의 성장을 촉진하여 살모넬라균 억제, 탄수화물 공급으로 장내 살모넬라균 집락 차단, 사료의 펠릿화로 오염 감소 화등의 방안을 제시했다.

특히 생독 백신은 살모넬라 감염을 예방하는 세포성 면역을 촉진시키고 생독 백신의 경구 투약 후 장내에서의 면역 효과를 확인할 수 있다. 불활화 백신에 비해 생독 백신은 다음과 같은 이점이 있

다. 투여량이 적고, 효과가 빨리 나타나고, 대부분의 경우 효과가 뛰어나고, 여러 살모넬라 혈청형 변이주에 교차 방어효과가 있고, 살모넬라 발현이 현저히 감소한다.

살모넬라 티피뮤리움 생독 백신 Zoosaloral H.는 현재 독일에서 공인되어 계군에게 사용되고 있는데 이 백신은 살모넬라 티피뮤리움에 대해서는 동형방어(homologous protection)를, 살모넬라 엔테리티디스에 대해서는 이형방어(heterogous protection)를 야기시킨다(교차방어효과). 생독백신 Zoosaloral H는 살모넬라 티피뮤리움의 영양요구성 돌연변이체의 2배 희석액으로 경구 투약 후 최대 2-3주 동안 동물체 내에 머무르며, 이 기간 동안 변으로 배설되지 않으며 이때의 면역 투여량은 2×10^8 이다.

현재 독일에서 산란계 및 육용종계의 살모넬라 티피뮤리움과 살모넬라 엔테리티디스 감염을 예방하기 위해 공인된 백신 계획은 12주령안에 백신 접종을 세 번 실시하는 것으로 되어 있다. 이어서 산란하기 3주전에 재 경구투약(추가 항원자극)이 뒤따른다. 이러한 면역 계획은 모든 종계에게 제한없이 사용될 수 있다. 계군의 살모넬라 감염 위험성이 매우 높을 때, 3개월 간격의 반복적인 추가항원자극(boosting)을 성계에 실시할 것을 권장하는 사람도 있다. 그러나 이 백신주가 계란에 잔류하지 않음에도 불구하고 아직 독일에서는 허용되고 있지 않다.

계군의 모든 닭에게 백신을 접종함으로써 면역성을 획득시킨 후, 살모넬라 엔테리티디스와 살모넬라 티피뮤리움의 분리는 발견되지 않았고, 사람에게의 감염도 발견되지 않았다. 독일에서의 살모넬라 발병율(10만 수당 감염수수)은 1987년의 최고치 152수에서 1988년과 1989년에는 약 2수로 현저히 떨어졌다. 이와같은 양호한 결과

는 모든 닭의 완벽한 면역획득이 효과적인 관리 및 엄격한 동물 위생대책과 함께 이루어질 때 가능하다. 그러나 살모넬라 갈리나룸에 대한 보고는 없다.

네델란드 Intervat사의 연구를 보면 사균백신을 접종한 경우는 접종 당시에는 어느 정도의 면역을 형성하는 듯 보이지만 공격시험을 통해 여전히 살모넬라균에 대한 감수성을 가지고 있어 사균백신의 접종으로는 충분한 면역이 형성되지 못한다. 반면에 생균백신을 접종한 계군은 살모넬라에 대한 충분한 방어능력을 형성했고 분변 검사를 통해 생균백신 접종 후 우려되는 균의 전파도 거의 이루어지지 않는다.

생균백신이 산란에 미치는 영향을 보면 공격시험을 실시하지 않은 대조군보다도 더 많은 계란 생산의 증가를 나타냈고, 계란을 통한 전염도 없었다. 따라서 가금 티프스의 효과적인 방제를 위해서는 효과가 빠르고 확실한 면역 형성을 가져올 수 있는 생균 백신("노빌리스-SG 9R")의 사용도 고려해 보는 것이 바람직하다고 Intervat사에서는 주장했다.

나. IgY

포유류(태생동물)의 신생아는 모친의 면역 항체를 태반 혹은 모유를 통해서 획득하고 자기의 면역기능이 성숙될 때까지 초기 감염증을 면역시킨다. 반면 태반도 모유도 없는 조류 이하의 동물 즉, 난생(卵生)동물의 신생아는 어떻게 초기의 감염증을 면역시키게 되는가를 보면 난생동물의 경우 어미 닭이 획득한 면역 항체는 난황 중에 이행되어 축적되고 자손에 전해진다. 난황중의 항체는 포유류의 IgG 계열의 항체에 해당되나 단백질화학적 성질이 약간 다르고, 또한

난황 유래의 항체이므로 비교면역학 분야 등에서는 IgY(Immuno globulin Yolk)라 부른다.

1) 어미 닭에서 병아리로 항체의 이행

어미 닭에서 알을 통해 병아리로 면역 항체의 이행은 1893년에 Klemperer에 의해 발견됐다. 그 후 1960년대까지 여러 종류의 항원(세균, virus, 단백질 등)을 산란계에 면역시켜, 대응하는 특이적 항체가 난황 중에 이행, 축적하는 사실이 확인됐다(Markinson 1965, Fraser 등 1934, Patterson 등 1962). 닭의 혈액에는 포유류의 IgG, 1.25 mg 및 0.61 mg 존재한다(Leslie and Martin 1973).

한편 계란 중에는 난백에 IgM 및 IgA가 각각 1 mL당 약 0.2 mg, 0.7 mg 함유하고 있으며 IgG는 난황에만 특이적으로 존재하고 그 농도는 1 mL당 약 10 mg이다(Rose 등 1974). 계란의 부화시 난황중의 IgG가 병아리의 혈액 중에 또는 난백중의 IgA와 IgM은 병아리의 장관내로 이행되고, 병아리의 초기 감염 예방에 중요한 역할을 하게 된다(國安, 1985). 이것은 조류 등의 난생동물에서 특징적인 모자(母子) 면역 기능이다. 즉, 태생동물의 포유류가 태반 및 모유를 매개로 항체를 자손에 전하는 것과 같이 조류는 어미 닭의 획득한 면역이 알을 매개로 해서 자손에 전해진다.

2) 특이적 항체의 조제 원료로서의 계란

종래 토끼등 포유류 소동물을 과면역시켜 그 혈액을 채취해 특이적 항체를 얻었지만, 산란계를 사용해서 그 계란 난황에서 이행된 항체를 얻는 방법도 있다.

토끼 항원 처리 → 혈액 채취 → 혈청 침전 → IgG

어미닭 항원 처리 → 계란수집 → 수용성 단백질 침전 → IgG Hydrovirus(HRV) 항원을 사용해 비교 면역 실험을 한 결과 산란계 1수가 1년간 산란하는 난황에서 약 40g의 IgY이 얻어진다. 이것은 항체 단백질량으로 비교하면 토끼 30두의 혈청 항체(IgG)량에 상당하며, 특이적 항체량(총 중화 항체가)으로 비교하면 산란계의 항 HRV IgG 보다 약 120배 우수하다는 것이 판명됐다(Hatta 등 1993). Jensenius 등 (1981)은 1수 산란계에서 1개월당 약 500ml의 가토 항 혈청에 상당하는 계란 항체가 얻어지는 것으로 보고했다. 그 외도 Gottstein과 Hemmeler(1985)는 어미 닭과 토끼를 동일 항원 (Echinococcus granulosus)으로 면역시켜서 비교 실험한 결과 1개월 간 계란 난황에서 얻어진 특이적 항체량은 가토 혈청에서 얻어진 특이적 항체량의 약 18배가 된다고 보고했다. 일반적으로 어미 닭은 연간 약 250개의 알을 낳으며 잘 사육하면 다소 산란율은 저하되지만 적어도 약 5년간 산란이 지속된다. 이런 이유로 산란계에서 계란을 이용한 특이적 항체의 조제법은 포유류 소동물을 이용한 기존 방법과 비교 시에 특이적인 항체의 대량 조제에 적합하다고 말할 수 있다.

3) IgY과 IgG와 차이점

IgY와 포유류 IgG 단백질화학적 성질의 차이는 현재까지는 다음과 같이 보고되고 있다. 즉 IgY의 분자량은 포유류 IgG의 분자량보다도 크다(Orlans, 1968). 최근 IgY 유전자의 크로닝이 연구되고 있는데 IgY의 heavy 쇠정상 영역은 4개의 domain(포유류 IgG는 3개)으로 구성되어 있으며 그 구조는 포유류 IgG 보다도 오히려 IgM 및 IgE를 구성하는 Immunoglobulin 분자에 유사한 것으로 나타났다(Parvari,

1988). 그밖에도 항체의 면역화학적 성질을 비교하면 IgY은 포유류의 보체를 활성화시키지 않으며, 다만 포유류 세포의 Fe receptor에 대하여 결합력이 약하다(Gardner 등 1982). 그외에도 IgY는 포유류 IgG와 다른 protein A(Kronvall 등 1974) 및 사람의 Rheumatoid factor와도 결합되지 않는다(Larsson 1988).

Yada 등(1994)은 IgY와 토끼 IgG의 분자구조의 차이에 대하여 비교연구를 했는데 IgY의 정상 영역의 베타시드의 함량은 IgG 보다도 적고, IgY 힌지(Hinge) 영역의 Flexibility는 IgG 보다도 적었다(Shimizu 등 1992). 또한 IgY의 아스파라긴 결합형 당쇄중 27.1%만이 당(糖)쇄 말단에 glucose기를 갖고 있으며 그 구조는 포유류 IgG에 존재하지 않은 유니크한 당쇄구조라는 것이 판명됐다(Ohta 등 1991).

4) IgY의 대량생산 기술 연구

난황중의 지질은 거의가 단백질과 결합된 리포프로텐(Lipoprotein)으로 존재한다(Parkinson 1966). 또한 난황에는 수용성 단백질로서 α -, β -, γ -Livetin이 존재한다. 이들은 어미 닭 혈청으로부터 유래된 알부민, α_2 -glycoprotein 및 혈청 IgG와 동일하다는 것이 면역학적으로 증명됐다(Martin 등 1957, Martin & Cook 1958). 즉 γ -Livetin은 IgY이며 이를 분리 정제하기 위해서는 반드시 난황 수용성 단백질과 난황 Lipoprotein(난황지질)과의 분리가 필요하다.

IgY의 정제법으로는 현재까지는

- ① Lipoprotein 초원심 분리법(McBee & Cotterill 1979),
- ② 유기용제 탈지에 의한 분리법(Bade & Stegemann 1984),
- ③ Lipoprotein 응집제(polyethylenglycol : Polson 등 1985,

Dextran 유산 나트륨 법 : Hatta 등 1993, 포리아크릴산 수지법 : Yokoyama 등 1992, 식품중점 안정제 : Hatta 등 1988, 1990)를 사용한 분리법

④ 난황의 희석 및 산 처리에 의한 분리법

(Akita & Nakai 1992)

⑤ Ethanol과 초임계 탄산가스 추출을 병용한 탈지법(天塚 등 1993) 등이 보고되고 있다.

이 중에서도 가라기난법 (Hatta 등 1990)은 八田(Yada ; 1994)등이 개발한 IgY의 대량 조제법으로 중점 안정제로서 식품에 널리 사용되고 있는 가라기난(천연 다당류)이 강력한 난황 Lipoprotein 응집활성을 가진 것으로 알려졌는데, 이를 이용하여서 난황중 수용성 단백질의 IgY을 용이하게 회수율 약 75%, 및 순도 약 98%로 정제하는 방법이 확립됐다.

난황액에다 5~10배량의 0.1% 가라기난수 용액을 혼합하면 난황 Lipoprotein은 곧 응집한다. 그 응집물은 약 3,000 × g 원심력(좋은 경우는 10,000 × g)에서 분리 가능하며 난황 리포프로테인의 99.5% 이상이 침전하며 IgY을 함유한 난황수용성 단백질은 원심분리시 상등액으로 쉽게 회수된다. 원심분리후 상등액(난황수용성 단백질)에서의 IgY의 정제는 통상 음이온 크로마토그래피, 염석조작으로 간단히 정제된다. 가라기난은 아이스크림 등에 이용되는 식품용 중점 안정제로서 이것을 이용해서 조제된 IgY은 식품 소재로 이용될 경우 유리하다. 또한 가라기난에 의해 난황 Lipoprotein 응집체는 저속 원심 분리 조작으로 수용성 단백질과 분리 시킬 경우에도 동 방법은 IgY의 대량 정제에 적합한 실용적인 방법이다.

天塚 등은 1993에 식품 소재로서 이용에 적합한 IgY의 대량 제조

법으로서 Ethanol, 초임계 탄산가스 탈지법을 개발했다. 통상 초임계 탄산가스로는 난황종의 중성지질만 추출된다. 따라서 난황분말중 인지질의 대부분을 에탄올로 제거후 곧 잔존용제와 중성지질을 초임계 탄산가스 중에 동시에 유출 제거시키면 활성을 거의 잃지 않으며 항체를 함유한 단백을 건조시켜 얻어진다. 이 방법에 의하면 면역계란의 난황 분말에서 색, 맛, 냄새에 관여하는 난황 지질을 완전히 제거시킨 IgY 농축 단백 분말(IgY 순도 약 10%)을 대량으로 조제할 가능성이 있다.

5) IgY의 산업 이용 기술

계란은 인류가 유사 이전부터 먹었던 경험을 가지고 있으며 그 난황에서 대량으로 특이적 항체가 얻어지므로서 계란 항체의 이용 분야는 시약 또는 의약으로서만 아니라 기능성 식품 소재로서, 이것을 단용 혹은 병용해 식품에 이용하는 경구 수동 면역의 개발이 주목되고 있다. 경구 수동 면역은 감염증 병원체에 대한 특이적 항체를 경구 투여하여 구강내 또는 소화관내 병원체가 부착, 감염을 예방하는 방법이다. 현재까지는 IgY을 이용한 경구 수동 면역은 Rotavirus성 하리증예방 (Bartz 등, 1980, Yolken 등 1988, Ebina 등 1990, Hatta 등 1993), 충치의 예방(Otake 등 1991, Hamada 등 1991), 가축 대장균성 하리증의 예방(Yokoyama 등 1992) 및 양식어 감염증의 예방(Gutierrez 등 1993) 등이 보고돼 있다. 다음은 IgY을 이용한 경구 수동 면역의 연구로서 Rotovirus성 하리증 예방을 중심으로 소개한다.

가) 사람 Rotovirus성 하리증의 예방

Human Rotovirus(HRV) 감염은 유아 구토 하리증의 최대 요인이다 (Blacklow & Cukor 1980). 1973년 Bishop 등은 급성 비세균성 위장염을 앓고 있는 유아의 십이지장 점막 상피 세포의 전자현미경 관찰에서 처음으로 HRV 입자가 검출됐다. HRV는 경구적으로 감염되며 젓먹이 유아의 장관내 상피세포에 정착 증식해 구토를 수반한 격렬한 하리를 발생시킨다. 감염된 유아는 곧 탈수증상이 나며 적절한 대처요법이 없으면 사망에 이른다. 현재 개발도상국에서는 연간 수백만 명의 젓먹이 유아가 HRV 감염에 의해 설사로 사망하는 것으로 추정된다(Zoppi 등 1986). WHO를 중심으로 백신 개발을 힘썼으나 그 감염 대상이 면역력이 미숙한 젓먹이 유아이기 때문에 또 HRV 감염이 장관내 극소에 부착 감염되는 이유 때문에 효과적인 vaccine 개발은 성공하지 못했다(DeMol 등 1987). Vaccination(능동면역) 대신에 실험적인 HRV 감염 예방 방법으로서 항 HRV 항체를 경구 투여해, 장관내의 HRV 부착, 감염을 억제하는 방법(경구 수동면역)이 가장 기대된다. 경구 수동 면역의 실용화에는 대량의 특이적 항체가 필요하다. 따라서 산란계를 면역동물로 이용하여 그 계란내서 대량의 항 HRV IgY을 조제 공급하는 이의는 없다고 판단돼 그 실용화 연구를 진척시켰다. Yada 등(1994)은 일본에서 주요한 Human Rotovirus인 HRV Wa 균주(혈청형 1형)와 Mo 균주(혈청형 3형)를 항원으로 사용하여 산란계를 면역화시켜 그 계란에서 얻어진 계란항체(IgY)의 생산성, 특이성, 열 및 pH와 소화 효소에 대한 내성 등을 조사했다. 산란계는 면역후 생산되는 알의 난황중에는 HRV에 대한 高역가의 中和 抗體를 함유하고 있다.

또한 면역에 의한 산란을 저하는 거의 없었으며 면역산란계(1수, 1년간)는 약 40g의 IgY을 생산했는데 그 양은 면역가로 30두의 혈청

서 얻은 항체(IgG) 양에 상당했다. 항체 활성을 비교해 보면 항 HRV(Mo 균주) IgY의 총생산량은 가토를 이용한 기존 방법보다 약 120배나 됐다(Hatta 등 1993). 또한 IgY의 열 변성 온도가 73.9°C 였고 pH 3.5 이하에서는 IgY에 구조 변화가 일어나며 IgY의 항체 활성은 Trypsin, Chynotrypsin에 대해 비교적 안정됐으며, IgY은 pepsin에 대해서는 pH 2.0에서 완전히 활성을 잃었다. 그러나 젓먹이 유아의 위내 조건(pH 4.0, 4시간)에서는 항체 활성의 약 50%가 잔존되는 것으로 알려졌다.

나) 양식어 감염증의 예방

뱀장어의 파라곰(ハラコ)병 (*Edwardsiella Tarda* 등)은 양만장에서 가장 큰 피해를 가져다주는 장관 감염증이다. 현재 그 예방 및 치료에는 항생물질이 투여가 실시되고 있다. 그러나 최근 항생물질의 대량 사용에 의한 내성균이 출현했고 또 그 잔류성이 문제가 돼서 보다 안전한ハラ코병 예방법 개발이 희망되고 있다. 抗 *E. Tarda* IgY(전란분말)을 대량 조제하여 *E. Tarda*를 과산화수소로 내장에 손상을 받은 뱀장어에다 경구 투여해 감염실험계(系)로, IgY 경구 투여가ハラ코병의 발생을 완전히 예방하는 것을 확인했다(Gutierrez, 1993). 그 외에도 IgY 배합사료의 실용화를 목적으로 양식 뱀장어 약 240만 尾를 사용한 field test 실시 결과 양만장에서도 IgY 배합 사료를 가지고ハラ코병 예방효과를 확인했다.

다) 충치의 예방

충치는 구강내 상재균인 *Streptococcus mutans*(혈청형 a~h)에 의해 감염된다. *S. mutans*는 glucocyltransferse를 가지고 있는데 이

효소가 구강 내에서 서당으로부터 충치균이 균체표층에 점착성 다당을 형성한다. *S. mutans*는 점착성 다당에 의해서 치면에 강건하게 부착(프라그 형성) 된다. 프라그내에는 유산균 등의 작용으로 생긴 산이 치아를 용해시켜(탈 탄소) 충치가 형성된다. 즉 충치균감염의 제1단계는 치면에 부착되는 것으로, 그 부착 감염을 IgY로 억제시켜서 충치를 예방하는 방법이 고안됐다. Yada 등(1994)은 충치균 *S. mutans* MT 8148(혈청형 C)의 점착성 다당형성균(크르마린 사균)을 항원으로 해서 산란계를 면역시켰다. 그후 그 산란 난황에서 얻어진 IgY은 *S. mutans*의 모든 혈청형에 대한 항체 활성을 함유한 (multivalent) 항체인 것으로 나타났다. 다음으로, 감염 실험에서 동. IgY의 충치 억제 효과를 조사했다. 충치 감염 실험은 JCL Sprague-Dawley rat를 기본 사료(36% 사탕, 20% 난황분말)로 사육했다. 기본 사료 중의 항 *S. mutans* IgY(난황분말)의 점하는 비율을 0, 2, 6.6, 20%로 4군으로 시험구를 설계하여서 충치균 감염후 56일째 각군의 충치의 정도(caries score)를 비교했다. 그 결과 0% (대조)구가 104.9 ± 1.9 , 2% 구가 81.4 ± 6.5 , 6.6% 구가 71.1 ± 4.1 , 20% 구가 42.8 ± 2.8 로 조사됐는데 모든 항 *S. mutans* IgY 첨가구는 대조구에 비교해서 1% 유의차를 가진 충치 발생 예방 효과가 인정됐다 (Otake 등 1991).

라) 위염 및 십이지장 궤양 예방 치료용 IgY

위궤양 및 십이지장 궤양 치료제로는 위산 분비를 억제하는 H_2 blocker가 주류이고 치료 효과가 높지만, 일단 치료하여도 재발하는 일이 많은 것이 본 질환의 특징이다. 재발율이 높은 이유로는 H_2 blocker를 투여하여도 HBP가 제거되지 않은 것에 기인 된다고 본다.

위 혹은 십이지장에서 HBP 의 감염에 대해 항생물질을 이용하여 치료도 시도되고 있지만 평가는 일정치 않다. 또한 Stress ulcer 에 의한 영향을 미치는 균주(*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*) 억제에 대한 면역학적 연구 결과는 아직 실용화 단계에 이르지 못했다.

마) 난황항체(IgY) 이용의 산업적 의의

종래 특이적 항체는 동물의 혈액에서 얻어서 임상검사약 및 연구시약으로서 이용됐다. 계란항체(IgY)는 포유류 IgG와 비교하면 몇 개의 다른 성질을 가지고 있으나 항체의 기본적 성질로서 항원 인식활성의 면에서는 동등하다. 또한 포유동물에서는 항체로 되기 어려운 항원에 대해서도 어미 닭에서는 용이하게 항체가 되는 경우가 빈도가 높다. 따라서 IgY의 특징을 활용하려면, 종래의 임상 검사약, 연구용 시약만 아니라 면역 흡착제의 ligand 로서도 IgY의 응용이 가능하다. 계란은 인종과 종교를 초월해서 고대로부터 세계적으로 이용되어 온 식품이다. 그 계란에서 특이적 항체의 대량 제조가 가능하게 됐으며 그 새로운 응용으로서 검사 시약 및 면역 흡착제의 ligand로서의 개발뿐만 아니라 경구 수동면역의 이론에 기초한 식품 및 사료가 처음으로 개발됐다는데 큰 의의가 있다.

계란은 인류가 유사 이전부터 먹었던 경험을 가지고 있으며 그 난황에서 대량으로 특이적 항체가 얻어질 수 있으므로 계란 항체의 이용 분야는 시약 또는 의약으로서만 아니라 기능성 식품 소재로서, 이것을 단용 혹은 병용해 식품에 이용하는 경구 수동 면역의 개발이 주목되고 있다. 경구 수동 면역은 감염중 병원체에 대한 특이적 항체를 경구 투여하여 구강 내 또는 소화관내 병원체가 부착, 감염을

예방하는 방법이다. 현재까지는 IgY을 이용한 경구 수동 면역은 Rotavirus성 하리증 예방(Bartz 등, 1980, Yolken 등 1988, Ebina 등 1990, Hatta 등 1993), 충치의 예방(Otake 등 1991, Hamada 등 1991), 가축 대장균성 하리증의 예방(Yokoyama 등 1992) 및 양식어 감염증의 예방(Gutierrez 등 1993) 등이 보고되어 있다.

종래 특이적 항체는 동물의 혈액에서 얻어서 임상검사약 및 연구시약으로서 이용됐다. 계란항체(IgY)는 포유류 IgG와 비교하면 몇 개의 다른 성질을 가지고 있으나 항체의 기본적 성질로서 항원 인식 활성의 면에서는 동등하다. 또한 포유동물에서는 항체로 되기 어려운 항원에 대해서도 어미 닭이나 가금류에서는 용이하게 항체가 되는 경우가 빈도가 높다. 따라서 IgY의 특징을 활용하려면, 종래의 임상 검사약, 연구용 시약만 아니라 면역 흡착제의 ligand로서도 IgY의 응용이 가능하다. 계란은 인종과 종교를 초월해서 고대로부터 세계적으로 이용되어 온 식품이다. 그 계란에서 특이적 항체의 대량 제조가 가능하게 됐으며 그 새로운 응용으로서 검사 시약 및 면역 흡착제의 ligand로서의 개발뿐만 아니라 경구 수동면역의 이론에 기초한 식품 및 사료가 처음으로 개발됐다는데 큰 의의가 있다.

2. 국내현황

가금 티프스 병은 국내 양계인들에게 공포의 대상으로 잘 알려져 있는 질병으로 주된 원인균은 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*)이다. 국내에서 1992년 최초로 발생하여 해를 거듭할 수록 발생 빈도가 줄어들지 않고 있으며, 특히 5월부터 9월까지 집중 발생되고 있다. 잠복기는 감염 주령, 외부 기온, 스트레스 정도에 따라 다양한 형태로 나타나나, 일반적으로 성계에서는 4-5일

이편 임상증상이 나타나고, 임상증상이 나타난 후 3-4일 이내에 거의 100% 폐사한다. 표 1에는 직접 전파에 의한 가금 티프스의 발생사례를 나타내었고 그 피해의 규모는 상당한 것을 볼 수 있다. 현재 가금 티프스를 완전 예방할 수 있는 백신이나 치료제는 없다고 보아도 무리가 아니다.

가금 티프스 발생이 확산되고 있는 원인으로서는 위탁 종계 사육의 증가, 유통업을 통한 초생추 판매, 종계 사육 형태의 평사 전환, 산란계 중추 농장의 방역 형태 미비, 관련산업(종계장, 사료 및 유통시설 등)의 방역 수준이 함께 향상되지 않은 상태에서 산란계 농장만 대규모 선진화 수준으로 변화한 것, 항균제의 남용, 가금 부산물을 랜더링하여 사료로 이용 등을 들 수 있다. 또한 삼계용 닭이 종계등록이나 추백리 검사 등의 정상적인 방역이 안되고 있으며, 토종닭의 사육 분포가 증가되고, 가금육의 수입등으로 인한 방역상의 문제가 가금 티프스의 발생을 증가시키는 것으로 보고 있다.

Table 2에서는 닭에서 발병하는 주요 살모넬라 감염증을 비교하였다. 가금 티프스는 살모넬라균의 특성상 항균제, 항생제의 투여로는 예방 및 치료가 100% 되지 않기 때문에 사독, 생독 백신 등 여러 방법들이 개발되었으나 현재까지도 감염계균의 도살처분이외에는 효과적인 방법이 없다. 따라서, 국립수의과학검역원에 의뢰되는 가검물의 진단결과를 살펴보면 아래의 Figure 1과 같이 다른 세균성 질병과는 달리 가금 티프스는 매년 발생이 증가하고 있다.

Table 1. 직접 전파에 의한 가금 티프스 발생 사례

사례	전파경로	급여형태	발병양상	피해	문제점	대책
1	감염계입 식전파	호파식	전진형	50%폐사	▷체계적 질병 관리 시스템 부재	▷완전한 종계 관리
2	감염계입 식전파	링크식	산발형	전이농장 전파발생 으로 도태 처분	▷타성에 젖은 사양관리	▷유관업체와 주기적 검진 체계 형성
3	감염계입 식전파	수동식	혼합형	전 농장 전파 폐사	▷양심불량인 양계인	▷철저한 사양 관리

※자료: 한국미생물 연구소, 백신부장 문성철(양계연구 1995.12)

가금 티프스가 발병하면 발생 지역에서 억제 대책으로 항생제를 사용하는데 Table 3에서 보는 바와 같이 가금 티프스균의 항생제 감수성 결과를 살펴보면, 대부분의 항생제에 대하여 감수성이 높은 것으로 나타났으며, 감수성을 보이는 양상이 거의 일치하는 것은 동일한 오염원으로부터 빠른 속도로 수평 감염되었기 때문인 것으로 해석될 수도 있다.

Table 2. 닭에서의 주요 살모넬라 감염증

	추백리	가금 티프스	파라 티프스
원인균	살모넬라 풀로룸	살모넬라 갈리나룸	살모넬라 티피뮤리움 살모넬라 엔테리티피스
운동성	없음	없음	있음 (편모)
발병일령	주로 초생추	모든 일령	초생추 및 스트레스 요인이 있는 모든 성계
전파경로	주로 난계대전염	난계대전염 및 동거경구감염(성계)	주로 외계감염 (야조류, 쥐, 사료)
인수공동 전염병	없음	없음	사람에서 식중독 유발

※자료: 바이엘 코리아(1995)

연도별 주요 세균성 질병 검색을 비교

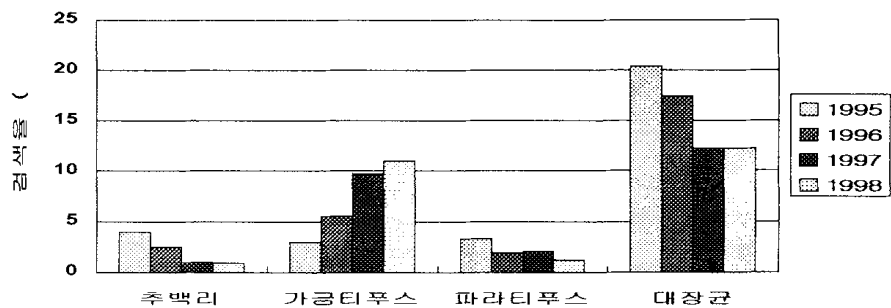


Figure 1. 국립수의과학검역원의 연도별 주요 세균성 질병 검색을

Table 3. 가금 티프스의 항생제 감수성

항생제 종류	감수성균 / 검사균수
Baytril	10 / 10
Ampicillin	10 / 10
Cephalothin	10 / 10
Chloramphenicol	4 / 10
Colistin	10 / 10
Erythromycin	0 / 10
Gentamycin	10 / 10
Neomycin	10 / 10
Penicillin	0 / 10
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	10 / 10
Tetracyclin	10 / 10
Amikacin	10 / 10
Nitrofurantoin	10 / 10
※ 검사법 : 디스크 확산법	

※ 자료 : 바이엘 코리아 (1995)

한편으로 산란계 및 계란에서의 면역 단백질의 연구 개발 현황을 살펴보면 닭 질병 저항력과 면역기전의 상관성 (김정우 등 1991), 미량 성분의 첨가가 IgG 수준에 미치는 효과(김정우 등 1993), 육용계의 혈청 중 면역글로브린의 농도(김정우 등 1993), 돼지 설사병 예방용 면역 단백질 연구(수의과학연구소) 등이 있다. 또한 한국식품개발연구원에는 계란을 이용한 충치 예방용 기능성 소재 개발 연구와 넙치에서의 피부병 예방, 위염 및 십이지장 발병 예방을 위한 연구 등이 추진되어 왔다. 이 방면의 업계에서의 관심이 지대하여 여러 벤처 회사가 IgY를 아이টে으로 사업을 하고 있으며, 아직까지

는 주로 식용으로 쓰여지고 있다.

제 2 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 생산

제1절 서 론

산란계에 특정 균을 주사하면 산란계에 그 균에 대한 항체가 생기고 또한 그 산란계가 낳는 계란에는 그 균에 대한 항체가 생성된다. 이를 이용하여 가금 티프스를 실제적으로 발생시키는 *Salmonella gallinarum* 균주를 확보하고 배양하여 백신을 마련한다. 계란 내에서의 항-*Salmonella gallinarum* 항체 생산 여부를 측정하기 위하여 난황으로부터 수용성 단백질을 분리해내고, 항체 함량과 항-*Salmonella gallinarum* 항체 함량을 Non Competitive Sandwich ELISA 방법으로 조사한다.

난황내의 항체 함량을 높이기 위해 사료 첨가제를 일반사료와 혼합하여 급여한 후, 항체 함량 증진 효과를 분석한다. 산란계에 백신 주사 시 adjuvant 종류, target 균 외의 첨가균의 여부에 따른 계란 내의 면역단백질 생산을 비교한다. 산란계의 면역에 따른 산란을 감소를 위하여 산란계의 면역 연령과 사료첨가물에 따른 산란을 감소 방지 효과를 분석하고자 한다.

사독백신투여농장, Terminator 사용농장, 쌀콘사료 투여농장, 일방향생제(겐타마이신)투여 농장, 경쟁적 배제제 투여 농장, 복합적 방법 사용농장에 대한 기존 예방법 시험 결과에 대한 상호 비교

한다.

제2절 재료 및 방법

1. 가금 티프스 원인균 살모넬라 갈리나룸균의 항원화 기술

균주는 수의과학검역원에서 동결건조된 *Salmonella gallinarum* (ATCC 9148)을 구입하여 보관 사용하였다. 배양은 Tryptic soy broth(Difco)에 균을 접종한 후 37℃ 항온기에서 24시간 배양하였다.

균체는 60℃에서 30분간 열처리하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 식염수로 현탁 후 원심분리하여 재회수하여 사용하였다. 이렇게 준비된 항원은 adjuvant와 함께 섞어 emulsion을 만든 후 산탄계에 접종하였다.

Salmonella gallinarum 균 면역 처리시에 1회 주사량은 1 ml로 하였고, 이 때 균수는 10^8 /ml이며 첫 접종한 후 2주 간격으로 2회 boosting하였다.

2. 난황에서 Water soluble protein fraction 분리

난황 중에서 IgY 분리정제는 Figure 2에서와 같이 Hatta(1990)의 방법을 기준으로 하였다. 즉 난황을 같은 양(w/v)의 증류수와 함께 잘 섞은 후 수분간을 방치한 후, 난황의 4배 분량(w/v)의 0.1% λ -Carrageenan (Sigma Co.)을 섞었다. 상온에서 30분간 방치한 다음

10,000×g, 15분간 원심분리하였다. 인지질을 주로 함유하고 있는 침전물로부터 상층액만을 분리하기 위하여 상층액을 조심스럽게 따라 whatman #2를 이용하여 여과하였다.

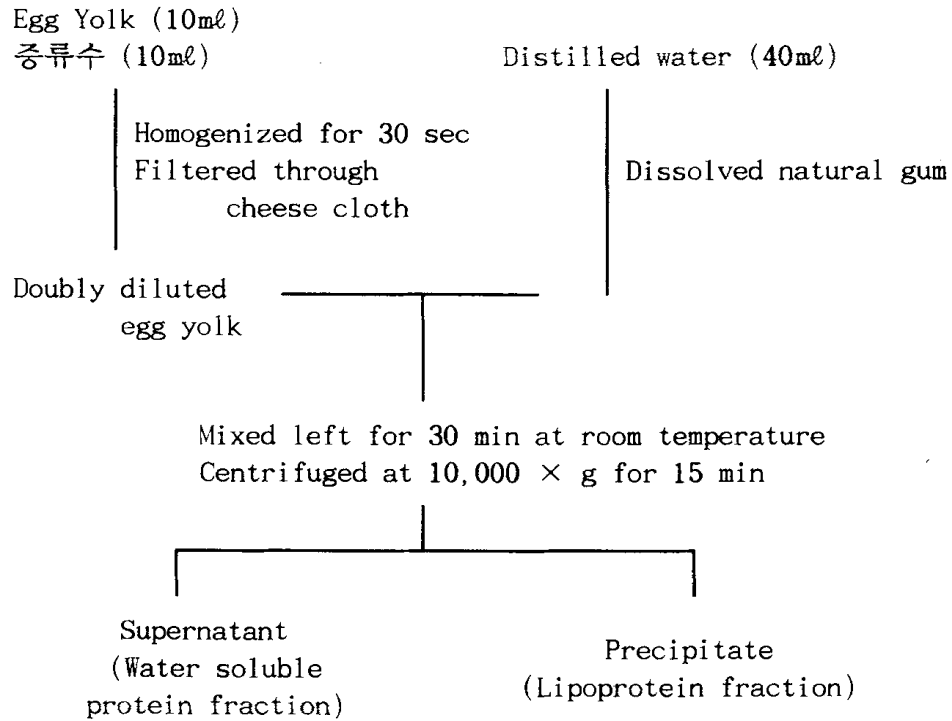


Figure 2. 난황으로부터 조항체 용액의 추출

3. 총 IgY 및 Specific IgY 역가 측정

수용성 단백질을 분획을 여러 단계로 희석하여(1/10,000배) total IgY와 specific IgY 함량을 측정하는 데 사용하였다. 전체 IgY 함량 측정을 위하여 우선 microplate에 rabbit anti-chick IgG

Antibody의 단백질 농도가 $2\mu\text{g}/\text{well}$ 이 되도록 조정하여 coating하고 wash 한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N H_2SO_4 를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Specific IgY의 함량도 ELISA 방법에 의해 수행하였다. 원심분리된 *Salmonella gallinarum* 균체를 적당히 희석하여 O.D 값이 660nm에서 0.05가 되도록 완충액으로 희석하였다. 희석된 *Salmonella gallinarum* 균체를 microplate에 coating하고 wash 한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N 황산을 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 난황내 항체 함량 제고 기술 개발

특수사료를 개발하여 산란계에 급여시험을 수행하였다. 난황항체 (IgY)를 제고하기 위하여 참숫을 산란사료에 첨가하여 사양실험을 실시하였다. 시험처리는 4 처리구로, 시험사료의 일반사료구(A)는 시판사료로서 이를 기초사료로 하여 참숫을 처리구별로 특수사료를 혼합, 제조하였다(일반(A, C); 0.5%(B, D); 0.25%(E)). 한편, 항체 제고를 위해 본 시험에서는 15주령의 산란계에 *Salmonella gallinarum* 균을 면역시키고 이후 2주 간격으로 2회 추가 면역을 실시한 후, total IgY와 항-*Salmonella gallinarum* specific IgY의 역가를 측정하였다.

Table 4. 항체 함량 제고 연구를 위한 시험처리구

사 료	vaccination	처리구
일 반	No	A
참숯 0.5%	No	B
일 반	Freund's adjuvant	C
참숯 0.5%	Freund's adjuvant	D
참숯 0.25%	Freund's adjuvant	E

5. 효율적인 면역프로그램

항원으로는 *Salmonella gallinarum*(ATCC 9148) 균주를 사용하였고, Freund구(A)의 첫 면역처리시는 Adjuvant complete Freund (Difco 0638-60-7)을 *Salmonella gallinarum* 균체와 1 : 1 비율로 유화시켜 닭의 가슴근육에 주사하였고, 2회 면역처리부터는 Adjuvant incomplete Freund(Difco 0638-60-6)을 사용하였다.

결핵균구(H)는 adjuvant가 Freund 구와 같으며, *Salmonella gallinarum* 균체와 결핵균(BCG) 및 adjuvant의 비율을 1 : 1 : 2로 혼합하여 주사하였다. 수산알미늄구(I)는 첫 면역처리 시 수산화알미늄을 *Salmonella gallinarum* 균체와 3 : 7의 비율로 하여 1 ml씩 주사하였고, 2회 면역처리부터는 *Salmonella gallinarum* 균과 ISA 25의 비율을 3:1로 하였다.

Table 5. 항원 접종 방법에 따른 IgY 역가 비교시험

처리구		면역프로그램	
		1차 접종	2, 3차 접종
Control	B	No vaccination	No vaccination
Freund 구	D	살모넬라 갈리나룸균 1 Freund's complete adjuvant 1	살모넬라 갈리나룸균 1 Freund's incomplete adjuvant 1
결핵균구(BCG)	H	살모넬라 갈리나룸균 1 BCG 1 Freund's complete adjuvant 2	살모넬라 갈리나룸균 1 BCG 1 Freund's incomplete adjuvant 2
수산알미늄구	I	살모넬라 갈리나룸균 7 수산화알미늄 3	살모넬라 갈리나룸균 3 ISA 1
수산·결핵균구	J	살모넬라 갈리나룸균 3.5 BCG 3.5 수산화알미늄 3	살모넬라 갈리나룸균 3 ISA 1

수산·결핵균구(J)는 첫 면역처리시 *Salmonella gallinarum*, 수산 화알미늄 및 결핵균의 비율은 3.5 : 3 : 3.5로 하여 1 ml씩 주사하였고, 2회 면역처리부터는 균액과 ISA(Montanide사 제품)를 3:1의 비율로 유화시켜 ISA 최종농도가 25%가 되도록하여 사용하였다. 1회 주사량은 항상 1ml로 하였고, 이때 균수는 10^8 CFU/ml이며, 첫 boosting한 후 2주 간격으로 3회 주사하였다. 실험기간 중 산란계에는 모두 0.5% 참숯이 포함된 사료를 급여하였다.

항원을 산란계에 접종하면 산란율이 감소하는데 이를 방지하기 위하여 사료 첨가제와 접종시기를 비교하고자 하였다. 일반산란계 사료에 참숯을 0.5% 첨가하여 급여하여 참숯 첨가에 따른 효과를 산란율과 IgY 역가로 비교하였다. 또한 산란 이전(14주령) 또는 산란 중(21주령)에 항원을 접종하고 이들의 효과를 산란율과 IgY 역가로 비교하였고 시험 처리구는 Table 6과 같다.

Table 6. 항원 접종 시기에 따른 산란율 감소 비교시험

사 료	vaccination	면역주령	처리구
일 반	No		A
참숯 0.5%	No		B
일 반	Freund's adjuvant	15	C
참숯 0.5%	Freund's adjuvant	15	D
일 반	Freund's adjuvant	21	F
참숯 0.5%	Freund's adjuvant	21	G

6. 농장에 대한 기존 예방법 비교

국내분리 가금 티프스균에 대하여 항생제 내성검사를 실시하기 위하여 사용한 항생제는 암피실린을 비롯하여 총 11종이었으며 최근 현장농가에서 주로 사용하는 항생제를 선택하였다. 항생제 내성검사에 관련된 모든 실험은 국립수의과학검역원 조류질병과에서 실시하였으며 국내 분리주는 국립수의과학검역원에 의뢰된 가검물 중 가금 티프스로 진단된 사례와 야외의 농장에서 병력이 있는 계군으로부터 분리하였다.

가금 티프스 상재계군에 대한 사독백신별 접종 효과를 비교하기 위하여 국내의 산란계 농장 2개소 4계군 총 28,486수수에 가금 티프스 백신으로 개발된 겔사독백신과 오일사독백신을 이용하여 백신프로그램을 작성, 적용하였다. 백신접종효과는 계군의 산란율과 폐사율을 비교하였으며 표준산란율과 폐사율(주간 0.3%)를 대조수치로 선정하였다. 가금 티프스가 상재해 있는 2개 농장을 선정하여 병아리 입추 시부터 생균제를 각각 투여하여 산란기간 중에 산란율과 폐사율을 비교함으로써 생균제의 효력을 검사하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 가금 티프스 원인균 살모넬라 갈리나룸균의 항원화 기술

가금 티프스의 원인균 균주는 수의과학검역원에서 동결건조된 *Salmonella gallinarum* (ATCC 9148)을 구입하여 보관 사용하였다. 배양은 Tryptic soy broth(Difco)에 균을 접종한 후 37°C 항온기에서 24시간 배양하였다. 균체는 60°C에서 30분간 열처리하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 식염수로 현탁 후 원심분리하여 재회수하여 사용하였다. 이렇게 준비된 항원은 adjuvant와 함께 섞어 emulsion을 만든 후 산란계에 접종하였다.

Salmonella gallinarum 균 면역 처리시에 1회 주사량은 1 ml로 하였고, 이 때 균수는 10^8 /ml이며 첫 접종한 후 2주 간격으로 2회 boosting하였다. 이와 같이 접종한 후 ELISA 방법을 통해 항-Salmonella gallinarum IgY가 계란에서 생성됨을 확인하였다.

2. 난황에서 Water soluble protein fraction 분리

난황에는 단백질 외에도 인지질이 많이 존재하여 IgY의 항원항체 반응을 저해한다. 그러므로 난황에서부터 인지질을 제거하고 IgY가 많이 존재하는 water soluble fraction을 분리하여 항원항체간의 반응을 높이기 위하여 본 시험을 시행하였다. Water soluble fraction의 추출은 Hatta의 방법에 따라 Figure 3의 방법으로 행하였다. 즉, 난황을 membrane 없이 채취한 후 동량의 물(w/v)을 붓고 섞는다. 수분간 방치한 후 0.1% λ -carrageenan 용액을 난황 무게의 4배 가량(w/v) 넣고 인지질을 침전시킨 후 $10,000 \times g$, 15분간 원심분리를 통하여 제거하였다. 침전물은 대부분 인지질이므로 제거하고 수용성 단백질인 상정액을 Whatman #2여과지로 여과하였다.

Separation of IgY from eggs

egg yolk 10g
↓
add distilled water 10ml
↓
homogenize for 30sec.
↓
add natural 40ml of gum solution
(0.1% λ-carrageenan)
↓
mix and leave for 30min. at RT
↓
centrifuge at 10,000×g for 15min
↓
filter through #2 paper
↓
ppt: discard (lipoprotein fraction)
↓
supernatant (water soluble protein fraction)

Figure 3. Separation of water soluble protein fraction from egg yolk.

계란 한 개는 산란계의 연령에 따라 다르나 약 55g ~ 70g 안팎이
있으며 난황만의 무게는 약 16g 내외였다. 예를 들어 5g 난황을 사

용하였을 때 얻어지는 water soluble fraction의 양은 약 20 ~ 21 ml 가량이였다. 난황의 Water soluble fraction은 약한 미색의 투명한 액체로서 고형분이 1% 미만이었으며 Biuret 방법(Sigma, Total protein 690-A)에 의해 단백질 함량을 측정한 결과 단백질 함량은 약 7.3 mg/ml 였으며, 지질은 1% 미만이었다.

3. 총 IgY 및 Specific IgY 역가 측정

가. Total IgY 함량

난황 내의 총 IgY 및 Specific IgY 역가 측정을 위하여 Non Competitive Sandwich ELISA 방법을 이용하였다. 즉, 수용성 단백질 분획을 여러 단계로 희석하여(1/10,000배) total IgY와 specific IgY 함량을 측정하는 데 사용하였다.

전체 IgY 함량 측정을 위하여 우선 microplate에 rabbit anti-chick IgG Antibody의 단백질 농도가 2 μ g/well이 되도록 조정하여 coating하고 wash 한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N H₂SO₄를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다 (Figure 4).

Chick IgY 또는 chick IgG를 이용하여 매번 standard curve (Figure 5)를 작성하여 희석된 wsf 내의 IgY 농도를 측정한 후 계산하였다.

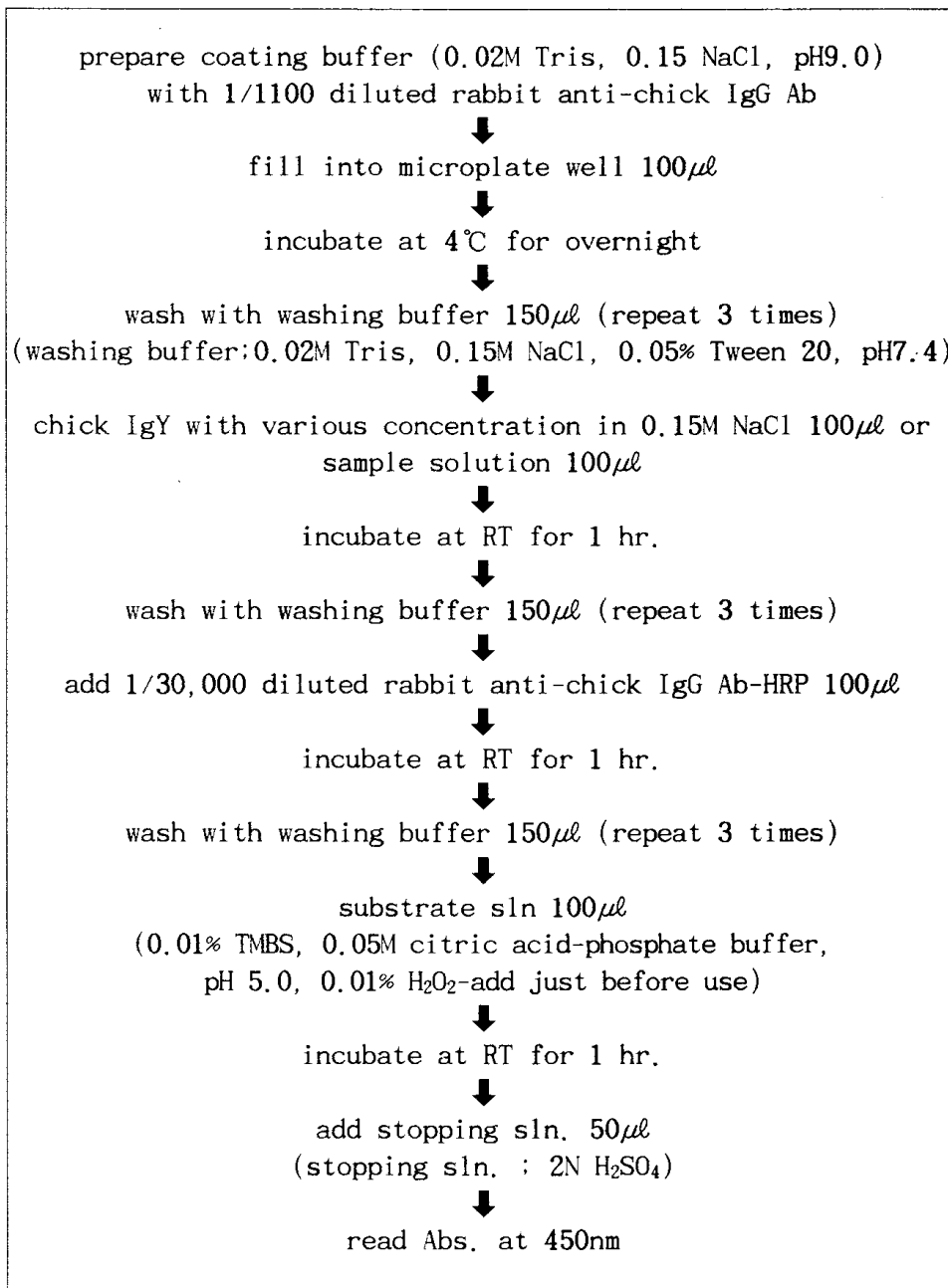


Figure 4. Quantity of total IgY by noncompetitive sandwich
ELISA

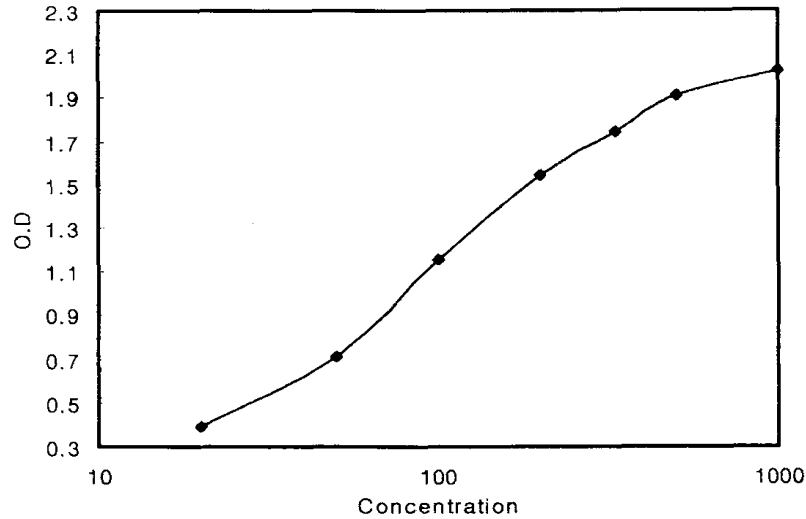


Figure 5. Standard curve of ELISA for total IgY concentration

나. Specific IgY 역가 측정

Specific IgY의 역가도 ELISA 방법에 의해 수행하였다. 원심분리된 *Salmonella gallinarum* 균체를 적당히 희석하여 O.D 값이 660nm에서 0.05가 되도록 완충액으로 희석하였다. 희석된 *Salmonella gallinarum* 균체를 microplate에 coating하고 wash한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N 황산을 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다(Figure 6)

*Salmonella gallinarum*을 Vaccination한 산란계로부터 얻은 계란 중에서 특정한 날짜 또는 여러 날짜의 시료를 pooling 한 후 이 IgY가 *Salmonella gallinarum*와 결합하는 정도를 기준으로 하여 ELISA의 모

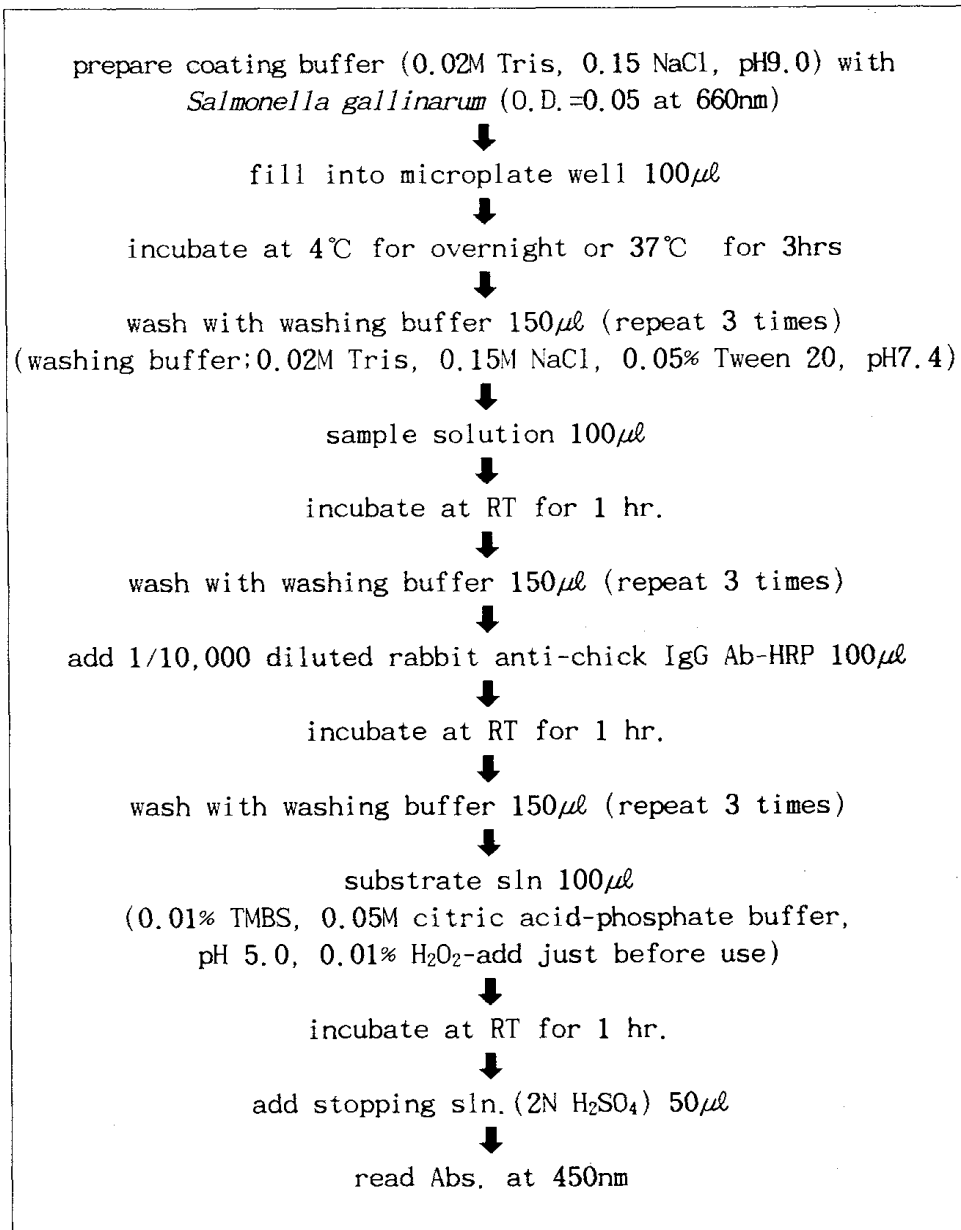


Figure 6. Activity of *Salmonella gallinarum* - specific IgY by noncompetitive sandwich ELISA

든 plate마다 standard curve (Figure 7)를 작성하여 희석된 wsf 내의 anti-*Salmonella gallinarum* IgY 의 역가를 계산하였다.

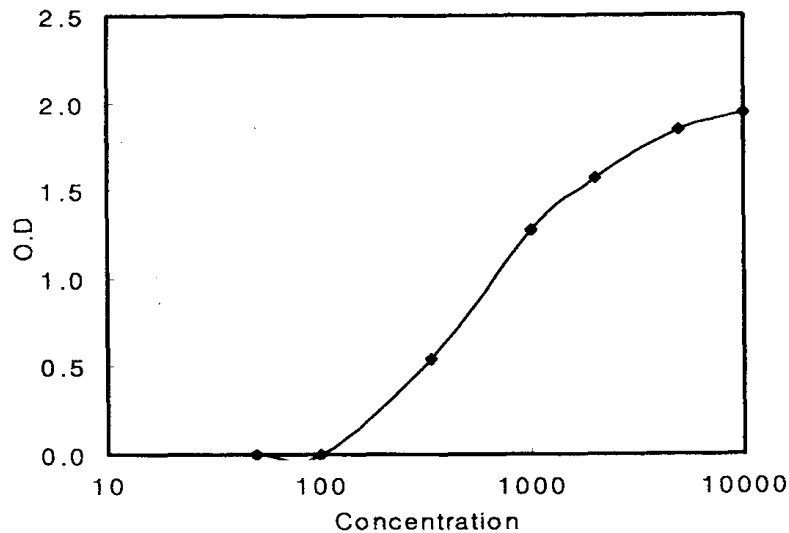


Figure 7. Standard curve of ELISA for specific IgY activity

4. 난황내 항체 함량 제고 기술 개발

가. Total IgY

15주령의 산란계에 *Salmonella gallinarum* 항원과 Freund's adjuvant를 사용하여 C, D, E처리구에 2주 간격으로 3회 면역시킨 후 일반사료(C) 및 참숫 0.5%(D), 참숫 0.25%(E)를 급여한 처리구 그리고 백신 투여를 하지 않은 일반사료(A)와 참숫 0.5%(B) 처리구의 Total IgY와 Specific IgY를 측정하였다. 본 연구실에서는 이미 다른 연구들을 통해 여러 가지 사료 첨가제 즉, 마늘, 썩, 생강, 참숫 등의 효과를 비교해 보았고 특히 참숫이 IgY 함량 제고에 효과적

이면서 동시에 계란 특유의 비린내 등을 억제하여 관능검사에서도 좋은 결과가 도출되었었다.

참숫 급여에 따른 실험기간 중 Total IgY의 변화는 Figure 8에서와 같이 모든 처리구에서 함량의 변화가 있었다. 사육 기간 동안의 평균 total IgY 함량(Figure 9)을 보면 면역처리구가 비면역 처리구보다 10~22% 정도 많은 함량을 나타내었다. 백신 처리구에서는 C 처리구가 다소 높은 경향을 나타내었으나, 참숫급여에 의한 영향은 나타나지 않았다.

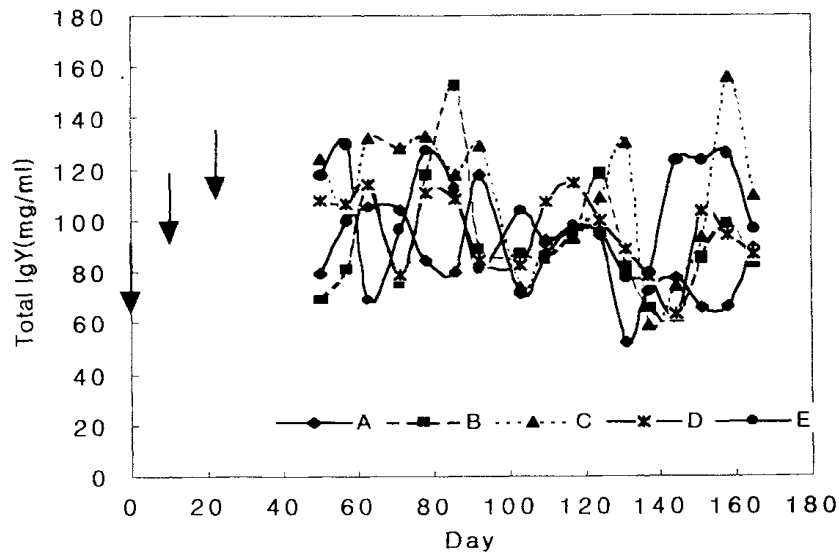


Figure 8. 특수사료에 급여에 따른 실험기간 중 Total IgY 함량변화

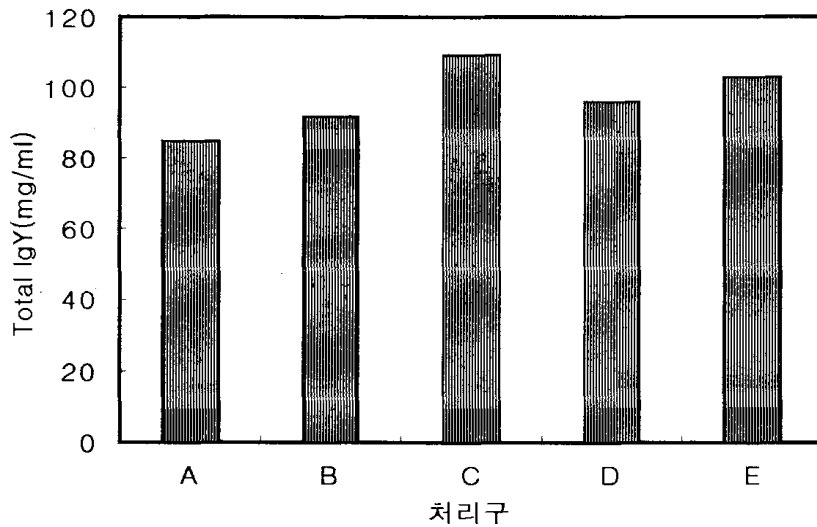


Figure 9. 특수사료에 급여에 따른 평균 Total IgY 함량

나. Specific IgY

Specific IgY의 함량변화(Figure 10)를 보면 비면역처리구(A, B)는 실험기간 예상대로 시험 기간동안 역가를 나타내지 않았으나, 면역처리구(C, D, E)는 10주째까지 매우 높은 함량을 보이다가 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 면역처리구의 평균 Specific IgY의 함량(Figure 11)은 비면역처리구에 비해 55~97%정도 월등히 높은 함량을 나타내었다. 참숫의 급여에 의한 면역처리구의 평균 specific IgY 함량을 보면 0.5% 참숫을 급여한 D처리구가 가장 높은 함량을 나타내었으며, 0.25% 참숫급여, 그리고 일반사료 급여 순으로 specific IgY의 생산에 참숫의 급여가 항체 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

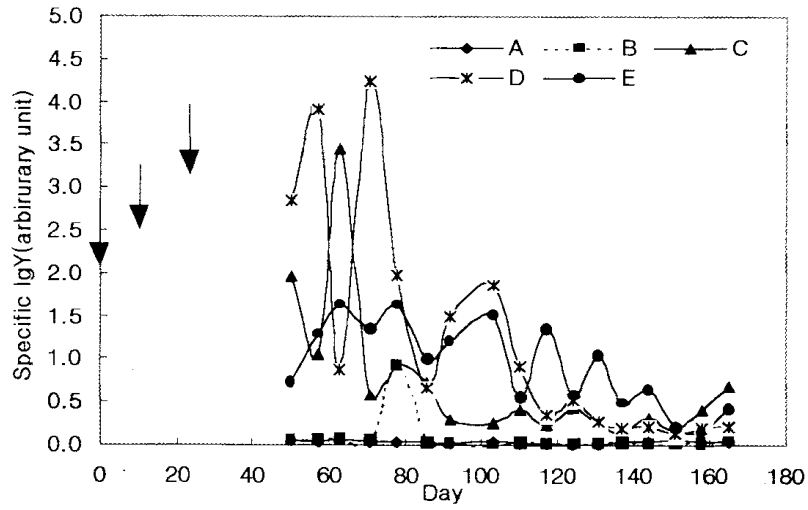


Figure 10. 특수사료에 급여에 따른 실험기간 중 Specific IgY 함량 변화

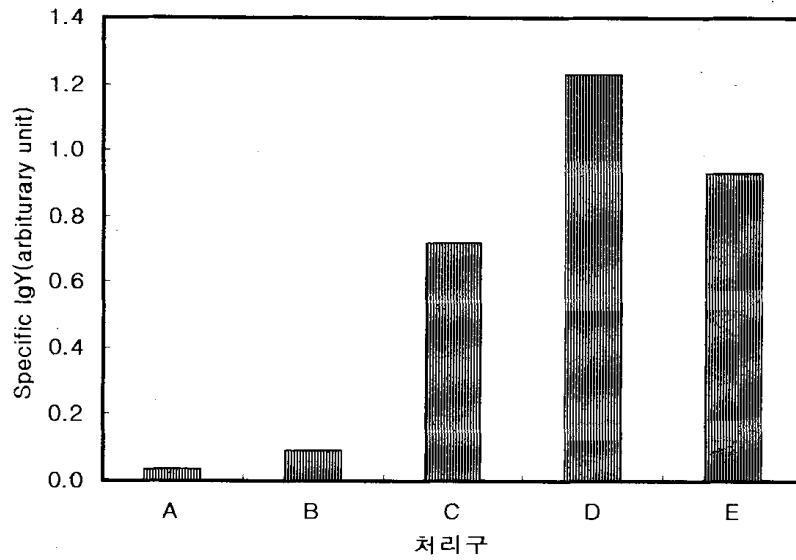


Figure 11. 특수사료에 급여에 따른 평균 Specific IgY 함량

5. 효율적인 면역프로그램

가. Adjuvant 처리에 따른 IgY 역가 비교

Adjuvant 처리에 따른 실험기간 중 Total IgY 함량의 변화는 Figure 12와 같이 나타났다. 백신 투여 후 증가하기 시작한 total IgY 함량은 실험기간 중 많은 함량의 변화를 나타내었으며, 12주째 부터 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 평균 total IgY 함량 (Figure 13)을 보면 Freund's adjuvant와 BCG를 사용한 H 처리구가 가장 높은 함량을 나타내었으며, 다음은 수산화알루미늄구(I 처리구), Freund 구(D 처리구), 수산·결핵균구(J 처리구)순으로 높게 나타났다.

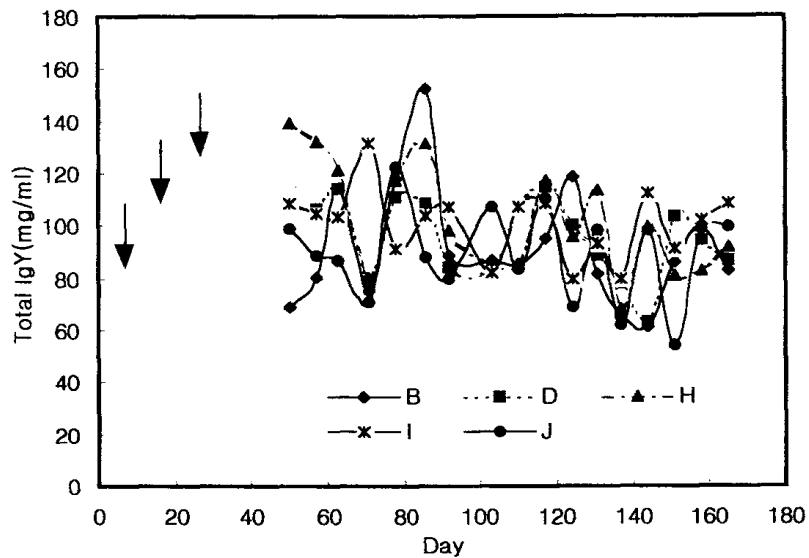


Figure 12. Adjuvant 처리에 따른 실험 기간 중 Total IgY 함량 변화

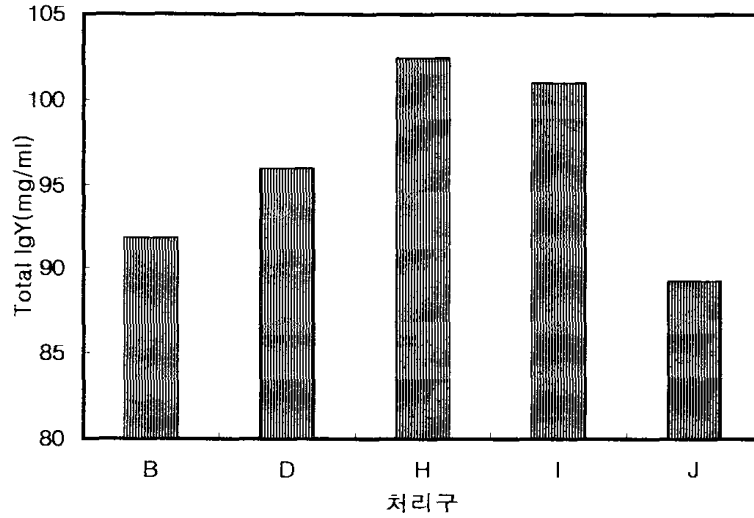


Figure 13. Adjuvant 처리에 따른 평균 Total IgY 함량

Adjuvant 처리에 따른 실험기간 중 Specific IgY의 함량변화 (Figure 14)를 보면 Freund's adjuvant를 사용하여 백신처리한 D, H 처리구는 12주째까지 Specific IgY의 역가가 가장 높은 함량의 변화를 나타내다가 그 후에는 서서히 감소한 것에 비해 수산화알루미늄을 사용한 I, J처리구는 매우 미비한 증가를 나타내었으며, 실험기간 동안 큰 변화를 나타내지 않았다.

평균 Specific IgY의 함량 또한 수산화 알루미늄 처리구(I, J)에 비해 Freund's adjuvant 처리구(D, H)가 3배 이상 많은 함량을 나타내어 수산화알루미늄이 Freund's adjuvant에 비해 백신제조 투여 시 다소 효과가 낮은 것으로 나타났다. 그리고 Freund's adjuvant 사용 시 결핵균을 같이 백신할 경우 더 많은 specific IgY가 생성되었으나, 수산화알루미늄 처리구에서의 결핵균에 의한 영향은 나타나지 않

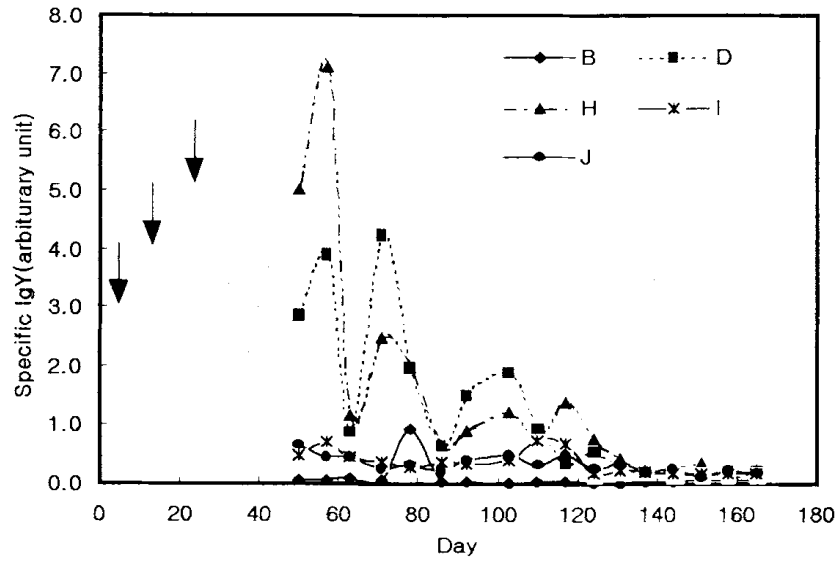


Figure 14. Adjuvant 처리에 따른 실험 기간 중 Specific IgY 함량 변화

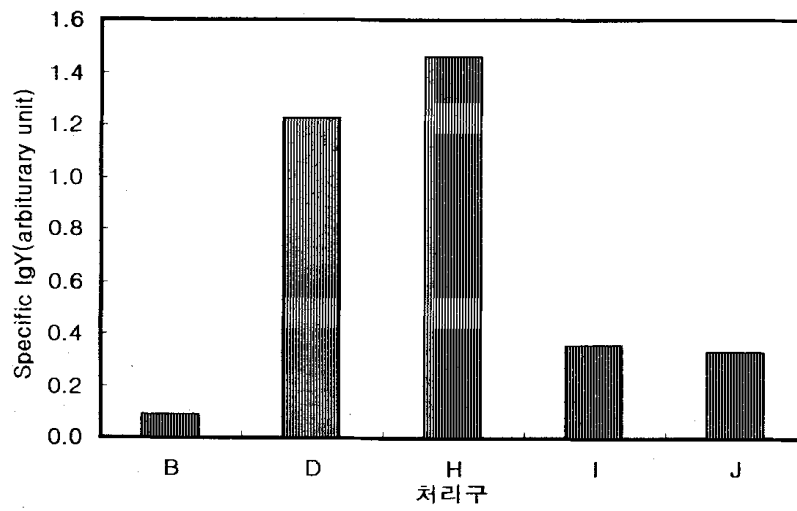


Figure 15. Adjuvant 처리에 따른 평균 Specific IgY 함량

있고, 오히려 total IgY의 결과와 마찬가지로 specific IgY의 생성이 약간 저해되는 경향을 나타내었다.

나. 산란율 감소 방지

항원을 산란계에 접종하면 산란율이 감소하는데 이를 방지하기 위하여 사료 첨가제와 접종시기를 비교하였다. 21주령에 백신을 실시한 F, G 처리군에서 시험개시 후 1주째부터 18주째까지의 산란율을 비교하면, 일반사료 + Freund 처리군(F)이 32.3%인데 반하여 참숫 0.5% + Freund 처리군(G)은 93.4%로 나타났다. 면역처리를 15주령에 실시한 경우 면역처리를 하지 않은 경우에 비해 산란율에 거의 차이가 나지 않았다. 21주령에 면역처리를 해준 경우와 15주령에 면역처리를 해준 경우를 비교할 때 별다른 차이가 없었으며, 사료에 참숫을 첨가한 경우 일반사료 급여군에 비해 산란율이 높았다. 즉 $A < B \sim C < D \sim F < G$ 로 나타났으며, 참숫처리를 하지 않은 경우 산란개시 후 7주부터 12주 사이에 산란율이 저하되는 것을 볼 수 있었다.

시험개시 후 19주째부터 25주째까지 산란율은 일반사료로서 무백신처리구인 대조군(A)이 $82.2 \pm 6.9\%$ 로서 가장 높았고, 참숫 0.5%에 무백신처리구인 B군은 $59.5 \pm 27.4\%$ 로서 20%이상 산란율이 낮았다. 그리고 일반사료 + Freund처리군 (F)과 참숫 0.5% + Freund 처리군 (G)에서는 각각 $75.5 \pm 4.9\%$, $67.0 \pm 22.3\%$ 로서 (F)군이 다소 높았다. 한편 같은 기간 중 사료 섭취량은 평균 118g/day으로서 처리군간 비슷하였다. 이상과 같은 결과로 볼 때 특수사료의 급여는 후반기에서는 산란율에 효과를 나타내지 않았으나, specific IgY를 효과적으로 증가시켰으며, 또한 전체 시험기간 동안의 평균 산란율(Figure 17)을 보면 백신투여에 의한 산란율 감소를 상당히 방지함을 볼 수 있

었다.

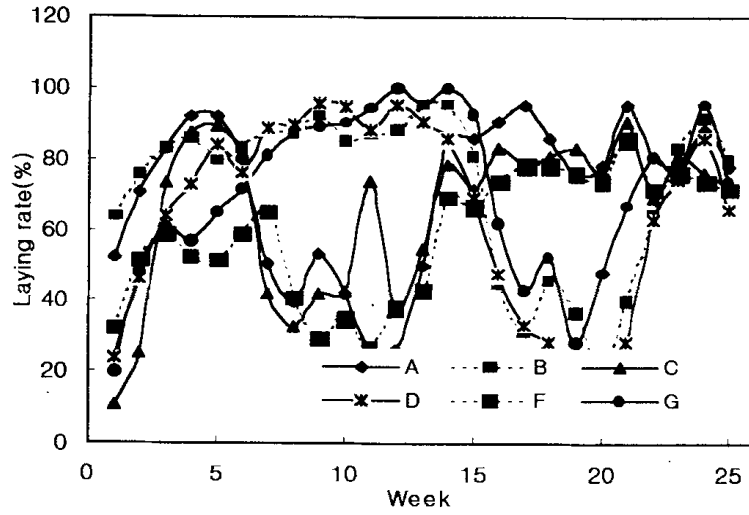


Figure 16. *Salmonella gallinarum* 균 면역에 따른 시험기간 중 산란율 변화(%)

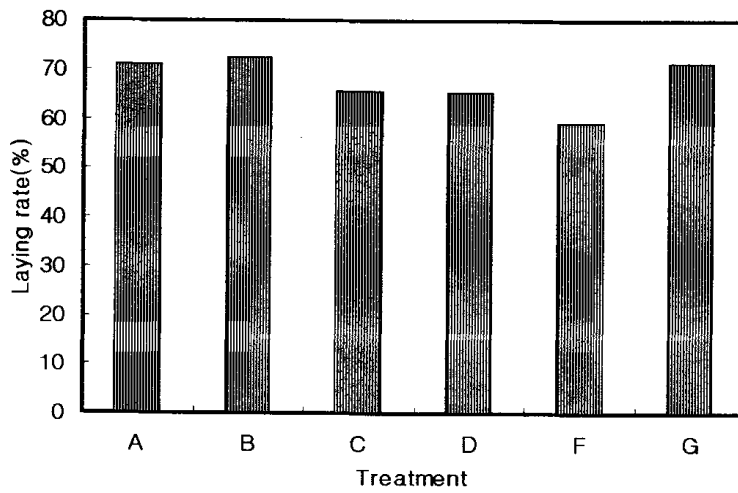


Figure 17. *Salmonella gallinarum* 균 면역에 따른 시험기간 중 평균 산란율 (%)

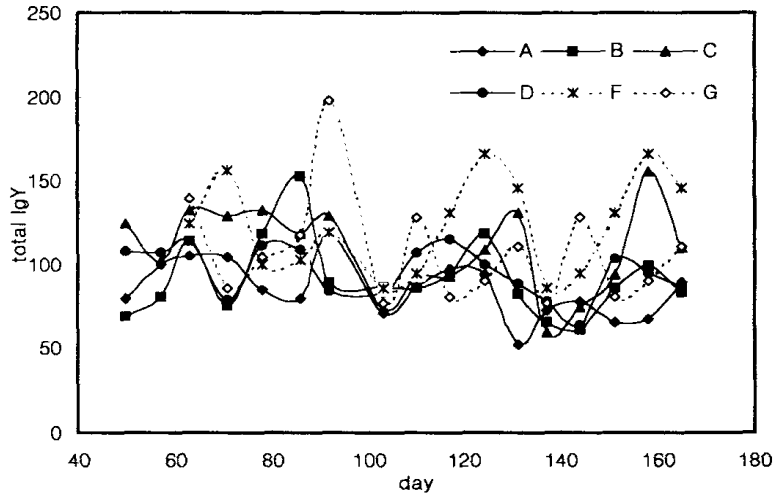


Figure 18. *Salmonella gallinarum*균 접종 시기에 따른 시험기간 중 total IgY의 변화

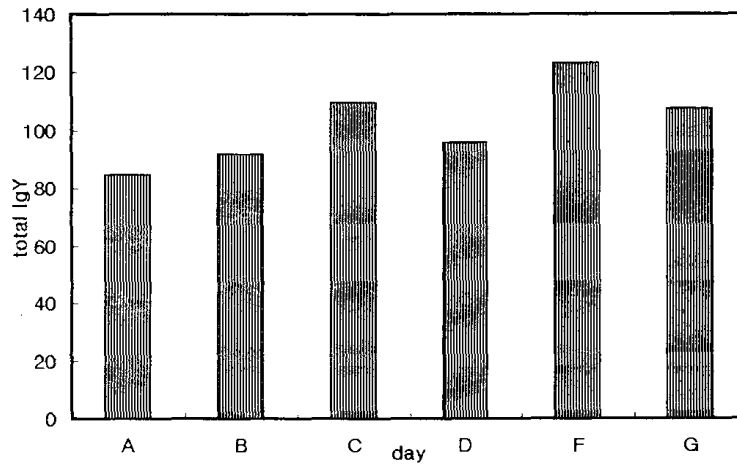


Figure 19. *Salmonella gallinarum*균 접종 시기에 따른 시험기간 중 total IgY의 평균

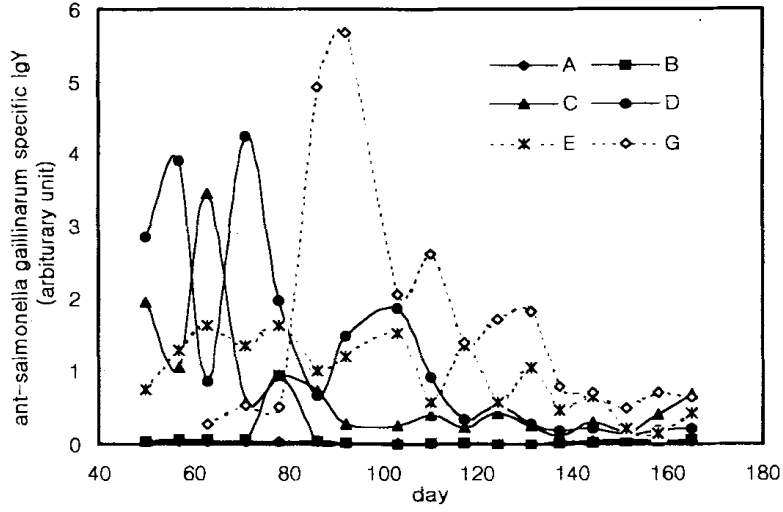


Figure 20. *Salmonella gallinarum*균 접종 시기에 따른 시험기간 중 specific IgY의 변화

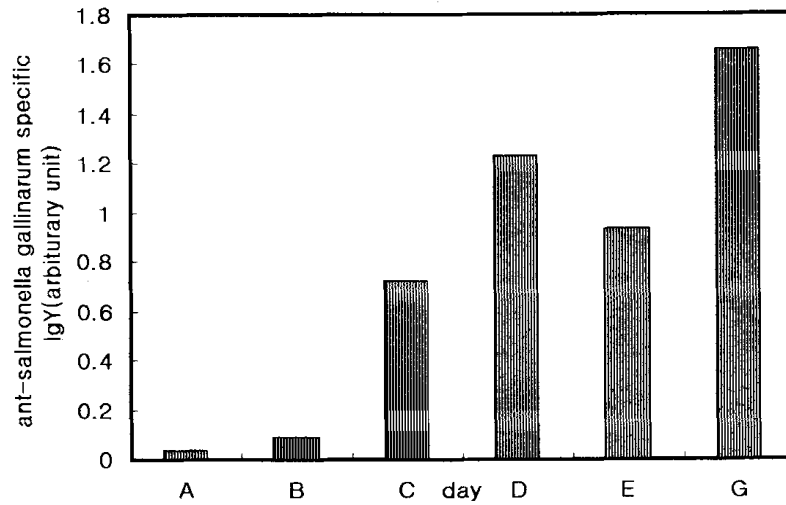


Figure 21. *Salmonella gallinarum*균 접종 시기에 따른 시험기간 중 specific IgY의 평균

6. 농장에 대한 기존 예방법 비교

가. 국내 가금 티프스균에 대한 항생제 감수성 연도별 변화

지난 '94년 10주, '97년 21주, '98년 70주의 국내분리 가금 티프스균에 대하여 항생제 내성검사를 실시하였다. 사용한 항생제는 암피실린을 비롯하여 총 11종이었으며 최근 현장농가에서 주로 사용하는 항생제를 선택하였다.

항생제 내성검사에 관련된 모든 실험은 국립수의과학검역원 조류 질병과에서 실시하였으며 국내 분리주는 국립수의과학검역원에 의뢰된 가검물 중 가금 티프스로 진단된 사례와 야외의 농장에서 병력이 있는 계군으로부터 분리하였다.

Table 7에 나타낸 바와 같이 국내 분리 가금 티프스 균에 대한 항생제 억제감수성의 연도별 변화를 보면 1992년 발생이후 매년 감수성이 급격하게 감소되는 것을 알 수 있다. '94년도에는 대부분의 항생제에 대하여 감수성이 있었으나 '98년에는 급격히 감수성이 저하되어 적게는 14% 많게는 81% 수준을 보여 야외현장에서 사용할 수 있는 항생제가 매우 제한되어 있음을 알 수 있다.

나. 가금 티프스 상재계군에 대한 사독백신별 접종 효과비교

본 연구의 목적상 사독백신의 접종프로그램 중 1차, 2차 겔 백신 프로그램과 1차 겔, 2차 오일백신을 한 프로그램을 비교하여 보았다. 어느 백신 프로그램을 적용하여도 가금 티프스의 발생을 막을 수 없었으나 겔+겔 백신 프로그램보다는 겔+오일 백신프로그램이 가금 티프스 발생을 효율적으로 억제할 수 있는 것으로 판단이 되었다.

Table 7. 국내 분리 *Salmonell gallinarum*에 대한 항생제 감수성의
연도별 변화

Antimicrobial drugs	No of Sensitive / No of isolates (%)		
	1998	1997	1994
Ampicillin	42/70 (60)	12/21 (57)	10/10 (100)
Carbenicillin	25/70 (36)	9/21 (43)	9/10 (90)
Cephalothin	31/70 (44)	-	9/10 (90)
Enrofloxacin	32/70 (46)	3/21 (14)	-
Gentamicin	29/70 (41)	17/21 (81)	10/10 (100)
Kanamycin	47/70 (67)	17/21 (81)	9/10 (90)
Nalidixic acid	17/70 (24)	1/21 (5)	-
Nitorfurantoin	10/70 (14)	-	8/10 (80)
Norfloxacin	57/70 (81)	19/21 (90)	10/10 (100)
Sulfa-trimethoprim	55/70 (79)	11/21 (52)	10/10 (100)
Tetracycline	12/70 (17)	19/21 (90)	8/10 (80)

* 모인필 등 (국립수의과학검역원: 1999)

나. 가금 티프스 상재계군에 대한 사독백신별 접종 효과비교

본 연구의 목적상 사독백신의 접종프로그램 중 1차, 2차 겔 백신 프로그램과 1차 겔, 2차 오일백신을 한 프로그램을 비교하여 보았다. 어느 백신 프로그램을 적용하여도 가금 티프스의 발생을 막을

수 없었으나 겔+겔 백신 프로그램보다는 겔+오일 백신프로그램이 가금 티프스 발생을 효율적으로 억제할 수 있는 것으로 판단이 되었다. 즉, 겔+겔 백신프로그램의 경우 접종 후 2개월부터, 겔+오일 백신프로그램의 경우 7개월 이후부터 가금 티프스가 발생을 하였으며 전체적으로 겔+겔 프로그램이 월 폐사율 3% 이내로 겔+오일의 1.0% 보다 높은 수준을 나타내었다(Table 8).

산란율의 비교에 있어서도 겔+겔 백신프로그램이 겔+오일 백신프로그램 보다 전체 평균 산란율이 낮아 겔+오일 백신프로그램이 좀더 나은 성적을 얻을 수 있었다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때 겔, 오일백신에 의한 사독백신 프로그램은 어느 정도 효과는 있지만 전반적으로 가금 티프스를 방제할 수 있지는 못하다는 것으로 판단이 된다. 따라서, 항생제의 내성이 지속적으로 증가를 하고 백신의 효력이 강력하지 못하는 것은 가금 티프스의 방제방법을 다각도로 검토하여야 할 것으로 판단된다.

다. 가금 티프스 상재계군에 대한 생균제제 투여 효과비교

가금 티프스가 상재해 있는 농장에서 병아리 입추 입추에서 육성 과정까지의 폐사율은 정상 폐사수준의 범위를 넘지 않았으며 특별한 다른 전염성질병에 의한 폐사 등 도 발견되지 않았다. 생균제제를 투약한 2개 농장의 초산일령이 일반 사독 가금 티프스 백신접종 농장보다 3-4주 빠르게 나타났고, 폐사율도 정상보다는 높았지만 가금 티프스 상재농장의 1/2수준으로 가금 티프스의 예방에 부분적인 효과적인 것으로 나타났다.

Table 8. 가금티푸스 상재계군에서의 사독백신 접종에 따른 폐사율 및 산란율 비교

계군	백신종류 및 접종주령	접종수수	구분	백신 접종 효과												
				21	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68
A	1차(겔) : 16주 2차(겔) : 19주	7,444	산란율(%)	0	4.4	47.6	69.5	82.0	83.8	81.2	80.9	81.6	57.9	70.2	69.8	66.1
			폐사율(%)	-	0.8	2.1	1.9	1.6	3.1	1.9	2.1	1.9	6.6	3.0	2.3	3.2
B		6,446	산란율(%)	0	4.7	51.4	84.9	89.5	87.8	84.4	73.1	75.4	69.2	65.6	65.7	60.1
			폐사율(%)	-	0.4	0.6	0.6	0.8	0.8	0.9	1.3	1.1	2.6	3.1	1.8	1.8
C	1차(겔) : 12주 2차(오일) : 15주	8,990	산란율(%)	0	37.0	77.3	84.6	85.9	78.3	77.4	77.4	77.3	-	-	-	-
			폐사율(%)	-	1.1	2.0	1.8	2.8	4.2	3.5	2.4	2.5	-	-	-	-
D		5,606	산란율(%)	0	40.1	80.7	85.2	81.1	70.9	72.1	73.1	70.5	-	-	-	-
			폐사율(%)	-	1.3	1.6	2.4	2.3	4.4	2.5	5.5	9.6	-	-	-	-

모인필 등(국립수의과학검역원: 1997)

현재까지의 가금 티프스 예방방제 방법들을 비교하여 볼 때 가금 티프스 사독백신 접종을 2회 실시하고 생균제 투여를 어린 병아리에 서부터 투여하는 즉, 동시에 두 방법을 적용하는 것이 효과를 극대화 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 9. 가금 티프스 상재계군에서의 생균제 접종에 따른 산란기간 중 산란율 및 폐사율의 변화

시험군	접종방법	접종 수수	투약 효과 (산란율, %)							
			20	23	26	29	32	35	38	41
A 군	음수 및 사료첨가*	16,850	6.6	52.3	90.2	87.3	90.1	87.2	90.0	89.7
B 군		9,994	6.6	42.4	83.1	83.4	83.7	90.6	90.3	90.3
시험군	접종방법	접종 수수	투약 효과 (폐사율, %)							
			20	23	26	29	32	35	38	41
A 군	음수 및 사료첨가*	16,850	0	0.4	0.2	0.8	0.4	0.5	0.7	0
B 군		9,994	0	1.0	0.3	0.7	0.1	0.5	0.6	0.5

* 병아리입추에서 3일령까지는 음수접종, 이 후부터는 사료첨가

제 3 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 특성

제1절 서 론

어미 닭이 획득한 면역 항체는 난황 중에 이행되어 축적되고 자손에 전해진다. 난황 중의 항체는 포유류의 IgG 계열의 항체에 해당되나 단백질화학적 성질이 약간 다르고, 또한 난황 유래의 항체이므로 비교면역학 분야 등에서는 IgY(Immunoglobulin Yolk)라 부른다. 계란 중에는 난백에 IgM 및 IgA가 각각 1 ml 당 약 0.2 mg ~ 0.7 mg 함유하고 있으며 IgG는 난황에만 특이적으로 존재하고 그 농도는 1 ml 당 약 10 mg이다.

IgY와 포유류 IgG는 단백질화학적 성질이 차이가 있는데 IgY의 분자량은 포유류 IgG의 분자량보다도 크다. IgY 유전자의 크로닝이 연구되고 있는데 IgY의 heavy쇄 정상 영역은 4개의 domain(포유류 IgG는 3개)으로 구성되어 있으며 그 구조는 포유류 IgG 보다도 오히려 IgM 및 IgE를 구성하는 Immunoglobulin 분자에 유사한 것으로 나타났다. Yada 등은 IgY와 토끼 IgG의 분자구조의 차이에 대하여 비교 연구를 했는데 IgY의 정상 영역의 베타시드의 함량은 IgG 보다도 적고, IgY 힌지(Hinge) 영역의 Flexibility는 IgG 보다도 적었다고 보고하였다. 또한 IgY의 아스파라긴 결합형 당쇄중 27.1%만이 당(糖)

쇄 말단에 glucose기를 갖고 있으며 그 구조는 포유류 IgG에 존재하지 않은 유니크한 당쇄구조라는 것이 판명되었다.

항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 특성을 조사하기 위하여 1차년도에 확립된 항원화 기술과 면역처리 기술에 따라 산란계를 공시하여 항-살모넬라 갈리나룸 IgY를 생산한다. 면역처리된 계란으로부터 항-살모넬라 갈리나룸 면역단백질을 여러 가지 방법으로 추출 정제한 후 항체 분자량 등 항체 단백질의 특성을 분석한다. 면역항체의 가공 적성과 저장 적성을 평가하기 위하여 분말 IgY와 IgY 조항체 용액의 열 안정성과 pH 안정성을 시험한다.

생산된 IgY 중의 항-살모넬라 갈리나룸 항체의 비율을 조사하기 위하여 IgY와 균체의 binding을 관찰하는 면역침강법을 실시하고, 더불어 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 가금 티푸스 균에 대한 효과를 알아보기 위하여, ELISA 법 등에 의해 IgY의 균체 반응을 *in vitro* 상에서 조사한다. 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 선택성을 살모넬라 갈리나룸과 유사한 균들을 비교하면서 분석한다.

제2절 재료 및 방법

1. 산란계 사육시험을 통한 IgY 생산 시험

산란계는 13주령 된 IsaBrown종을 110수 구입하여 산란계용 cage에 두 마리씩 넣고 동물사육실에서 사육하였다. 1차년도의 결과에 따르면 참숫은 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 생산 효율을 높이고 산란을 저하를 방지하는 효과가 있으므로 참숫 0.5%가 첨가된 대추용

사료를 이용하였다.

Salmonella gallinarum 균의 배양은 tryptic soy broth(Difco)에 균을 접종한 후 37°C 항온기에서 24시간 배양하였고 항원은 균 최종 농도를 10^8 으로 조절한 후 Table 10에서와 같이 *Salmonella gallinarum* : Freund's adjuvant를 1 : 1의 비율로 emulsion을 제조하였다. 제조된 emulsion은 1 ml씩 15주령 이후 2주 간격으로 총 3회 접종(1차 - Adjuvant complete, Freund, 2·3차 - Adjuvant incomplete, Freund)하였으며 산란율은 3차 접종일부터 측정하였다.

Table 10. 제2차 산란계 사육시험

Antigen	Vaccination	Vaccination schedule	Vaccination treatment
No	No	-	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	Freund's adjuvant	2주 간격으로 접종	3

2. 난황에서 water soluble protein fraction 분리

Carrageenan에 의한 인지질 침전을 비교하기 위하여 분리된 난황을 증류수와 섞은 후 0.1% gum solution을 첨가하여 상온에서 30분간 방치하고 $10,000 \times g$ 에서 15 min 간 원심분리 후 lipoprotein fraction을 제거하여 water soluble protein fraction을 분리하였다. 한편 분리된 water soluble protein fraction 시료는 동결건조를 실시하여 분말로 제조하였다.

3. 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 추출과 정제

가. Carrageenan 종류에 의한 water soluble fraction 추출 비교

Lambda-carrageenan을 이용한 난황으로부터의 water soluble fraction의 추출 효율과 경제성을 비교하기 위하여 비교적 고가인 Sigma사의 Lambda-carrageenan과 국내산 MSC사의 Lambda-carrageenan의 사용을 비교하고자 하였다. Table 11에서와 같이 Lambda-carrageenan의 종류와 농도에 따라 water soluble protein fraction을 추출하고 IgY의 회수율 및 total IgY 함량과 specific IgY의 역가를 비교하였다.

Table 11. Comparison of IgY separation by various carrageenans

	Carrageenan 종류	농도(%)
1	Carrageenan Lambda(Sigma C-3889)	0.1
2	MSC #10387 (냉수 가용성)	0.1
3	MSC #10387 (냉수 가용성)	0.2
4	MSC #10386 (90℃ 가용성)	0.1
5	MSC #10386 (90℃ 가용성)	0.2
6	냉수가용성(0.1%) : 90℃ 가용성(0.1%) = 1 : 1	0.1
7	냉수가용성(0.2%) : 90℃ 가용성(0.2%) = 1 : 1	0.2

나. Gamma Yolk™에 의한 IgY 추출

Gamma Yolk™는 Pharmacia Biotech에서 시판되는 IgY 추출 kit이다. 본 실험에서는 Pharmacia Biotech에 의해 제시되어진 방법을 통하여 IgY를 추출하였다. 즉, 난황 10 g을 채취하고 5 ml PSB(pH 7.4)를 넣고 섞는다. Separation Reagent 1을 1.5 ml 넣은 후 10,000g × 15분간 원심분리한다. 상등액의 부피(× ml)를 잰 후 buffer solution 2를 상등액과 동량(× ml)으로 섞는다. 15분간 방치하고 separation reagent 3을 상등액의 2배(2× ml) 만큼 섞는다. 다시 15분간 방치한 후 10,000g × 15분간 원심분리한다. 침전물을 동량(× ml)의 tris-buffer(pH 9.0-9.5)에 녹인다. 침전물을 동량(× ml) 물에 녹인 후 separation reagent 3에 의한 단계를 반복한다.

다. EGG stract™

EGG stract™ IgY Purification System은 Promega사에서 시판되는 IgY 추출 kit이다. 본 실험에서는 Promega사에서 제시한 방법을 통하여 IgY를 추출하였다. 즉, 난황 10 g을 채취하고 solution A를 30 mL 넣은 후 5분간 섞은 후 10,000g × 10분간 원심분리한다. 상등액을 4겹의 거즈로 여과하고 상등액의 부피(× ml)를 잰 후 solution B를 상등액의 1/3에 해당하는 양만큼(1/3 × ml) 섞는다. 5분간 섞어주고 나서 10,000g × 10분간 원심분리한다. 침전물을 10 ml의 PSB (pH 9.0 - 9.5)에 녹인 다음 solution B에 의한 단계를 반복한다.

라. Gel Chromatographic system에 의한 정제

난황항체 IgY solution으로부터 순수한 IgY를 얻기 위하여 항체를 정제하였다. Sepharose CL-2B의 작성은 3,000 rpm에 15분간 원심 후 분리된 상층액을 sample로 이용하였으며, 0.1M NaCl로 elution하였고 spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 각 fraction의 optical density를 측정하였다.

또한 Sepharose CL-6B를 이용하여 chromatography를 실시하였다. column은 1.6 × 30 cm를 이용하였으며 buffer는 0.03M Tris pH 8.0을 60 ml/hr의 flow rate로 흘렸다. 조항체 용액(wsf) 150 μ l를 injection 하였다.

마. SDS-PAGE 전기영동에 의한 항체 IgY 분자량 측정

분리된 면역단백질(항-살모넬라 갈리나룸균 IgY)의 분자량 측정은 Laemmli 방법(1970)에 의하였으며, 분리된 IgY의 분자량 측정은 SDS-PAGE로 시행하였다.

4. IgY의 pH·열 안정성

항-*Salmonella gallinarum* IgY의 pH 안정성을 검토하기 위해 water soluble protein fraction을 사용하거나 항-*Salmonella gallinarum* IgY 분말을 phosphate buffer에 resuspend 하여 이용하였다. pH는 phosphate buffer를 사용하여 각 pH를 2~10의 범위로 조정하고 다음 37°C에서 4시간 방치 후 다시 pH 7.0으로 조정하여 잔존하는 total IgY와 specific IgY 역가를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

열 안정성을 측정하기 위해서는 역시 water soluble protein

fraction을 사용하거나 항-*Salmonella gallinarum* IgY 분말을 phosphate buffer에 resuspend 하여 이용하였다. 시료를 50, 60, 70, 80°C의 water bath에서 5, 10 min. 가열한 후 재빨리 급냉하여 잔존하는 total IgY와 specific IgY의 역가를 분석하였다.

5. IgY의 항체 항원 결합

가. 난황항체의 유효성 검사

난황항체의 *Salmonella gallinarum* 균주에 대한 결합효과를 간접적으로 알아보기 위하여 *Salmonella gallinarum* cell과 난황항체를 *in vitro* 상에서 반응시킨 후 항체의 항원결합 정도를 ELISA 법으로 측정하였다.

1) 균주의 준비

Salmonella gallinarum 균주의 배양은 tryptic soy broth(Difco)로 배양하였으며 식염수로 washing 후 농축하여 현미경으로 균수를 counting 한 후 희석하여 4.0×10^9 CFU/ml로 만들어 사용하였다. 균수와 660nm에서의 흡광도 표준곡선은 3.0×10^9 CFU/ml 농도인 cell을 식염수로 단계별로 희석하여 660nm에서의 O.D. 값을 측정한 후 농도곡선을 Figure 22와 같이 작성하였다.

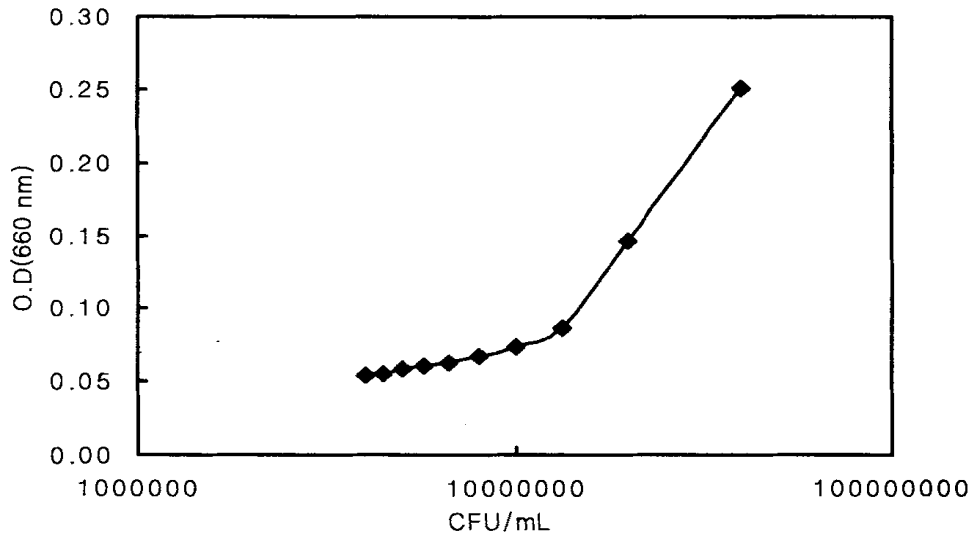


Figure 22. Standard curve of O.D(660 nm) and cell count of *Salmonella gallinarum*

2) IgY-Biotin conjugation

난황에서 추출한 water soluble fraction(WSF)에서의 단백질 함량을 측정 후 단백질 30 μ g에 해당되는 WSF에 NHS-LC-Biotin(Pierce) 600 μ l(1mg/ml)을 섞어 2 시간동안 얼음에 방치하였다. 이를 PBS buffer 10mM pH 7.4에서 dialysis하였다.

3) 난황항체와 균주의 결합

살모넬라 사균을 PBS-tween(PBST)으로 농도별로 희석하여(10^9 , 3.3×10^8 , 10^8 , 3.3×10^7 , 3.3×10^6 , 10^6 CFU/ml) 균 농도에 대한 standard로 사용하였다. 한편, 균 10^9 CFU/ml에 냉동건조된 분말 IgY를 각 농도별로 첨가하여(1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/ml) 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양시켰다. PBST로 2회 washing하여

resuspend 후 사용하였다.

4) ELISA test

난황의 WSF를 0.02M Tris-HCl saline pH 9.0 buffer로 50배 희석한 후 microplate에 넣고 냉장고에서 overnight 하였다. standard 용 균주들과 난황항체와 결합된 균주들을 넣고 1시간동안 반응시킨 후 washing하고, Avidin-HRP을 3000배 희석하여 반응시켰다. TMB와 H₂O₂를 넣은 phosphate-citrate buffer를 기질용액으로 사용하여 1시간동안 반응시킨 후 2N H₂SO₄ 용액으로 반응을 정지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 특이항체의 균주특이성 조사

항체의 항원에 대한 결합 능력을 조사하기 위하여, ELISA에 의하여 유사한 세 종류의 *Salmonella* 균주 (*gallinarum*, *typhimurium*, *enteritidis*)에 대한 특이항체의 균주 특이성을 조사하였다. 먼저 균체를 회수하고 660 nm에서 0.07이 되는 지점까지 희석하여 microplate에서 하룻밤 coating하였다. 이하 ELISA는 앞의 방법과 같이 시행하고 특이항체와 세 균주의 반응을 구하였다. 그리고 1차 항체, IgY는 100배에서 100,000배까지 희석하여 사용하였다. 또한, anti-chicken IgG-HRP는 30,000배 희석하여 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 산란계 사육시험을 통한 IgY 생산 시험

가. 산란율

2년차에 실시한 제 2차 사양시험에서의 산란율은 Figure 23에서 보여주듯이 모든 처리구는 접종 후 3주째부터 산란율이 점차 증가하였고 그 이후로 80% 이상의 높은 산란율을 유지하였으며 Figure 24에서와 같이 대조구(83.9%)와 *Salmonella gallinarum* 접종 처리구(81.1%)간의 유의적 차이는 관찰되지 않았다. 특히 *Salmonella gallinarum* 접종 처리구의 경우 8주째에 97.6%로 가장 높은 산란율을 나타내었다.

나. Total IgY

*Salmonella gallinarum*를 항원으로 하여 산란계에 Freund's adjuvant로 면역시킨 후 생산된 계란에서 IgY 함량을 분석한 결과 total IgY는 84.2 mg/ml water soluble protein fraction로 76.7 mg/ml water soluble protein fraction의 대조구보다 약간 높은 경향을 나타내었다(Figure 25, Figure 26)

다. Specific IgY

산란계 공시 시험에서 *Salmonella gallinarum* 처리구의 경우 anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY는 3차 접종 후 3주째 가장 높은 함량을 보여주었고(Figure 27) 대조구에 비해 약 190배 정도 높은 함량을 나타내었다. 최종 접종 10주 이후에는 다소 감소하는 양상을 보여주었음에도 불구하고 접종을 하지 않은 대조구에 비해 여전히 116배 이상 많은 specific IgY가 잔존함이 확인되었다.

이 결과는 1차년도에 실시된 산란계 공시 시험에 비해 *Salmonella*

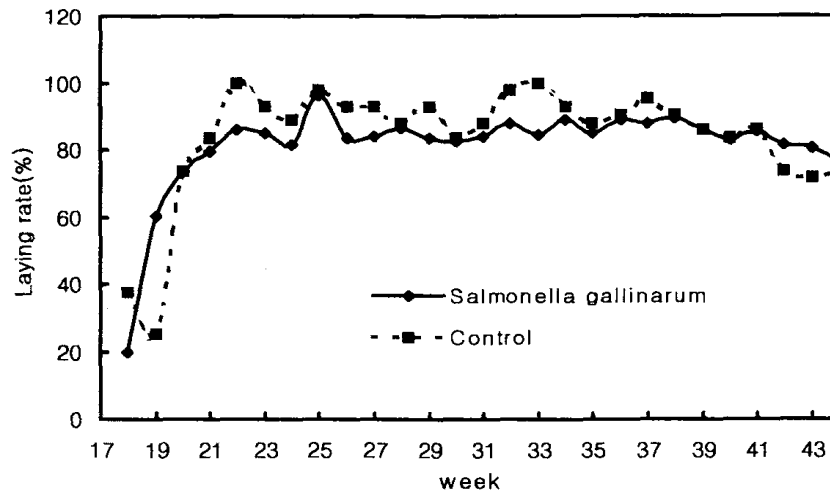


Figure 23. Laying rate of hens with vaccination of *Salmonella gallinarum*

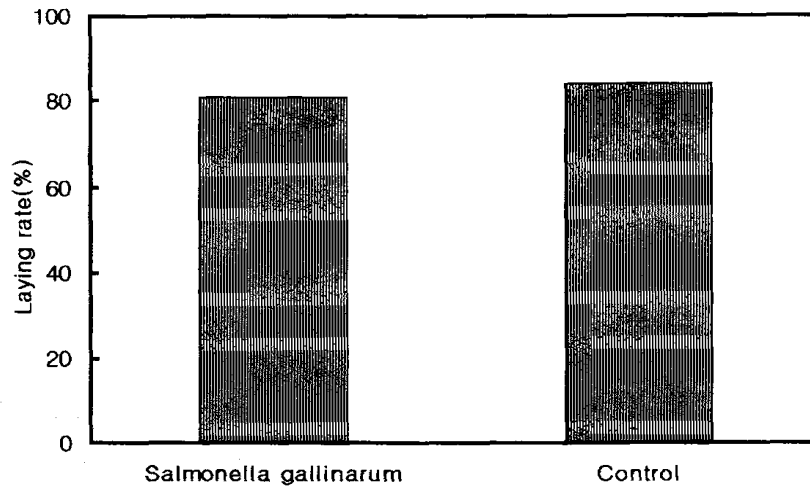


Figure 24. Average laying rates of hens with vaccination of *Salmonella gallinarum*

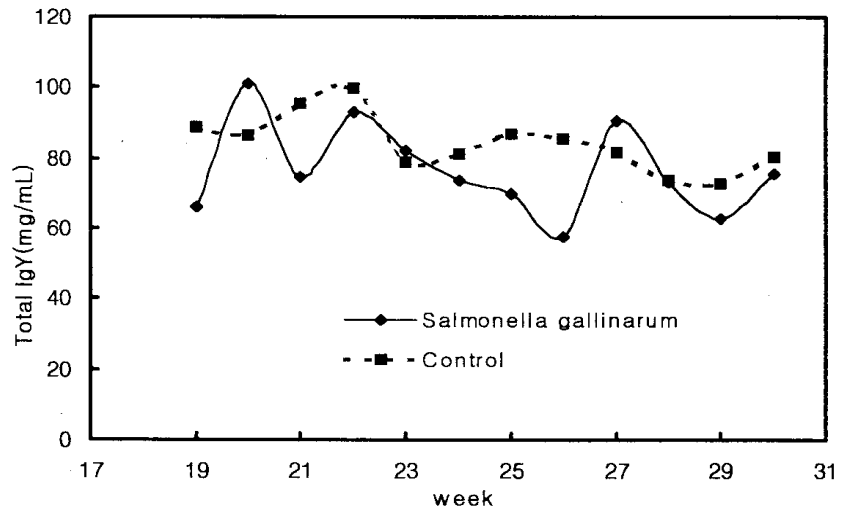


Figure 25. Changes of total IgY content.

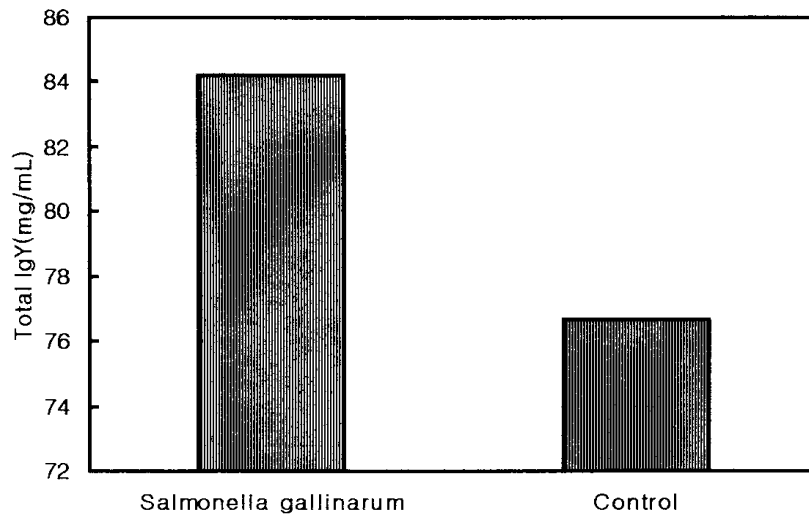


Figure 26. Average of total IgY content.

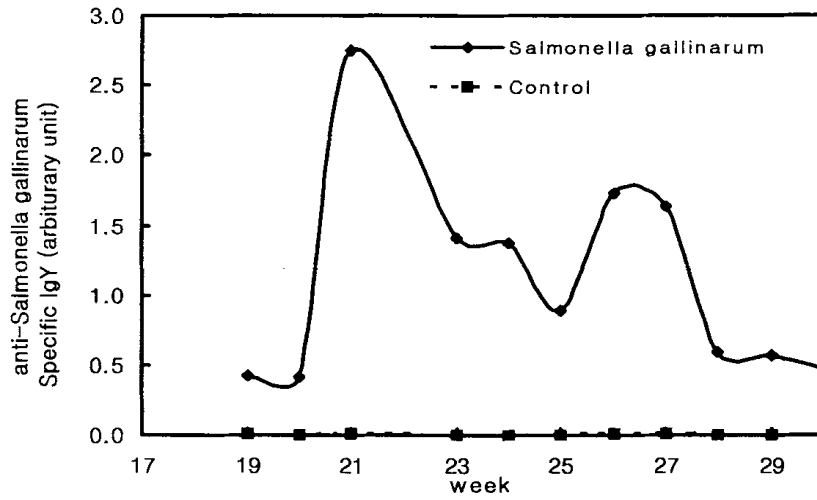


Figure 27. Changes of anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY content.

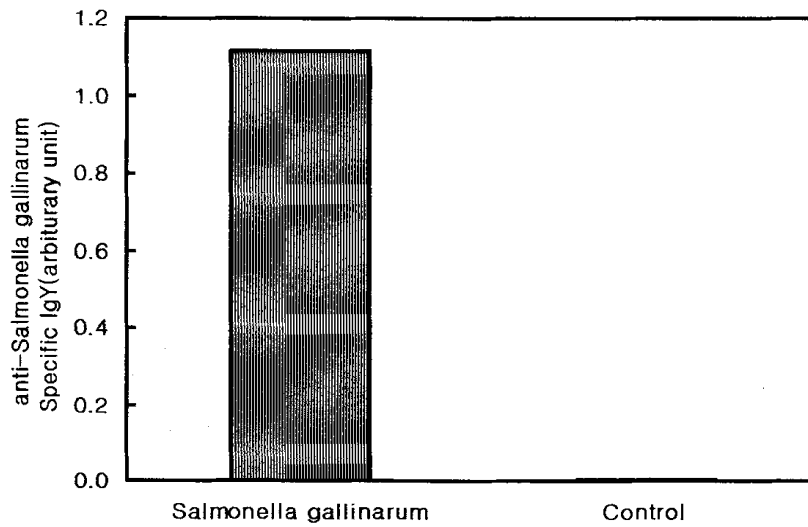


Figure 28. Average of anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY content.

gallinarum 접종구와 비접종구 간의 차이가 확연한 것으로 여겨졌다.

2. 난황에서 Water soluble protein fraction의 분리

IgY의 대량생산을 실시하였다. 분리된 난황에서 냉수 가용성 carrageenan 0.1%를 사용하여 water soluble protein fraction만을 얻었고 동결건조를 통해 분말화하였다. 이때 냉동된 water soluble protein fraction 19.38 kg로부터 2.55 kg의 건조분말이 회수되어 회수율이 약 0.13%였다.

3. 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 추출과 정제

가. Carrageenan 종류에 의한 water soluble fraction 추출 비교

분리된 충분히 혼합한 후 carrageenan 종류에 따라 각각 25 g씩 사용하였다. Carrageenan은 복합다당체이므로 그 구조에 따라 종류가 다양하고 심지어는 lambda-carrageenan 내에서도 냉수 가용성, 열수 가용성 등으로 나뉜다. 이러한 Carrageenan의 종류와 농도에 따라 water soluble fraction 회수율 및 total IgY와 specific IgY의 함량을 비교한 결과 Table 12와 같다.

회수율은 lambda-carrageenan 0.1%와 0.2% 냉수 가용성 carrageenan이 가장 높았으며, total IgY는 0.1% 90℃ 가용성 + 0.1% 냉수가용성 carrageenan이 가장 많은 양을 나타내었다. 90℃ 가용성 carrageenan과 냉수 가용성 carrageenan을 비교하면 냉수 가용성이 더 많은 total IgY 함량을 나타내었다. *Salmonella*

gallinarum specific IgY 또한 0.1%, 90°C 가용성 + 0.1% 냉수 가용성 carrageenan이 가장 높았으나, 0.1% 및 0.2% 냉수가용성과 90°C가용성을 비교해 보면 냉수가용성이 0.1%와 0.2%에서 큰 변화없이 다소 안정되고 높은 회수율을 나타내었다.

따라서 다양한 종류의 carrageenan을 이용하여 IgY를 분리하는 경우 냉수 가용성 carrageenan의 사용이 water soluble fraction의 수율도 좋고 carrageenan의 값도 저렴하여 IgY를 대용량으로 분리할 때 가장 유용한 것으로 사료되며 carrageenan의 농도는 0.1%가 적당할 것으로 사료되었다.

Table 12. Comparison of IgY separation methods

	Carrageenan 종류	농도(%)	Filter 후 회수된 량 (ml)
1	Carrageenan Lambda (Sigma C-3889)	0.1	110
2	MSC #10387 (냉수 가용성)	0.1	105
3	MSC #10387 (냉수 가용성)	0.2	110
4	MSC #10386 (90°C 가용성)	0.1	95
5	MSC #10386 (90°C 가용성)	0.2	93
6	냉수 가용성 (0.1%) : 90°C 가용성 (0.1%) = 1 : 1	0.1	80
7	냉수 가용성 (0.2%) : 90°C 가용성 (0.2%) = 1 : 1	0.2	104

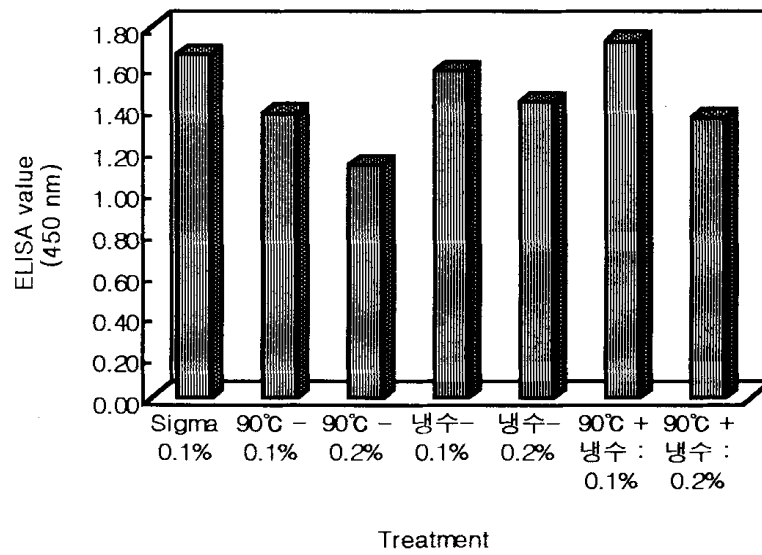


Figure 29. Total IgY content of water soluble fraction prepared by various lambda-carrageenan

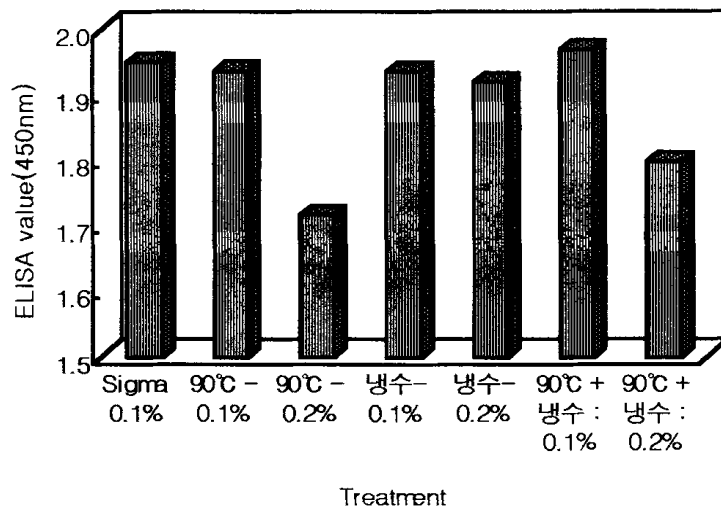


Figure 30. Anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY content of water soluble fraction prepared by various lambda-carrageenan

나. Gamma Yolk™

Gamma Yolk™ 추출방법은 PSB와 tris-buffer를 제외하고도 세 가지 용액을 필요로 하며 추출시간은 1시간 이상 소요된다. 추출된 액은 45.95%의 순도를 보여주었으며 0.766 mg/g yolk의 IgY 수율을 나타내었다. 또한 specific IgY는 yolk 1 g 당 50.4 A.U.를 나타내었다.

다. Egg stract™

Egg stract™은 carrageenan 추출방법과 비교해 다소 낮은 specific IgY 값을 보여주나 gamma yolk에 비해서는 다소 약 2배 정도 증가된 값(71.8 A.U./g yolk)을 나타내었다. 분리된 액의 수율은 48.1%를 나타내었고 IgY의 yolk 1 g당 수율은 0.919 mg으로 회수되었다.

라. IgY의 SDS-PAGE 전기영동

Non-reducing SDS-PAGE를 실시한 경우 Chick IgG band는 140 kDa과 232 kDa 사이에서 나타났다. 180 kDa의 band의 density를 전체 band들의 density의 합으로 나누어서 순도를 측정한 결과 natural gum 방법은 약 20%가 IgY로 밝혀졌으며 gamma Yolk™는 46%, EGG stract™는 48% 정도로 나왔다. 물론 gamma Yolk™와 EGG stract™에서 추출단계를 더 높일 경우 81%와 73%로 순도가 각각 상승되었다.

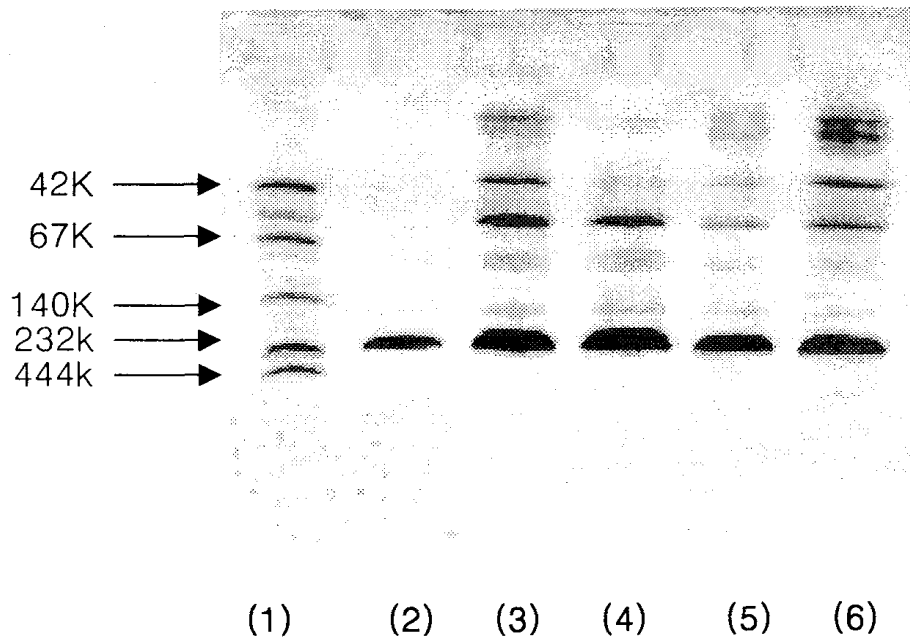


Figure 31. Non-reducing SDS-PAGE of IgY on 4-15% gradient Phastgel.

Lane 1 : High molecular weight marker

Lane 2 : Chick IgG

Lane 3 : solutions from EGGstract™ method(C-1 method)

Lane 4 : solutions from EGGstract™ method(C-2 method)

Lane 5 : solutions from gammaYolk™ method(B-2 method)

Lane 6 : solutions from gammaYolk™ method(B-1 method)

4. Gel Chromatographic system에 의한 정제

난황항체 IgY solution으로부터 순수한 IgY를 얻기 위하여 항체를 정제하였다. Figure 32에서와 같이 sepharose CL-2B의 작성은 3,000 rpm 15분간 원심 후 분리된 상층액을 sample로 이용하였으며, 0.1M NaCl로 elution하였다. Spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 각 fraction의 optical density를 측정에서, Figure 32에서와 같이 2개의 peak가 나타났으며 2번째 peak fraction이 chicken IgY로 확인되었다.

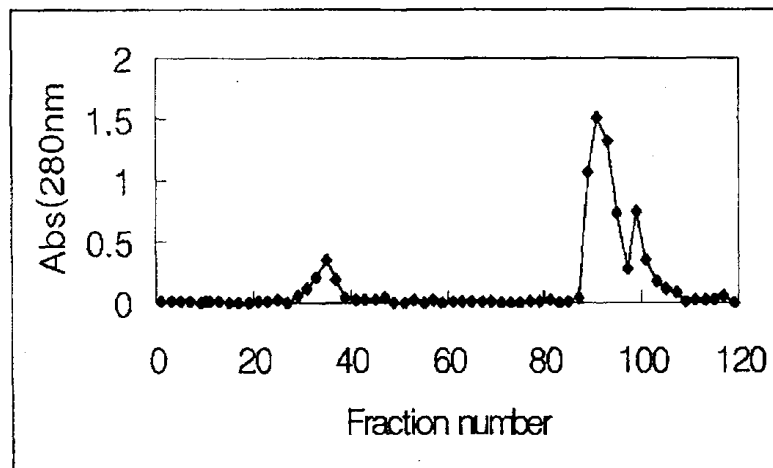


Figure 32. Chromatogram of the IgY.

Sephacrose CL-6B를 이용하여 chromatography를 실시한 결과 Figure 33과 같은 peak를 얻었다. CL-2B에서 peak의 구분이 확실치 않던 peak가 구분이 되면서 적어도 3개의 peak를 발견하였다.

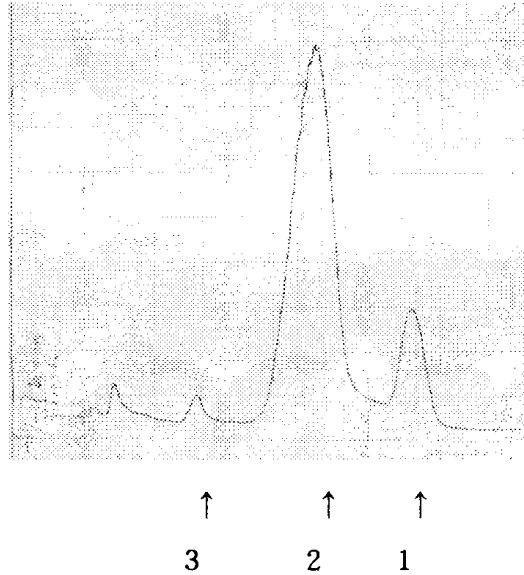


Figure 33. Chromatogram of the IgY.

Sepharose CL-2B를 통하여 peak 1과 peak 2에서 IgY의 특성이 나타났으므로 peak 1과 peak 2 중에서 어느 것이 IgY인가를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Injection 양이 소량이었으므로 Coomassie staining으로는 구분을 할 수 없어 Silver staining을 실시한 결과 Figure 34와 같이 나타났다. Peak 2에서 IgY의 특성 band를 관찰할 수 있었다. 각 peak의 단백질 함량은 peak 1이 0.106 mg/ml였고 peak 2가 0.144 mg/ml, peak 3이 0.038 mg/ml이었다.

Homogeneous 7.5 gel을 이용한 reducing SDS-PAGE를 통하여 peak 2와 시판되는 IgY를 비교하였다(Figure 35). IgY fragment의 분자량은 66,000 ~ 97,400 사이에 있었고 약 84,000 정도에 해당하는 것으로 나타났다.

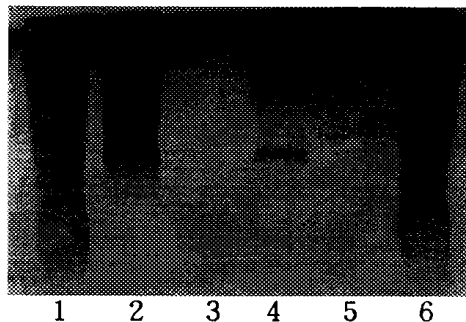


Figure 34. Non-reducing SDS-PAGE of IgY on 4-15% gradient Phastgel.

- Lane 1 : High molecular weight marker
- Lane 2 : Water soluble fraction of yolk(1/2 dilution)
- Lane 3 : Water soluble fraction of yolk(1/5 dilution)
- Lane 4 : peak 2
- Lane 5 : peak 1
- Lane 6 : High molecular weight marker

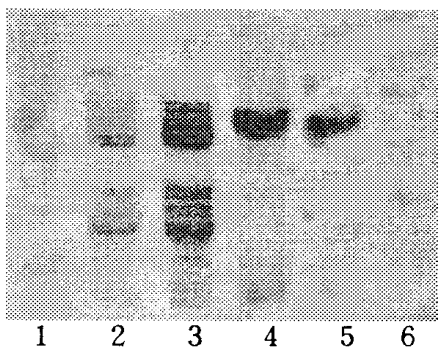


Figure 35. Reducing SDS-PAGE of IgY on 7.5% homogeneous Phastgel.

- Lane 1 : High molecular weight marker
- Lane 2 : Water soluble fraction of yolk(1/5 dilution)
- Lane 3 : Water soluble fraction of yolk(1/2 dilution)
- Lane 4 : chick IgY
- Lane 5 : peak 2
- Lane 6 : High molecular weight marker

5. 면역 항체의 stability 측정

가. IgY의 pH 안정성

pH 안정성을 검토하기 위해 0.1N NaOH와 0.1N HCl로 각 pH를 조정 한 다음 37°C에서 4시간 방치 후 다시 pH 7.0으로 조정하여 total IgY와 specific IgY를 측정하였다. 그 결과 *Salmonella gallinarum* 처리구의 total IgY 및 specific IgY 모두 pH 4~10까지 대체로 안정된 경향을 나타내었고 pH 2에서는 급격히 감소됨을 보여주었다.

따라서 *Salmonella gallinarum* 처리구의 water soluble protein fraction는 산보다는 알카리 조건에서 더 안정적임이 확인되었고 이는 계란이 pH가 높은 알카리 환경이기 때문에 total IgY와 specific IgY가 알카리 조건에서 더 안정적인 것으로 나타났다.

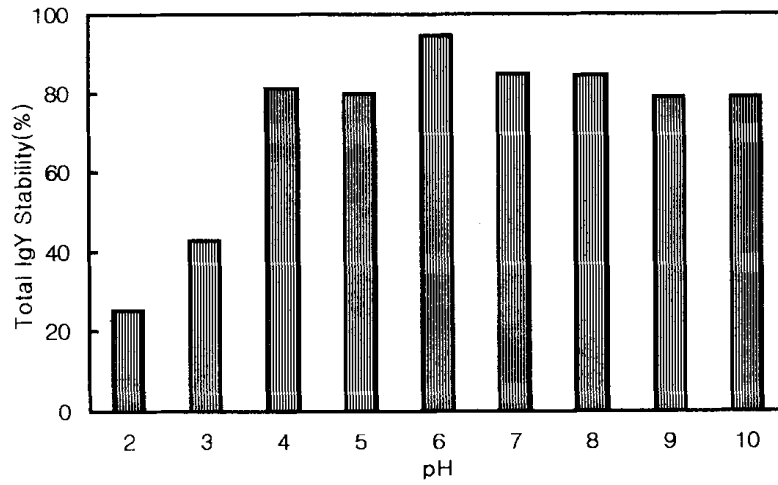


Figure 36. Total IgY stability of water soluble fraction of yolk depending on pH.

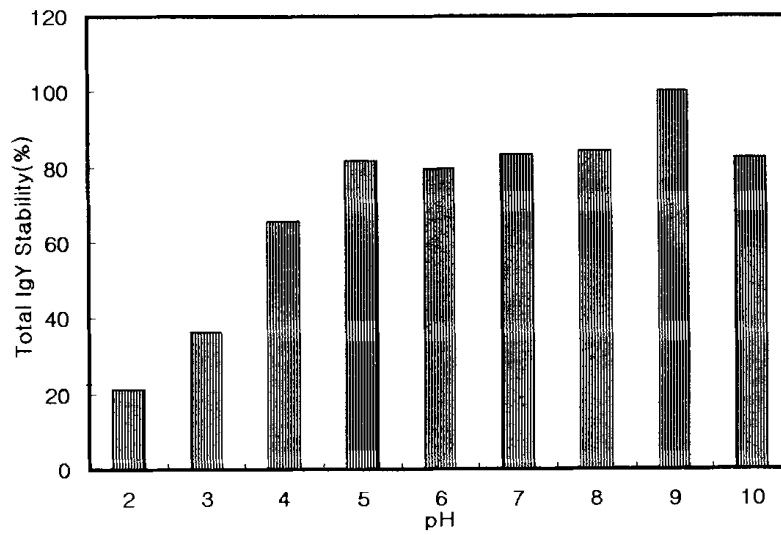


Figure 37. Total IgY stability of 1% IgY solution depending on pH.

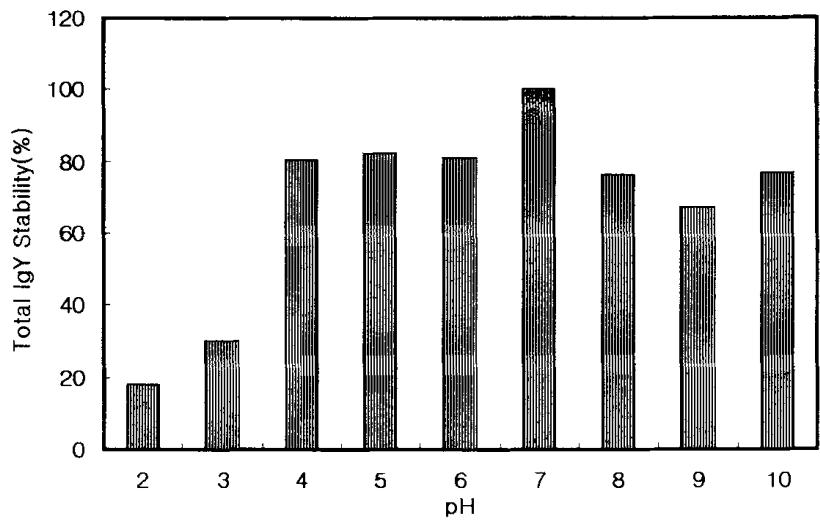


Figure 38. Total IgY stability of 2% IgY solution depending on pH.

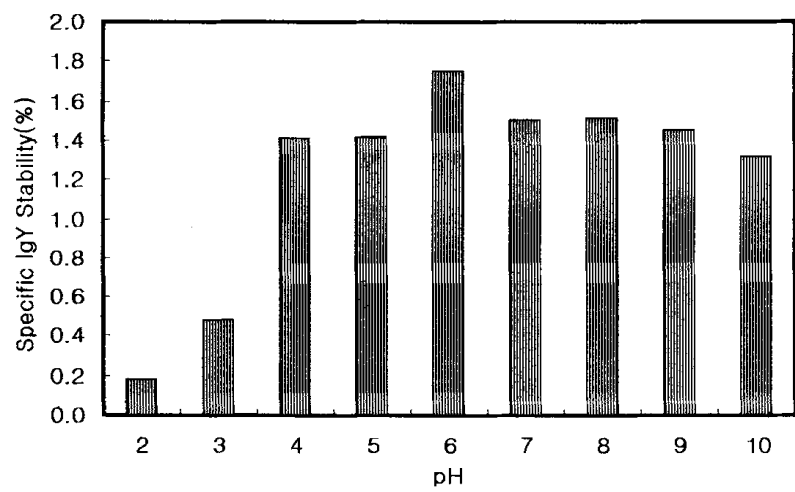


Figure 39. Specific IgY stability of water soluble fraction of yolk depending on pH.

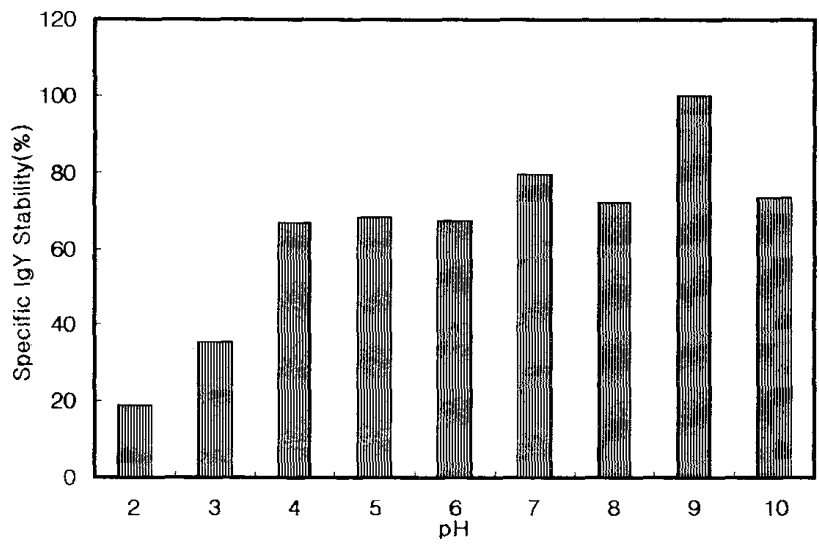


Figure 40. Specific IgY stability of 1% IgY solution depending on pH.

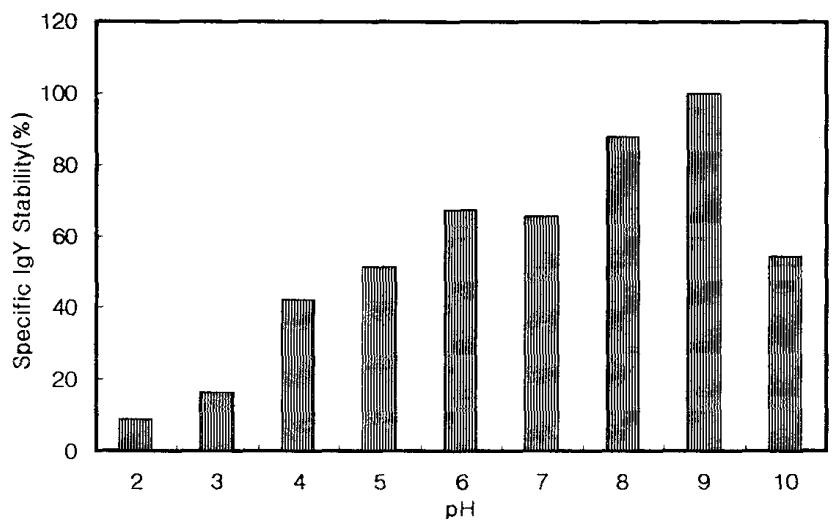


Figure 41. Specific IgY stability of 1% IgY solution depending on pH.

나. IgY의 열 안정성

IgY의 열 안정성을 측정하기 위해 50, 60, 70, 80°C에서 5, 10 min 처리하고 난 후 total IgY와 specific IgY의 함량을 분석하였다. 열안정성 측정결과 total IgY는 5 min, 10 min 처리구 모두 50°C와 60°C의 온도에서 매우 안정적인 양상을 보여주었으며 60°C에서 10 min간 열처리를 하는 경우에도 88.6%의 비교적 높은 잔존량을 보여주었다.

Specific IgY 또한 50°C와 60°C에서 모든 처리구가 약 87.4~99.7%의 높은 함량으로 유지됨이 관찰되었고 이에 *Salmonella gallinarum*를 처리한 water soluble protein fraction이 60°C의 높은 온도에서도 비교적 긴 시간 가열함에도 불구하고 안정적임이 확인되었다. 한편 5 min과 10 min 처리구 사이의 차이는 거의 관찰되지 않았고 열에 노출이 적은 5 min 처리구가 다소 안정한 경향으로 나타났다.

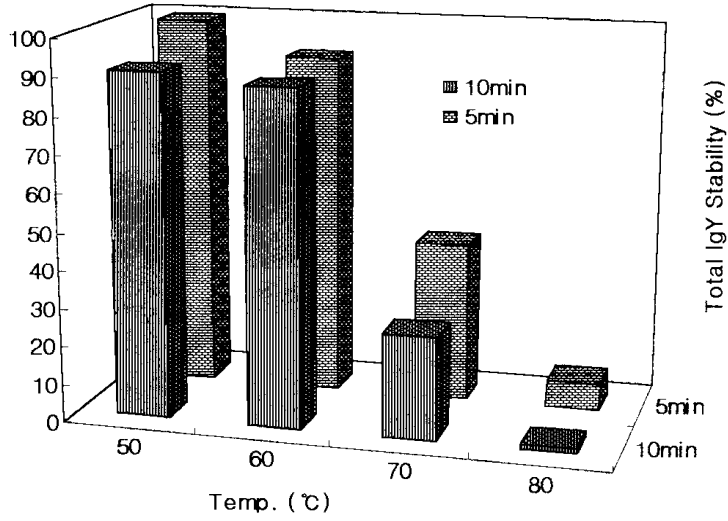


Figure 42. Total IgY stability of water soluble fraction by various temperature.

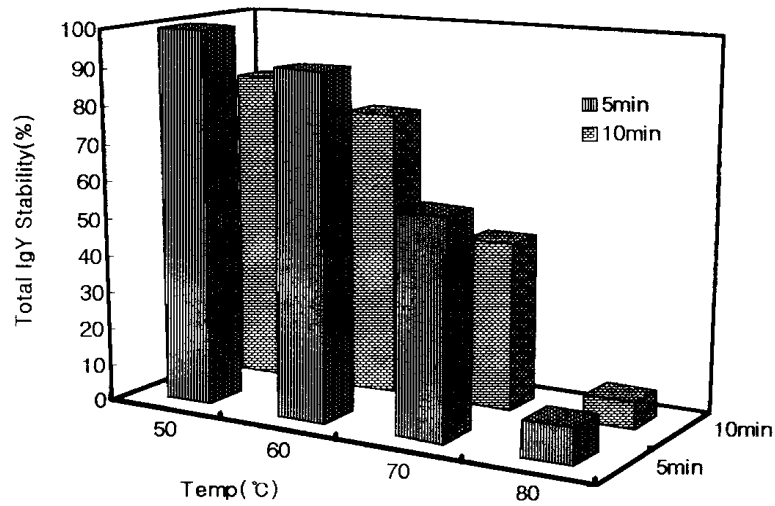


Figure 43. Total IgY stability of 1% IgY solution by various temperature.

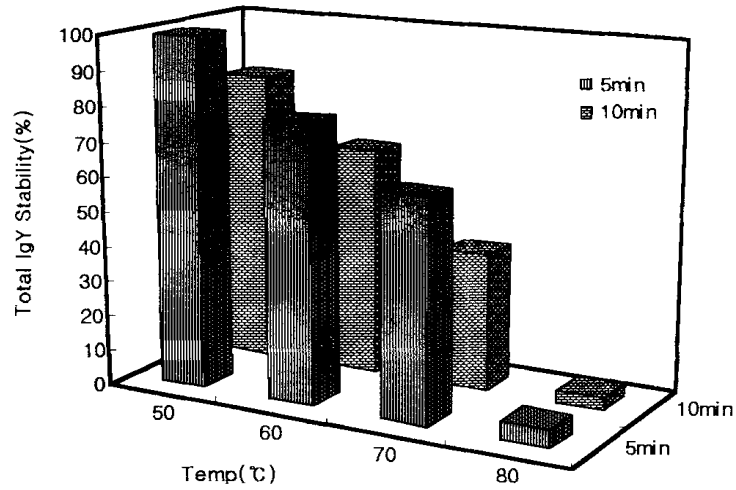


Figure 44. Total IgY stability of 2% IgY solution by various temperature.

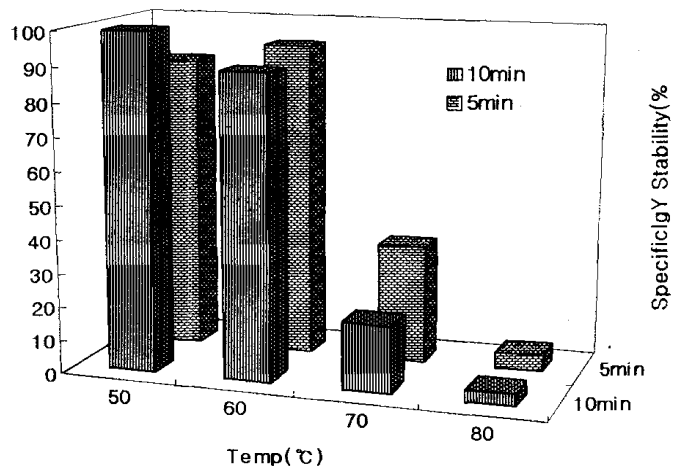


Figure 45. Specific IgY stability of water soluble fraction by various temperature.

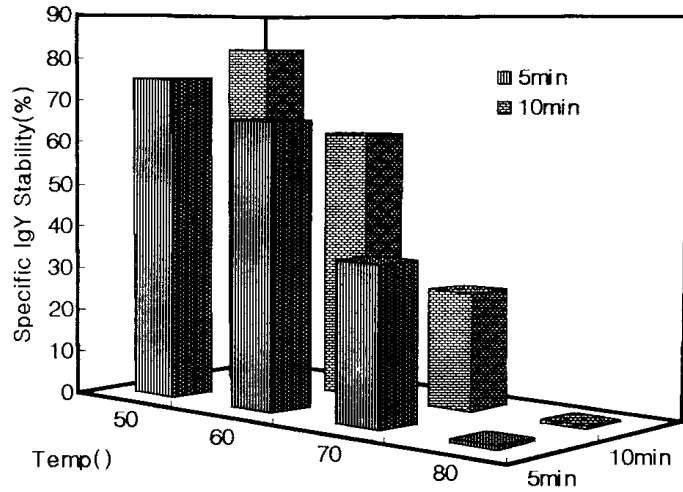


Figure 46. Specific IgY stability of 1% IgY solution by various temperature.

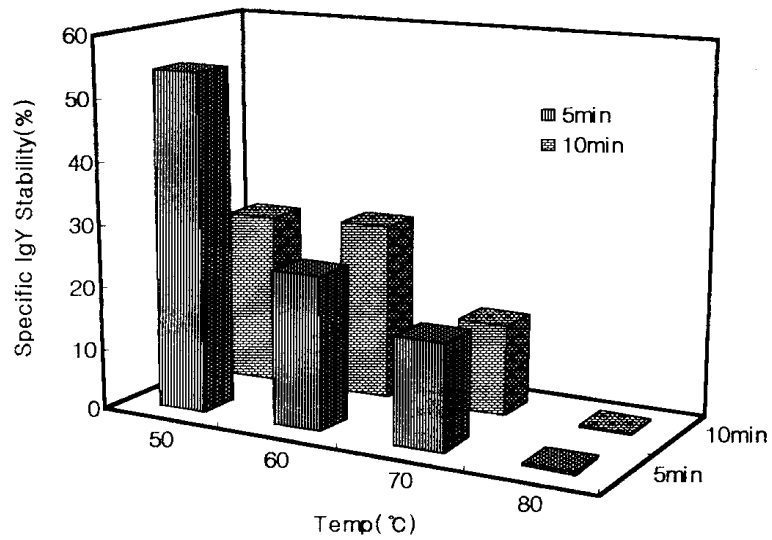


Figure 47. Specific IgY stability of 2% IgY solution by various temperature.

5. IgY의 항체 항원 결합

가. ELISA법에 의한 균체 binding 조사

난황항체의 *Salmonella gallinarum* 균주에 대한 유효성을 검증하기 위하여 난황항체와 *Salmonella gallinarum* 균주에 대한 결합능력을 조사하였다. 이를 위하여 *Salmonella gallinarum* cell과 난황항체를 *in vitro* 상에서 반응시킨 후 항체의 항원결합 정도를 ELISA 법으로 측정하였다. *Salmonella gallinarum* cell을 PBS-tween으로 농도별로 희석하여(10^9 , 3.3×10^8 , 10^8 , 3.3×10^7 , 3.3×10^6 , 10^6 CFU/ml) ELISA test를 한 후 cell의 농도에 따른 450nm에서의 standard curve의 결과는 Figure 48과 같다.

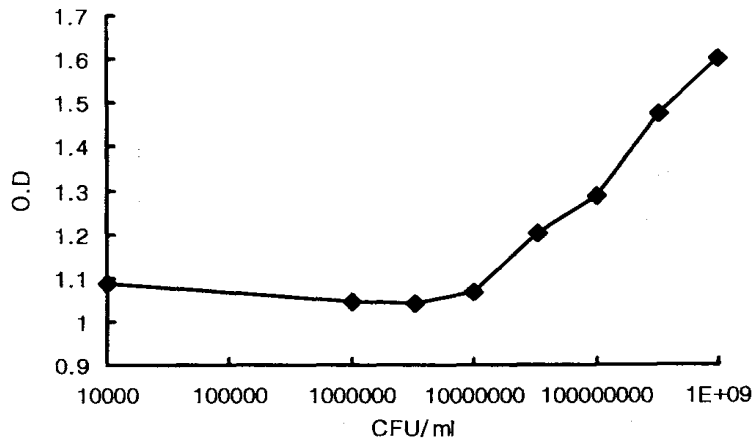


Figure 48. Standard curve of ELISA absorbance by *Salmonella gallinarum* cell count

한편, *Salmonella* 균 10^9 CFU/ml에 냉동건조된 분말 IgY를 각 농도별로 첨가하여(1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100mg/ml) *Salmonella* 균과 IgY의 결합정도를 ELISA로 조사한 결과는 Figure 49에서와 같다. *Salmonella* 균을 10^9 CFU/ml로 loading 할 때 난황 항체분말 5mg/ml를 첨가한 경우 *Salmonella* 균의 농도가 10^9 CFU/ml에서 10^8 CFU/ml로 10배 감소하였고, 20mg/ml의 IgY를 첨가한 경우 *Salmonella* 균의 농도가 10^9 CFU/ml에서 10^7 CFU/ml로 100배 정도 감소하였다. 난황의 수용성 분획을 0.75ml/ml 사용할 때 난황 분말 50mg/ml 첨가의 효과와 동일하였다. 0.75ml의 난황 수용성 분획은 약 4.12mg의 단백질을 함유하고 있으므로 동결건조를 통하여 *Salmonella gallinarum*균과의 binding capacity가 약 10배정도 감소되는 것으로 나타났다.

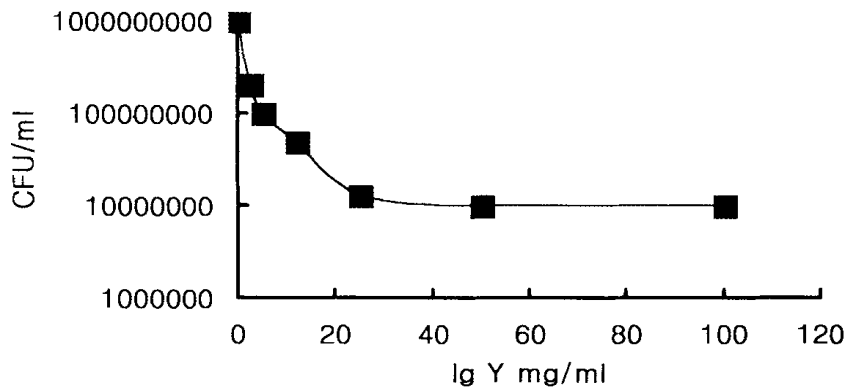


Figure 49. Effect of IgY addition on *Salmonella gallinarum* cell count

나. *Salmonella gallinarum* 항원에 대한 IgY의 선택성

*Salmonella gallinarum*를 항원으로 접종하여 발생된 IgY가 유사한 다른 균과 *Salmonella gallinarum*를 구분할 수 있는가에 대해 알아보았다. 세 종류의 *Salmonella* 균주 (*gallinarum*, *typhimurium*, *enteritidis*)에 대한 특이항체의 균주 특이성을 비경합 간접 ELISA로 조사하였다. *Salmonella gallinarum*을 660nm에서 0.07이 되는 지점까지 희석하여 coating하였고 1차 항체, IgY는 100배에서 100,000배까지 희석하여 사용하였다. 또한, anti-chicken IgG-HRP는 30,000배 희석하여 사용하였다. Figure 50에서 각 균주별 Abs₄₅₀ 값이 1.0을 나타낼 때의 상대적인 항체희석배율을 비교하고 균주 *S. gallinarum*에 대한 특이항체의 반응율을 100%로 하여, 특이항체의 각 균주에 대한 반응성을 수치화 하였다(Table 13).

ELISA 결과에서와 같이 특이항체와 반응성이 가장 뛰어난 균주는 *Salmonella gallinarum*이었으며 다음으로 *Salmonella enteritidis*였고 *Salmonella typhimurium*은 시험한 균주 중 가장 낮은 반응성을 나타내었다.

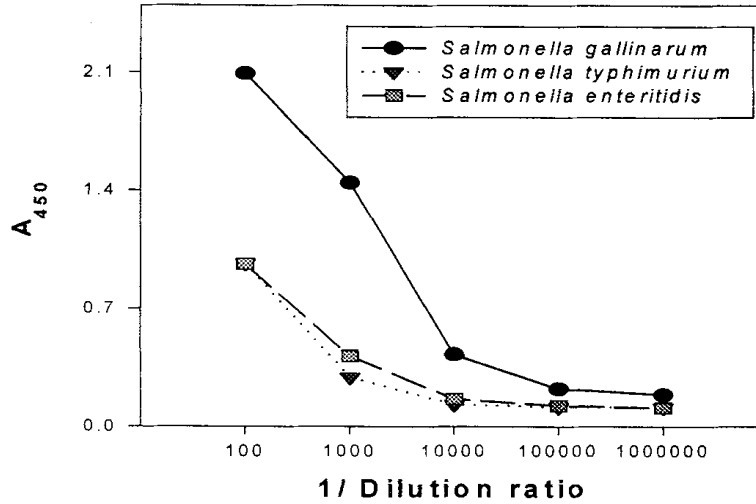


Figure 50. Reactivities of specific IgY at various dilution rate to the strains of *Salmonella*.

Table 13. Cross-reactivity of specific IgY to the strains of *Salmonella*

Strain	EC ₅₀ (relative dil. rate)	Reactivity (%)
<i>gallinarum</i>	1/3273 ¹⁾	100.0
<i>typhimurium</i>	1/100	3.1
<i>enteritidis</i>	less than 1/100	less than 3.1

¹⁾
$$\frac{\text{EC}_{50} \text{ of } \textit{gallinarum}}{\text{EC}_{50} \text{ of strain}} \times 100$$

제 4 장 항-살모넬라 갈리나룸 IgY의 유효성

제1절 서 론

가금 티프스의 발병 빈도는 증가되고 있으나 현재까지 완벽한 가금 티프스 예방약이 개발되어 있지 않다. 가금 티프스를 예방접종을 실시한 경우에도 가금 티프스가 유행되면 산란 중인 닭에 항생제나 항균제를 과용으로 사용하여 계란에 잔류약제 성분이 일부 이행되어 계란을 식용으로 이용할 수가 없다. 따라서 잔류약제 성분이 전혀 없는 계란을 생산하기 위한 기술 개발이 시급하다.

계란은 그 난황에서 대량으로 특이적 항체가 얻어질 수 있으므로 계란 항체의 이용 분야는 시약 또는 의약으로서만 아니라 기능성 식품 또는 사료 소재로서, 이것을 단용 혹은 병용해 이용하는 경구 수동 면역의 개발이 주목되고 있다. 경구 수동 면역은 감염증 병원체에 대한 특이적 항체를 경구 투여하여 구강 내 또는 소화관내 병원체가 부착, 감염을 예방하는 방법이다. 현재까지는 IgY을 이용한 경구 수동 면역은 Rotavirus성 하리증 예방, 충치의 예방, 가축 대장균성 하리증의 예방 및 양식어 감염증의 예방 등이 보고되어 있다.

계란으로부터 가금 티프스의 원인균에 관한 항체, 즉 항-살모넬라

갈리나룸 IgY를 생산하고 이 항체의 가금 티프스에 관한 유효성을 조사하고자 한다. 중규모 시험 농장에서 산란계를 사용하여 특수항체를 생산한다. 대량생산된 계란으로부터 조항체를 대량 분리하고 조항체의 냉동 건조와 잔존 역가를 실시한다. 가금 티프스 예방을 위하여 개발된 IgY의 *Salmonella gallinarum*에 대한 효능성을 시험하여 *Salmonella gallinarum* 성장에 따른 IgY 첨가효과를 조사한다. 생산된 specific IgY를 활용하기 위한 시험으로 조항체 분말의 일반 산란계 사료 내의 안정성을 평가한다. 산란계용 IgY의 가금 티프스에 대한 예방 및 치료 효과를 시험한다. IgY의 산란계 사료에의 활용 시험을 위하여 산란계 시험을 통한 기호성 및 용법용량 시험을 실시한다. 위의 시험 등을 통한 IgY 생산비를 분석하고 경제성 분석과 종합적 평가를 실시한다.

제2절 재료 및 방법

1. 산란계 사육시험을 통한 IgY 대량생산 시험

대량 생산 체제 구축을 위하여 제3차 IgY 생산시험에서는 19주령 된 IsaBrown종을 200수 구입하여 참숫 0.5 %가 첨가된 일반사료를 이용하였다. 접종 처리군의 경우는 Table 14에서와 같이 *Salmonella* : Freund's adjuvant를 1:1의 비율로 emulsion을 제조한 후 1 ml씩 2주 간격으로 총 3회 접종(1차-Adjuvant complete, Freund, 2·3차-Adjuvant incomplete, Freund)하였으며 산란율은 2차 접종일부터 측정하였다.

실제로 농장 체제의 구축을 위하여 경기도 안성의 양계농장에서 제4차 사양시험을 실시하였다. 사료는 참숫 0.5%를 첨가하여 공급하였고 접종은 2주 간격으로 총3회 접종하였다.

Table 14. Treatment

항원	vaccination	vaccination schedule	vaccination 회수
No	No	-	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	Freund's adjuvnant	2주 간격으로 접종	3

2. 수용성 단백질 및 항체 대량생산 분리

분리된 난황을 증류수와 섞은 후 0.1 % gum solution을 첨가하여 상온에서 30분간 방치하고 10,000 × g에서 15 min. 간 원심분리 후 lipoprotein fraction을 제거하여 water soluble protein fraction을 분리하였다. 분리된 수용액을 냉동건조용 tray에 옮겨 -70℃에서 급냉한 후 (주)제일동건에 의뢰하여 냉동건조를 실시하였다. 건조분말은 냉동실에 보관하면서 사용하였다.

수용성 단백질 분획과 건조분말의 total IgY와 specific IgY 역가를 측정하였다. 전체 IgY 함량 측정을 위하여 우선 microplate에 rabbit anti-chick IgG Antibody의 단백질 농도가 2μg/well이 되도록 조정하여 coating하고 wash 한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit

anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N H₂SO₄를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Specific IgY의 함량도 ELISA 방법에 의해 수행하였다. 원심분리된 살모넬라 갈리나룸 균체를 적당히 희석하여 O.D 값이 660nm에서 0.05가 되도록 완충액으로 희석하였다. 희석된 살모넬라 갈리나룸 균체를 microplate에 coating하고 wash 한다. 희석된 난황의 water soluble protein을 넣고 반응시킨 후 wash하여 적당히 희석된 rabbit anti-chick IgG Ab-HRP를 넣는다. 여기에 HRP의 기질로는 TMB를 사용하였고 반응정지액으로 2N 황산을 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. IgY의 효능의 평가

전체 IgY 중에서 특이항체의 함량을 조사하여 IgY 항체의 항원에 대한 결합능력을 조사하였다. Carrageenan으로 인지질을 제거한 anti-*Salmonella gallinarum* IgG 용액 원액 0.5 ml과 *S. gallinarum* 균체분산액 ($A_{660nm} = 2.3$ 으로 조절한 것)을 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml을 혼합하고 여기에 Phosphate Buffered Saline(PBS)을 첨가하여 최종 부피 1.5 ml로 조절 한 다음, 37°C에서 3시간 처리하고, 이어서 4°C에서 하루밤 방치하여 면역복합체 (Ag~Ab complex)를 형성시킨다. 이때 균체분산액에서 유래하는 가용성 물질의 영향을 배제하기 위하여 IgY 용액 대신 PBS를 사용하여 위와 같이 마찬가지로 처리한 것도 함께 준비한다.

10,000 rpm에서 원심 분리 하여 면역복합체를 제거하고 상징액을

회수한다. 각 균체밀도 (항원농도)별 상장액의 A_{280nm} 을 측정하고 그 값에 항원무첨가 처리의 값을 뺀 수치의 값을 구한다. (이때 IgY 용액의 농도는 A_{280nm} 에 비례하므로 [$A_{280nm} < 0.8$ 범위에서, 흡광도를 농도로 보아도 무관함) 결과를 '균체밀도:흡광도'로 plot하여 최저 흡광도를 구한 후, 다음의 식으로 전체 용액 중 특이항체의 비율을 구한다.

$$\text{Specific IgY} = \frac{\text{Abs. of blank} - \text{minimum Abs.}}{\text{Abs. of blank}} \times 100 (\%)$$

4. 특이항체의 항균성 검사

가. 페이퍼 디스크법을 이용한 IgY의 유효성 시험

Salmonella gallinarum 균주에 대한 IgY의 항균성 검사 하고자 실시하였다. 멸균된 TSA 한천평판배지 20 ml를 멸균된 petridish에 분주하여 편평한 기층 배지를 만들고 그 위에 전 배양된 균액과 55~60℃로 보존된 배지를 0.5~2.0 %의 한천농도가 되도록 섞어, 기층 배지 위에 7 ml 첨가하여 균일한 층이 형성 되도록 굳혔다. 원형여지에 (0%, 5%, 10%, 15%, WSF)의 IgY 용액을 흡수시켜, 한천평판배지 위에 놓아 37℃ 배양기에서 24시간 배양 후 clean zone 출현여부로 IgY의 항균성을 paper disc method로 실험하였다.

나. 탁도(turbidity method)에 의한 IgY의 유효성 실험

액체배지에 IgY의 농도를 다르게 하여 첨가하고 검정균을 접종한 후, 배양한 다음 각 시험관의 탁도를 spectrophotometer로 측정하였

다. 사전 알고 있는 IgY의 농도별 액의 탁도와 농도를 표준 곡선을 작성하고 피검균의 탁도를 측정하여 이 표준곡선으로부터 균수를 환산하였다.

1) 균 배양시간에 따른 탁도와 균수의 변화

균 배양시간에 따른 탁도와 균수의 변화를 살펴보기 위하여 *Salmonella gallinarum* 균주를 Tryptic Soy Broth에 10^3 cfu/ml로 희석하여 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 시험에 이용하였다. 직경 10mm 시험관에 희석된 균액 0.1 ml와 TSB 4.9 ml을 넣고 37°C 배양기에서 0, 6, 12, 16, 20, 24, 36, 48 그리고 72시간 배양 후 배양 시간에 따른 탁도(turbidity), pH와 균수를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

시험에 사용된 Specific IgY는 동결건조를 이용하여 생산하였고 냉동보관 중인 IgY 분말을 사용하여 항균력 시험을 실시하였다.

2) Specific IgY 농도별 항균력 실험

IgY의 농도별 시험을 위해 specific가 함유된 수용성 단백질 분말을 0%, 5%, 10%, 15%가 되게 멸균 증류수에 녹인 후 membrane filter를 사용하여 여과 제균하여 시험에 이용하였다. 제균된 IgY 용액 0.1ml를 배지 4.9ml에 혼합하여 IgY의 최종농도가 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%가 되었다. 이때 사용한 균주와 균수는 *Salmonella gallinarum* 10^3 cfu/ml이다.

측정 항목은 균배양액의 pH, 탁도, 균수이며, 균배양액의 수소이온농도는 portable pH meter(corning, pH meter 430, USA)를 이용하여 시험관에서 직접 측정하였다. 탁도는 Kawahaki(1996)의 방법을

이용하여 시험관 내의 상등액을 일정하게 취하여 spectrophotometer (Aqua Quest, SRIS4000, England)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 균수는 평판배지법으로 시행하였으며, 배지는 Tryptic Soy Agar를 사용하여 37℃ 배양기에서 48시간 배양 후 집락(colony) 수를 세어 계산하였다.

3) 균수별 항균력 시험

균수별 항균력 효과를 검토하기 위하여 *Salmonella gallinarum* 균주를 0, 10^3 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^7 cfu/ml으로 희석하여 접종하였으며 이때 IgY 처리구의 IgY 첨가 농도는 0.3%였다. 측정 항목은 pH, 탁도, 균수를 조사하였다.

다. 현미경 관찰에 의한 유효성 시험

현미경 관찰에 의한 유효성 시험은 상기의 specific IgY 농도별 항균력 시험, 균수별 항균력 시험에서 균 형태 변화를 현미경 (Olympus BH-2, Japan)를 이용하여 100배의 배율로 검경하고 사진을 찍었다. 검경액은 튜브에 들어 있는 상등액과 침전물로 구분하여 실시하였으며 이 때 검경 방법은 그림 순서에 따라 행하였다

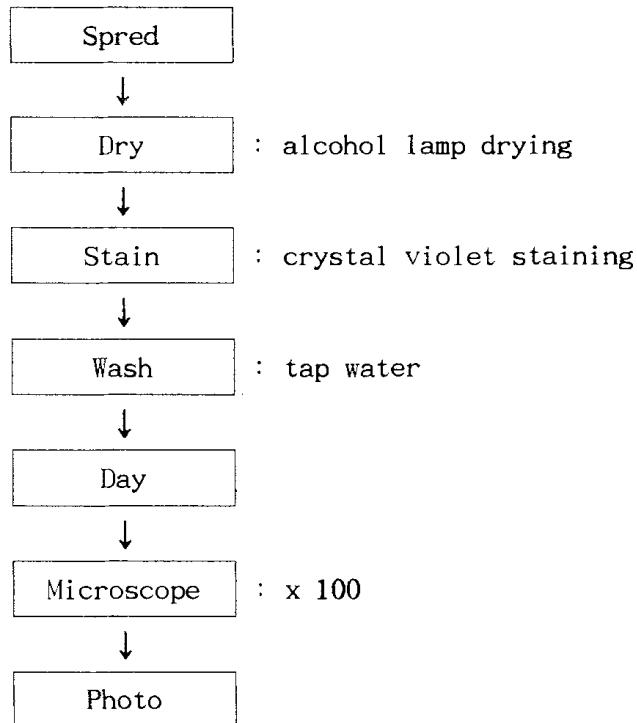


Figure 51. Microscopic examination of *Salmonella gallinarum*

5. 산란계 사료에의 활용시험

산란계에서 IgY 활용시험을 하기 위해 일반 산란계 농장을 선정하여 IgY를 투여하였다. 이때 IgY는 다양한 희석배수로 사료, 음수 등의 방법을 사용하여 투여하였고 투여 후 생산성에 대한 영향 평가를 실시하였다. 산란계는 SPF를 사용하였고 IgY 투여군과 비투여군을 선정하였다.

가. 음수 중의 안정성

IgY를 음수에 섞어서 공급할 때 항-*Salmonella gallinarum* IgY의

음수 중 역가 변화를 알아보기 위해 specific가 함유된 수용성 단백질 분말을 1%, 2% 되게 증류수에 녹인 후 시간별로 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 시간마다 채취하여 음수 용액 2 ml를 filter paper 2번으로 filter한 후 PBS buffer를 이용하여 1/10으로 희석하여 total IgY, specific IgY를 측정하였다.

나. 닭 사료 중의 안정성

닭 산란후기 사료에 항-*Salmonella gallinarum* IgY 분말을 1%, 2%를 첨가하여 잘 섞은 후 상온에 방치하였다. 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24시간마다 시료를 채취하여 막자사발로 균질화한 sample Ig를 PBS buffer 10ml에 넣어 녹이고 filter paper 2번으로 filter한 후 total IgY, specific IgY를 측정하였다.

6. 산란계 시험을 통한 IgY 효능성 시험

가. 동물

살모넬라 감염이 없었으며 살모넬라 진단액을 이용하여 검사하였을 때 항체음성인 9주령의 산란계를 사용하였다.

나. 공격접종균

S. gallinarum 공격접종균은 국립수의과학검역원에 등록된 표준균주를 사용하였으며 수당 1×10^7 cfu가 접종될 수 있도록 균량을 조절한 다음 개체별로 경구접종을 하였다.

다. IgY 투여

IgY는 아래의 Table 15에 표시된 농도대로 동결건조액을 수당 0.2g이 투여될 수 있도록 조절한 다음 각 처리구의 개체별로 경구투여하였다. 투여는 공격접종일로부터 6일간 일정한 시간에 실시하였다.

Table 15. IgY 접종량에 따른 시험구의 배치 및 검사항목

구분	IgY 접종	시험수수	검사항목
I	동결건조액 0.2g/수		
II	동결건조액 0.1g/수		· 폐사율 비교조사
III	동결건조액 0.05g/수	20수	· 실질장기 내 균 분리율
IV	비투여 공격구		비교 조사
V	비투여 비공격구		

라. 임상관찰

투여군과 비투여군에 대한 임상관찰은 항상 비투여군에 대하여 먼저 실시하였으며 폐사나 특이 증상이 있을 경우에는 개체별로 기록 보관하였다. 임상관찰은 총 2주간에 걸쳐 실시하였다.

마. 균분리 및 확인

균의 검사는 우선 10g의 간, 비장을 개체별로 pooling 하였다. 적출된 시료 각각을 Whirlpak bag에 넣고 25 ml의 tetrathionate-brilliant green-Hajna (TBGH) broth를 bag에 넣은 후 stomacher로 분쇄를 한 후 bag을 42℃에서 40시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 배양재료를 MacConkey agar(MA) 또는 Brilliant green agar

(BGA)에 접종 배양하였다. 42℃에서 24시간 배양한 후 MA 또는 BGA 배지에서 *Salmonella* 유사집락유무(lactose nonfermenter)를 식별하고 생화학적 방법과 혈청학적 방법으로 균을 동정하였다.

바. 시험방법

IgY의 투여량은 0.05g, 0.1g, 0.2g으로 실시하였고, 이들의 폐사율과 실질장기 내의 균 분리율을 조사하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 산란계 사육시험을 통한 IgY 대량생산 시험

가. 산란율

산란율을 보면 3차 시험의 경우 *Salmonella gallinarum* 투여된 산란계에서 6주째부터 산란율은 점차 증가하였으며 대조구의 산란율은 몹시 저조함을 보여 주고 있다. 농장에서 실시한 4차 시험에서는 *Salmonella gallinarum* 접종 후 산란율이 7주째부터 증가하였다.

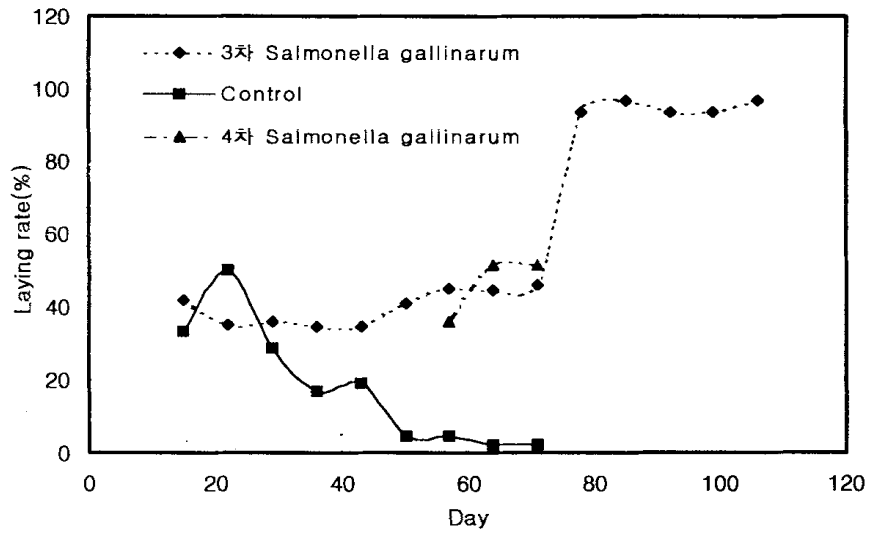


Figure 52. Trends of laying rates of hens with vaccination of *Salmonella gallinarum*

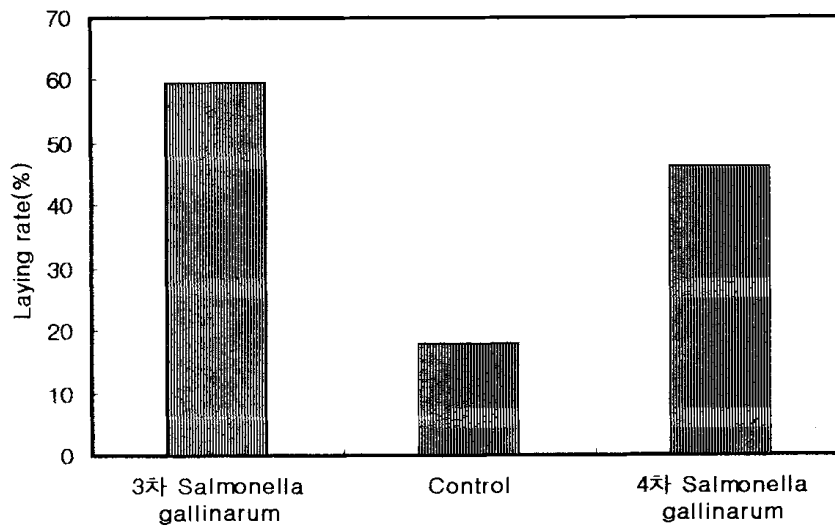


Figure 53. Average of laying rates of hens with vaccination of *Salmonella gallinarum*

나. Total IgY

*Salmonella gallinarum*를 항원으로 하여 산란계에 Freund's adjuvant로 면역시킨 후 생산된 계란에서 IgY 함량을 분석한 결과는 Figure 54에서 보여주듯 total IgY는 83.21 mg/ml wsf로 80.84 mg/ml wsf의 대조구보다 약간 높은 경향을 나타내었다. 또 4차 시험에서는 114.1mg/ml wsf의 값으로 3차 시험과 대조구 보다 높은 경향을 보여 주었다.

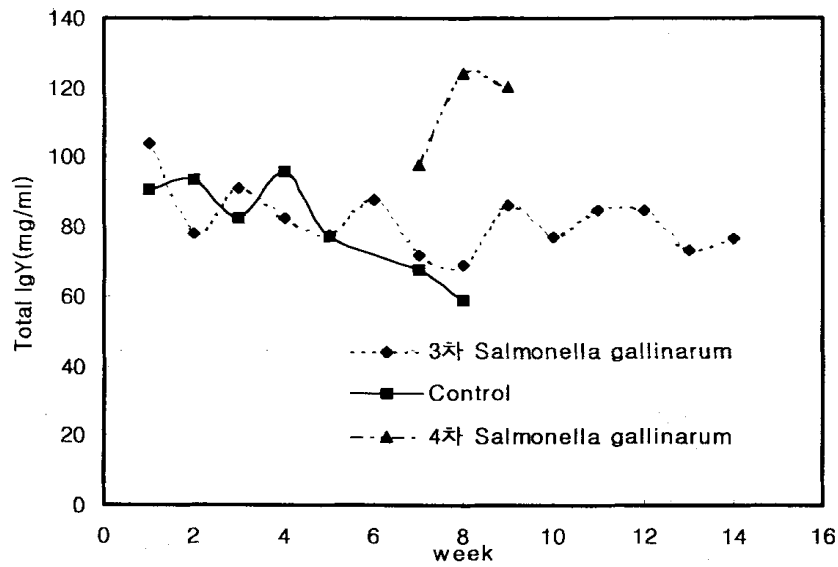


Figure 54. Changes of total IgY content.

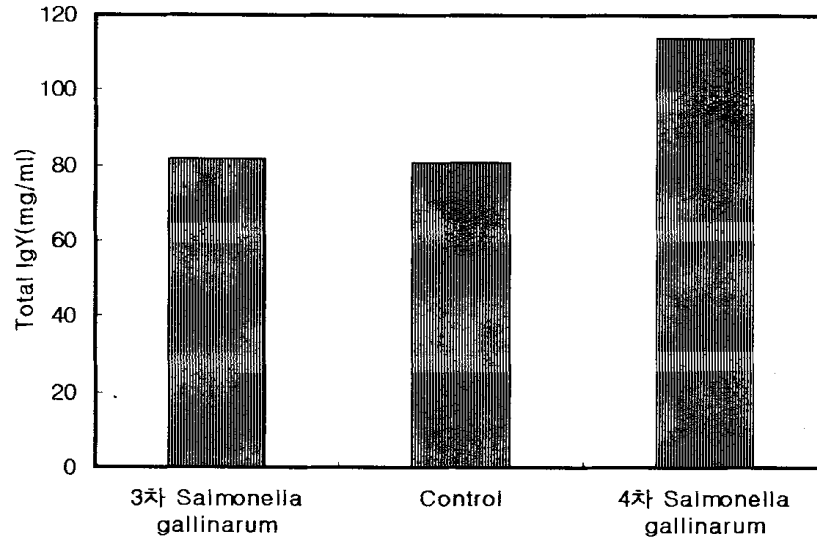


Figure 55. Average of total IgY content.

다. Specific IgY

Specific IgY는 *Salmonella gallinarum* 처리구의 경우 2차 접종 후 Specific IgY의 함량이 높아지는 것을 볼 수 있고 3차 백신 후 함량이 다시 한번 높아지는 것을 볼 수 있다. Specific IgY의 함량은 2차 접종 후 6주째 가장 높은 함량을 보여주었다. 이 때 대조구에 비해 약 160배의 높은 함량을 나타내었다.

4차 농장 시험에서는 3차 사양시험에 비해 함량이 적지만 대조구에 비해 약 15배 이상 잔존하는 것으로 나타났다.

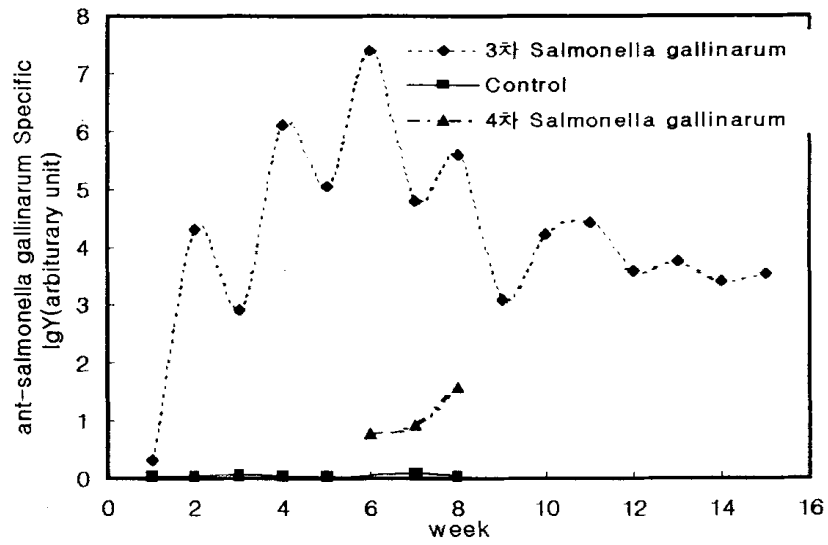


Figure 56. Changes anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY content.

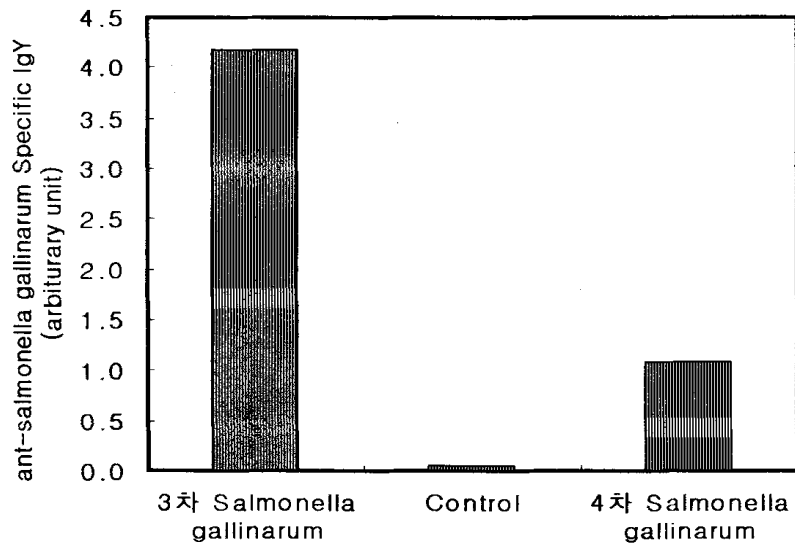


Figure 57. Changes and average of anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY content.

2. 수용성 단백질 및 항체 대량생산 분리

난황으로부터 IgY를 대량으로 분리하였다. 분리된 조난황에서 냉수가용성 carrageenan 0.1%를 사용하여 water soluble protein fraction만을 얻었고 동결건조를 통해 분말화하였다. 이때 3차 시험에서는 약 1400 여개의 계란 중으로부터 water soluble protein fraction 42 kg을 얻었고 냉동된 wspf로부터 538.18 g의 건조분말을 회수하였다. 한편 4차 시험에서는 약 2500 여개의 계란으로부터 wspf 138kg을 얻었고 냉동된 wspf로부터 1,800g의 건조분말을 회수하였다.

3. IgY의 효능의 평가

항체의 항원에 대한 결합 능력 조사하기 위하여 전체 IgY 중에서 특이항체의 함량을 분석하였다. Anti-*Salmonella gallinarum* IgY를 여러 가지 농도의 *Salmonella gallinarum*과 반응시키고 원심분리를 통하여 복합체를 이룬 IgY를 제거한 후 나머지 IgY의 농도를 재어 Figure 58과 같은 결과를 얻었다. 그래프에서 상대적인 항원의 농도가 0.6일 때 가장 낮은 흡광도를 나타 내므로 이때의 흡광도를 최저 흡광도로 간주하고 전체 수용성획분 중 특이항체의 비율을 구하면 23%가 되었다.

$$\frac{(0.78-0.6)}{0.78} \times 100 = 23\%$$

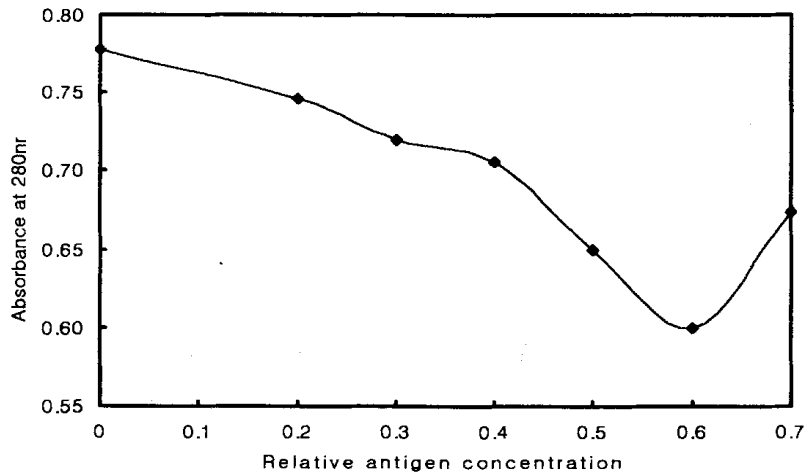


Figure 58. Quantitative immunoprecipitation of specific IgY and *Salmonella gallinarum*. The results were shown as the absorbance of the supernatants after removal of the immune complexes

4. 특이항체의 항균성 검사

가. 페이퍼 디스크법을 이용한 IgY의 유효성 시험

멸균된 TSA 한천평판배지 20 ml를 멸균된 petridish에 분주하여 기층배지를 만들고 그 위에 7 ml 첨가하여 균일한 층이 형성 되도록 굳혔다. 원형여지에 (0%, 5%, 10%, 15%, WSF)의 IgY 용액을 흡수시켜 배양하면서 찍은 사진은 결과로서 보는바와 같이 농도에 관계없이 미생물 억제 효과가 나타나지 않았다. 즉, IgY가 함유된 물질의 항균 시험에 있어서는 IgY가 함유된 물질이 *Salmonella gallinarum* 을 사멸시키는 것이 아니라 그 성장만을 억제하는 것으로 사료되어 paper disc방법은 계란 항체의 유효성 검사에 적절하지 않은 것으로

판단되었으며. 이는 계란 항체를 이용한 항충치 기능성 소재의 개발에 대한 연구결과와 유사하였다.

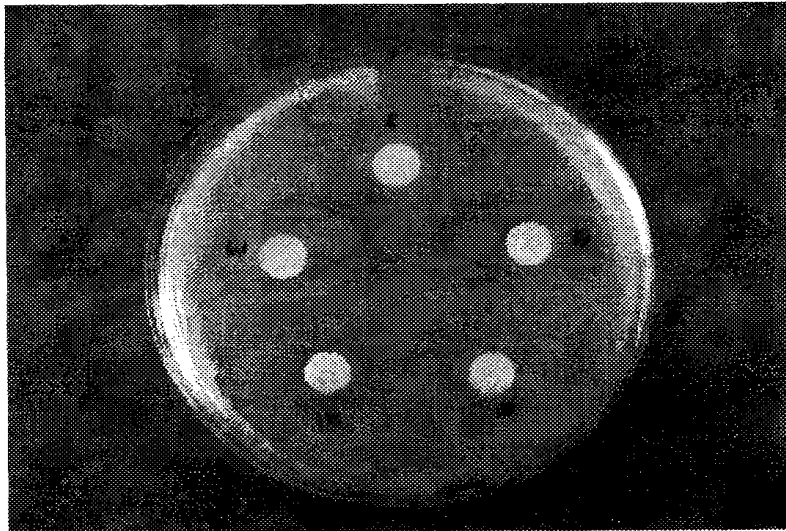


Figure 59. Effects of the IgY on the growth of *Salmonella gallinarum* by paper disc method

나. 탁도(turbidity method)에 의한 IgY의 유효성 실험

1) 균 배양시간에 따른 탁도와 균수의 변화

Salmonella gallinarum 균주를 TSB를 사용하여 시간별로 작성된 배양시간에 따른 탁도(turbidity), pH와 균수의 변화는 Table 16과 같다. 초기의 turbidity는 0.008였으나 배양시간이 증가함에 따라 turbidity도 증가하여 16시간 후에는 0.100, 24시간 후에는 0.862까지 증가하였다. 이 때 균수도 같은 양상의 증가를 보여 16시간 후

에는 1.82×10^7 cfu/ml, 24시간 후에는 1.75×10^9 cfu/ml까지 증가하였다. pH 역시 처음은 7.29였으나 16시간 후에는 7.17, 24시간 후에는 5.32로 저하 되었다. 이 때 *Salmonella gallinarum*의 성장에 따른 pH 변화곡선은 Figure 60에 나타내었으며 탁도의 변화는 Figure 61에 나타내었다. pH와 탁도는 전체적으로 상반된 곡선을 나타내었으며, 균수(Figure 62)는 탁도와 유사한 양상을 나타내었다.

Table 16. Changes on turbidity, colony count and pH of *S. gallinarum* by incubation time

Incubation time (hrs)	Items		
	pH	Turbidity	No. of colony
6	7.29	0.008	2.85×10^3
12	7.10	0.004	4.43×10^5
16	7.17	0.100	1.82×10^7
20	6.01	0.771	1.50×10^9
24	5.32	0.862	1.75×10^9
36	5.37	0.832	1.52×10^9
48	5.41	0.807	7.25×10^9
72	5.34	0.674	4.63×10^9

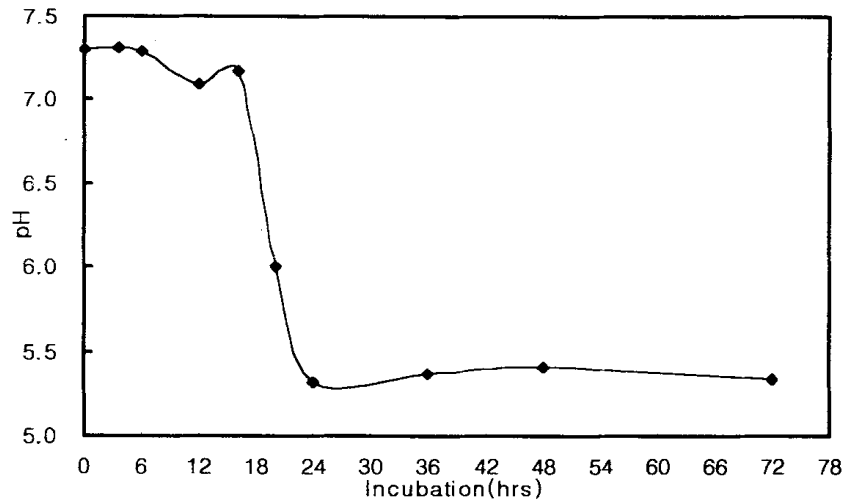


Figure 60. Changes on pH of *Salmonella gallinarum* by incubation time

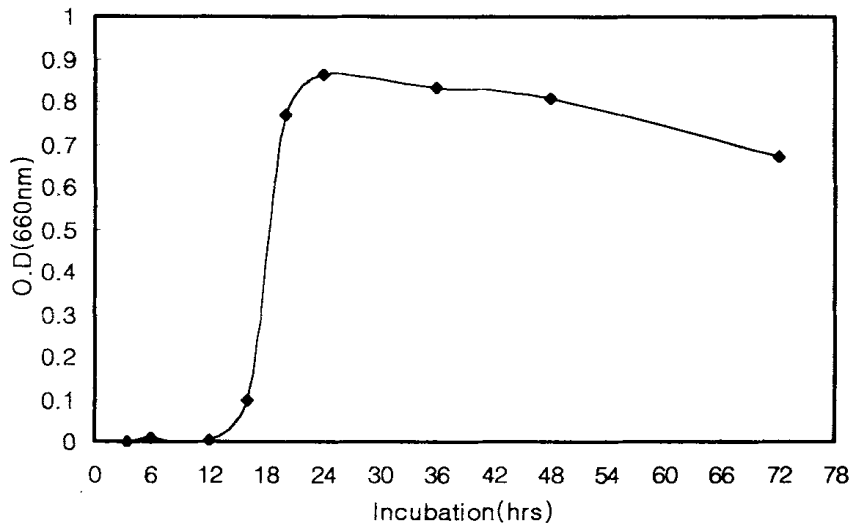


Figure 61. Changes on turbidity of *Salmonella gallinarum* by incubation time

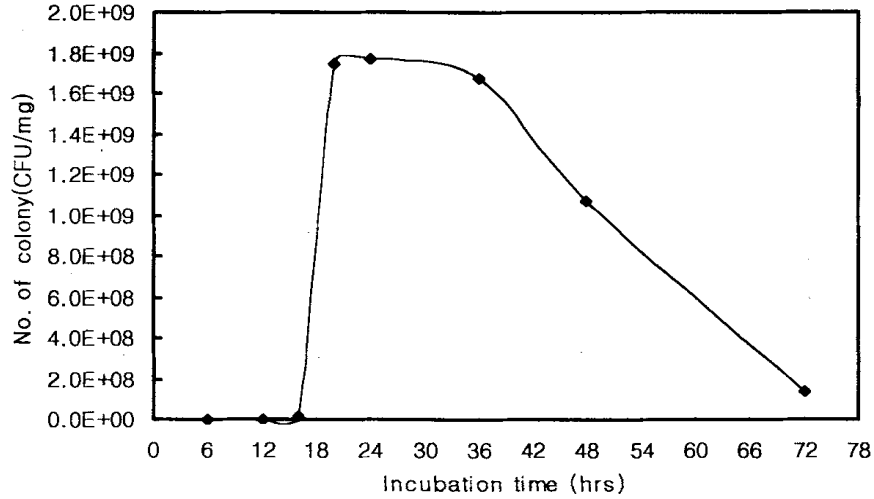


Figure 62. Changes on colony count of *Salmonella gallinarum* by incubation time

IgY의 첨가가 *Salmonella gallinarum* 배양에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 배지에 anti-*Salmonella gallinarum* IgY와 일반계란에서 나온 IgY를 첨가하고 균의 성장을 비교하였다. IgY의 첨가농도가 0.1%에 불과하여 anti-*Salmonella gallinarum* IgY의 효과가 극명하게 드러나지는 않았으나 Figure 63에서 보듯이 일반계란에서 나온 IgY는 *Salmonella gallinarum*의 성장에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 anti-*Salmonella gallinarum* IgY는 *Salmonella gallinarum*의 성장을 저해하는 것으로 나타났다.(Figure 64)

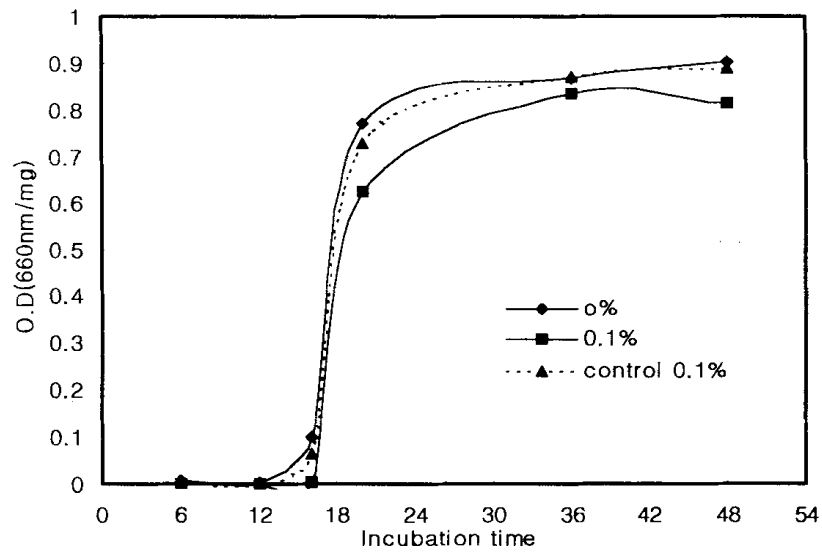


Figure 63. Turbidity of *Salmonella gallinarum* with anti-*Salmonella gallinarum* IgY and non-specific IgY addition

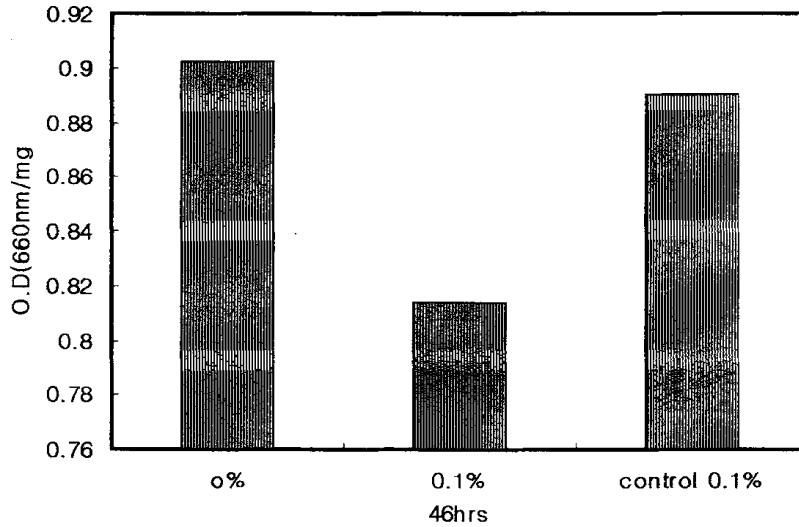


Figure 64. Turbidity of *Salmonella gallinarum* with anti-*Salmonella gallinarum* IgY and non-specific IgY addition at 48 hours

2) Specific IgY의 항균력 시험

항원화 여부에 따른 항균력 시험의 결과 항원화시킨 처리구에서 항균력이 있다는 것을 확인하였으므로 이때 항균력 시험의 최소농도 결과를 위하여 IgY의 농도를 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%로 구분하여 그 효과 시험을 수행하였다.

12시간 배양시간 후의 탁도에서 보면 IgY 0.1% 첨가구는 IgY 0% 첨가구와 같은 경향으로 증가하는 추세를 보이고 있으나 증가폭에 약간의 차이를 보이고 있다(Table 17). 반면 IgY 0.2% 첨가구는 18 시간 때 0.2이고 IgY 0% 첨가구는 0.8로 4배의 차이를 보이고 있다.

Table 17. Changes on turbidity of *Salmonella gallinarum* with various amount of IgY addition

Incubation time	Turbidity		
	IgY addition		
	0%	0.1%	0.2%
6	0.008	0	0
12	0.004	0	0.002
16	0.1	0.003	0.06
20	0.771	0.622	0.221
24	0.862	0.867	0.516
36	0.869	0.835	0.856
48	0.902	0.814	0.786
72	0.933	0.893	0.69

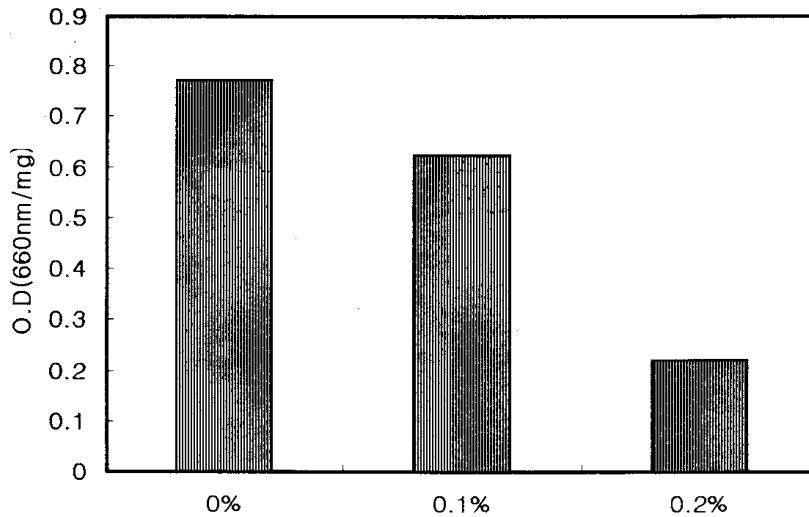


Figure 65. Turbidity of *Salmonella gallinarum* with IgY addition at 20 hours

2차 실험의 결과는 IgY 0.1% 첨가구는 IgY 0% 첨가구와 같은 경향으로 증가하는 추세를 보이고 IgY 0.2% 첨가구는 IgY 0.3% 첨가구와 같은 경향을 나타냈다. IgY 첨가에 의한 가장 차이가 큰 24시간 때에는 IgY 0.2% 이상에서는 IgY 0%보다 약 3배의 감소율을 보이고 있다.

이때 pH 변화는 배양 초기에는 7.1-7.3의 범위에 있었으나 미생물이 성장을 하면서 생긴 대사산물에 의해 배양시간이 경과함에 따라 pH가 하락하는 경향을 전 처리구에서 나타났지만 하락폭은 IgY첨가량이 많을 수록 둔하게 하락하는 경향을 나타내었다.

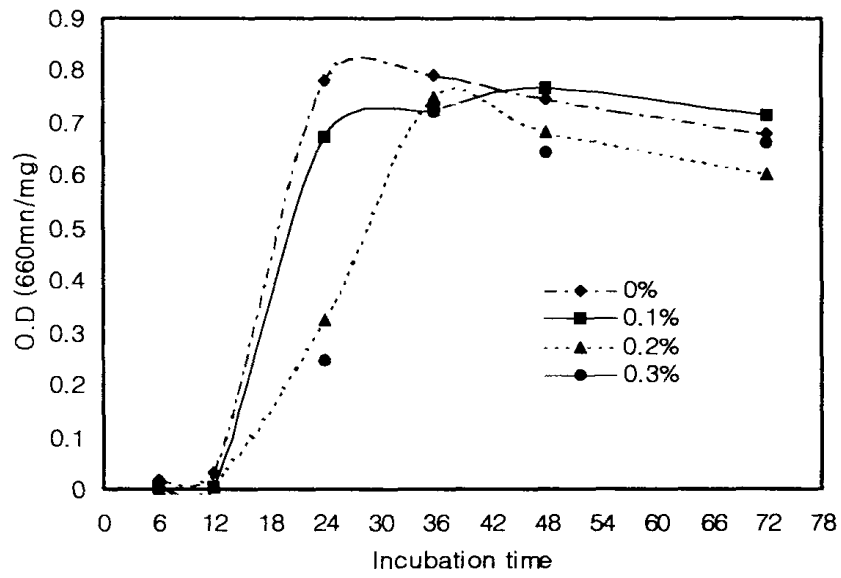


Figure 66. Turbidity of *Salmonella gallinarum* with IgY addition

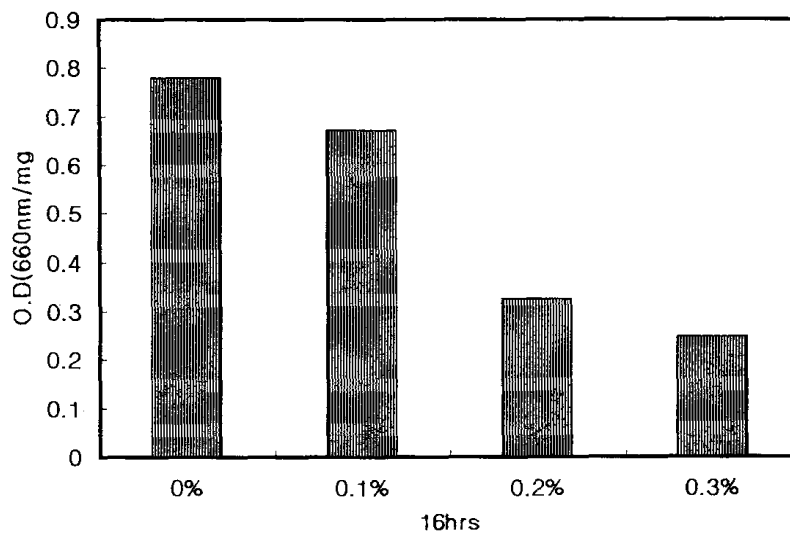


Figure 67. turbidity of *Salmonella gallinarum* with IgY addition at 16 hours



Figure 68. Effects of IgY addition on the growth of *Salmonella gallinarum* at 24 hour incubation

(no IgY addition, non-specific IgY 0.3% addition, wsf 2% addition, anti-*Salmonella gallinarum* IgY 0.1% addition, anti-*Salmonella gallinarum* IgY 0.2% addition, anti-*Salmonella gallinarum* IgY 0.3% addition),

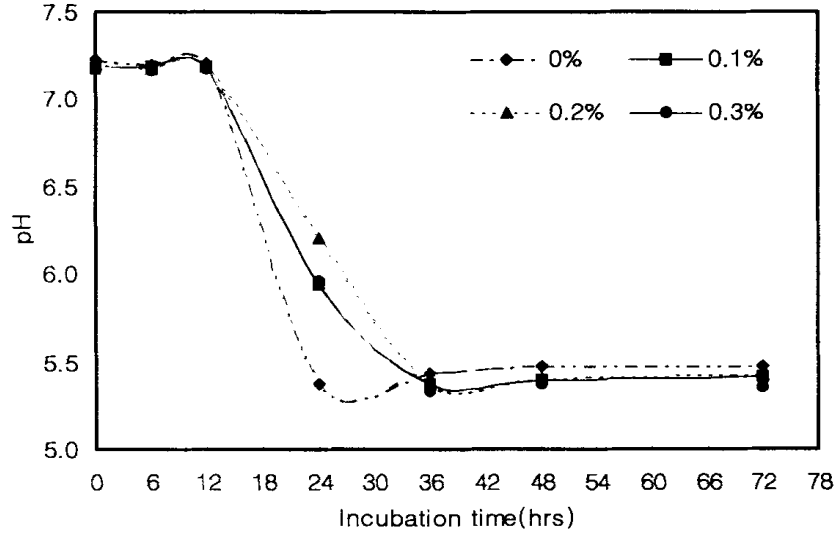


Figure 69. pH change of *Salmonella gallinarum* with IgY addition

3) 균수별 항균력 시험

균수별 항균력 효과를 검토하기 위하여 균수를 0, 10^3 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^7 cfu/ml으로 희석하여 접종하여 탁도를 Figure 70의 결과로 나타내었다. 6시간 이후로 대조구는 탁도가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었고 다른 처리구에서는 12시간 이후 탁도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 10^7 cfu/ml 처리구가 10^3 cfu/ml에 비해 현저하게 탁도는 높은 것으로 나타났다. 하지만 대조구의 경우 균수가 10^3 cfu/ml 인데 비해 0.3% 수용성 단백질을 넣은 10^5 cfu/ml 처리구와 거의 같은 양상을 탁도를 보이는 것으로 보아 이는 IgY의 첨가의 효과라고 할 수 있을 것이다. 24시간 이후에는 모든 처리구에서 탁도가 증가하지 않은 경향을 나타내었다.

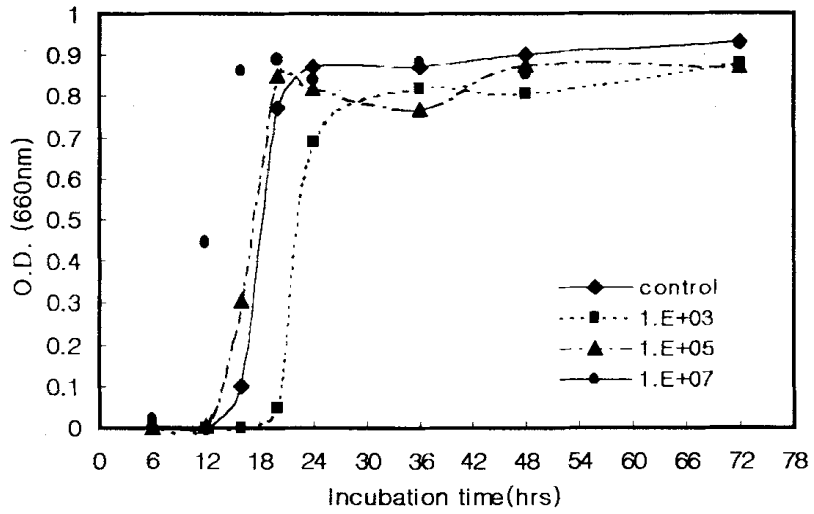


Figure 70. Changes on turbidity of *Salmonella gallinarum* with IgY addition.

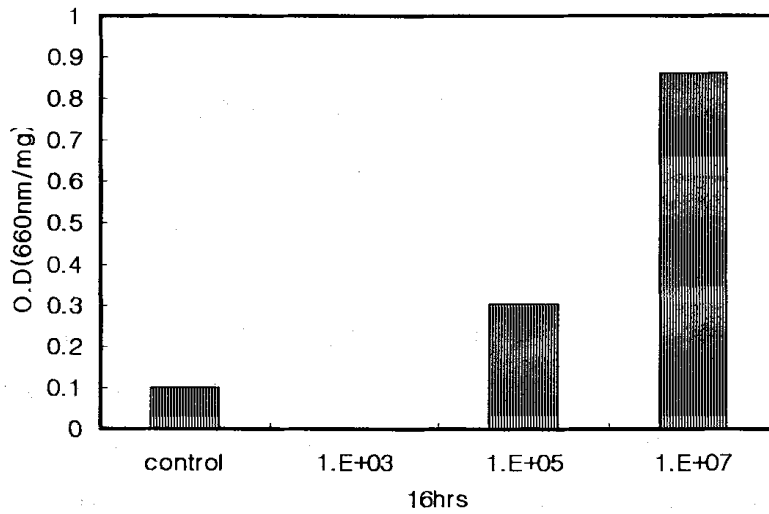


Figure 71. turbidity of *Salmonella gallinarum* with IgY addition at 16 hours

다. 현미경 관찰에 의한 유효성 시험

*Salmonella gallinarum*을 일반 배지에서 배양시킨 경우 Figure 72와 같은 모양을 관찰할 수 있다. Figure 73은 anti-*Salmonella gallinarum* IgY가 아닌 일반 IgY 추출물을 배지에 0.3% 첨가한 후 배양된 모습을 관찰한 것으로 일반 IgY 추출물은 *Salmonella gallinarum*의 성장에 별다른 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 anti-*Salmonella gallinarum* IgY를 첨가한 경우, 탁도의 영향과 마찬가지로 첨가농도가 0.1% 일 때는 커다란 변화가 없었으나 0.3%의 IgY를 첨가한 경우 침전물의 형태적 관찰에서 균이 응집되는 것을 살펴볼 수 있었다. 응집된 균괴의 크기는 IgY 첨가량이 증가할수록 점점 더 커져가는 현상을 나타내었다.



Figure 72. Photomicrograph of *S. gallinarum* in sediment of BHI broth without *S. gallinarum* specific IgY

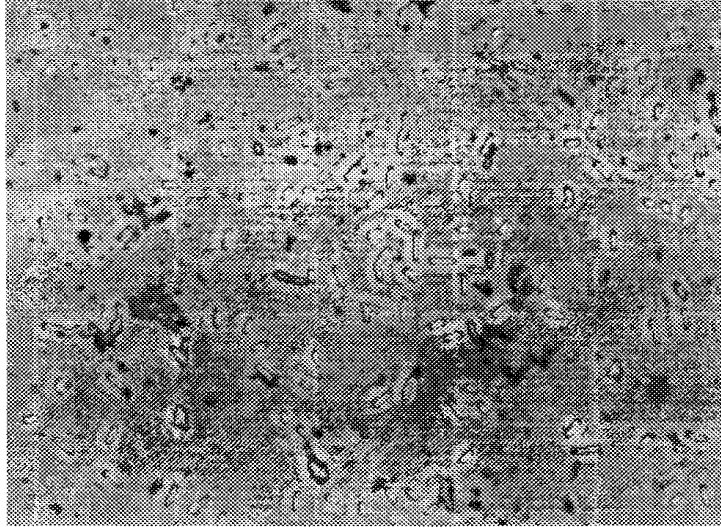


Figure 73. Photomicrograph of *Salmonella gallinarum* in sediment of BHI broth which included *Salmonella gallinarum* non-specific IgY

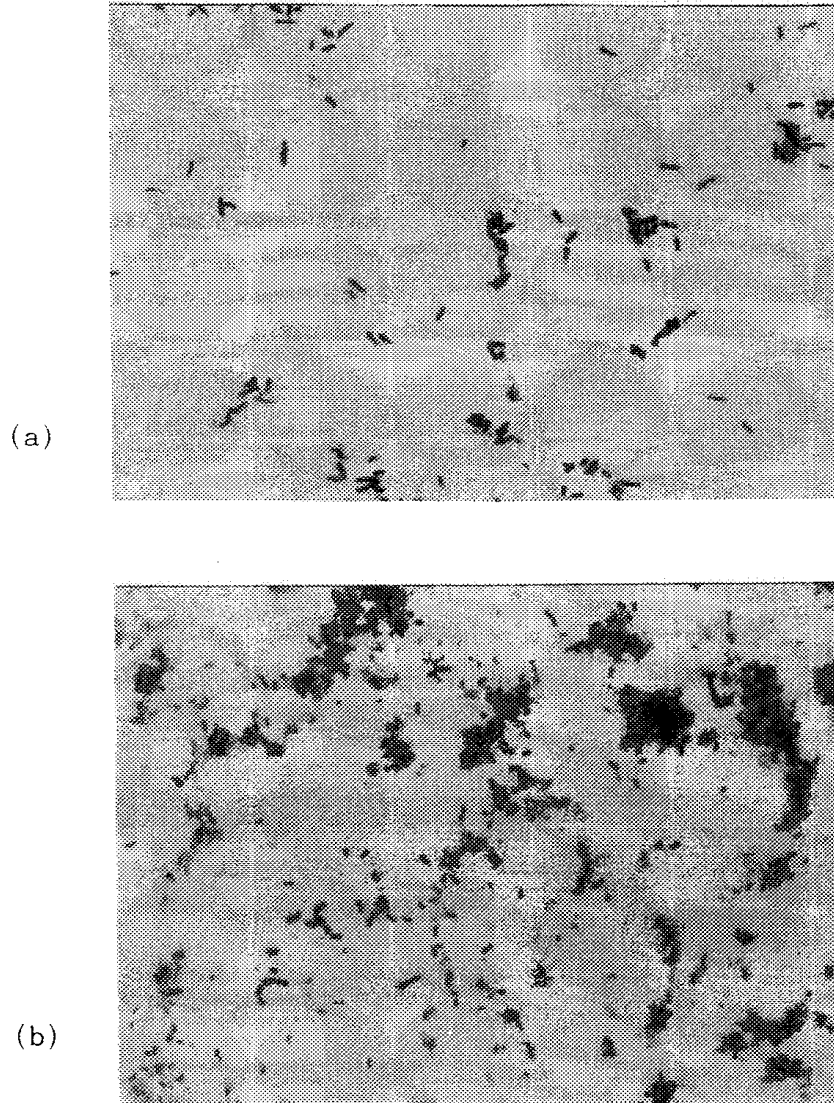


Figure 74. Photomicrograph of *S. gallinarum* in sediment of BHI broth which included anti-*S. gallinarum* specific IgY (a) IgY 0.1%, (b) IgY 0.2%

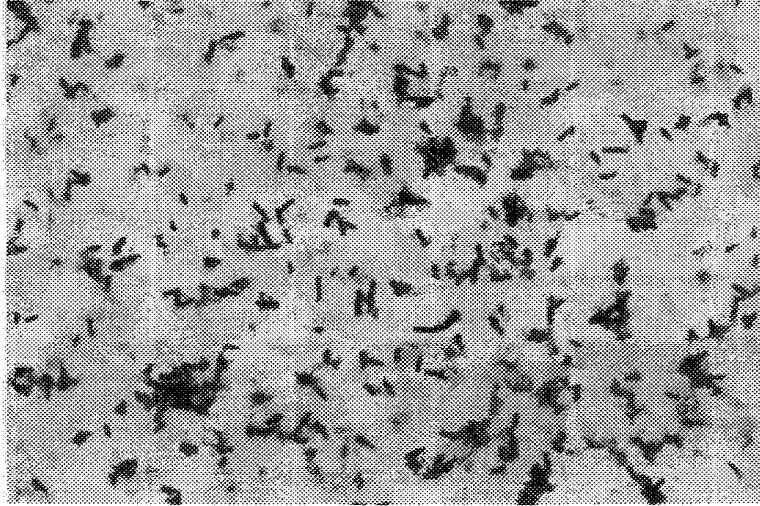


Figure 75. Photomicrograph of *S. gallinarum* in sediment of BHI broth which included anti-*S. gallinarum* specific IgY by 0.3%

*Salmonella gallinarum*의 접종 농도에 따른 형태적 관찰을 보면 *S. gallinarum* 을 10^5 으로 접종시킨 경우 Figure 76에서 보는 바와 같이 균이 IgY에 의해 고르게 붙잡혀서 binding 되어있는 것을 관찰할 수 있었으며 *S. gallinarum* 을 10^7 으로 접종시킨 경우에는 binding되는 균의 숫자가 증가되어 균괴의 크기가 확연히 큰 것을 볼 수 있었다.

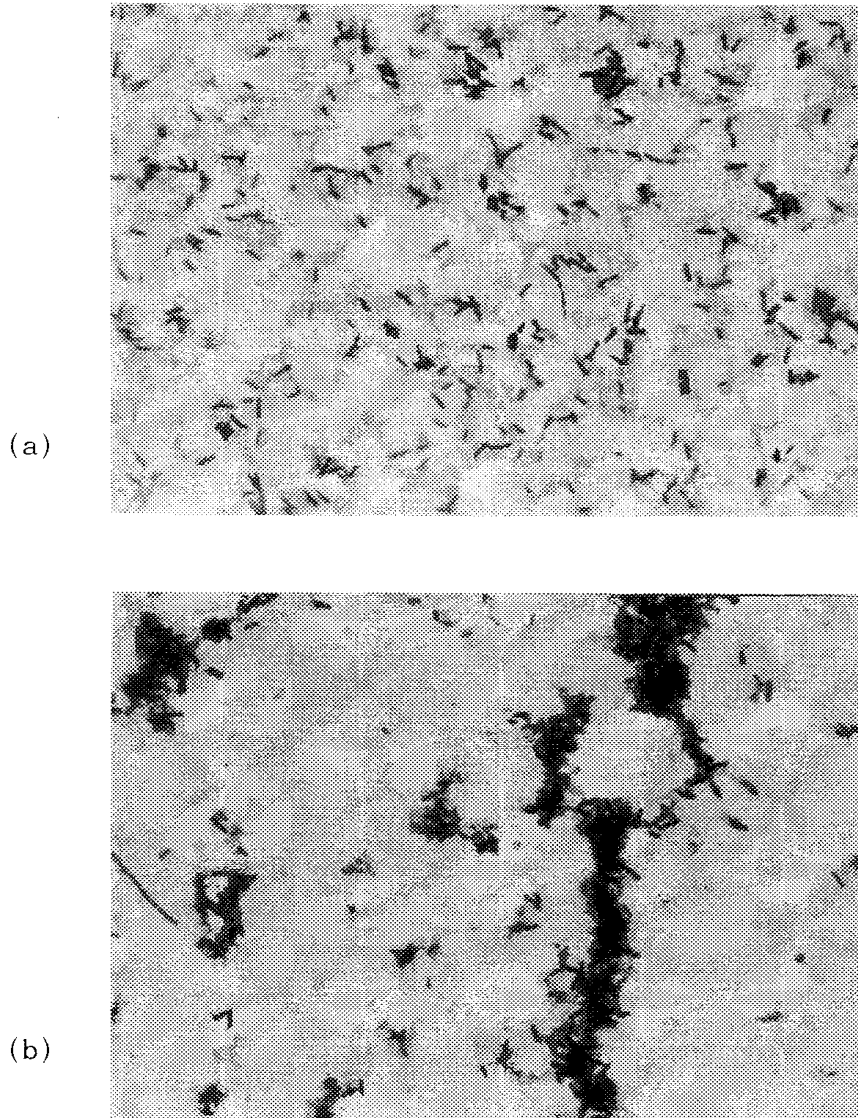


Figure 76. Photomicrograph of *S. gallinarum* in sediment of BHI broth which included anti-*S. gallinarum* specific IgY

(a) *S. gallinarum* by 10^5 , (b) *S. gallinarum* by 10^7

5. 산란계 사료에의 활용시험

가. 음수 중의 변화

IgY를 음수에 녹여 공급할 때 IgY의 음수 중 시간에 따른 역가 변화를 측정하기 위해 specific가 함유된 수용성 단백질 분말을 1%, 2% 되게 증류수에 녹인 후 시간별로 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24시간 마다 채취하여 filter paper 2번으로 filter한 후 total IgY, specific IgY의 역가를 구해 Figure 61과 같은 결과를 얻었다.

전체적으로 조항체 분말 1%, 2% 모두가 시간에 따른 total IgY의 함량의 차이가 거의 없어 음수 중에 조항체를 녹여 공급할 경우 24시간 정도내에만 공급된다면 별다른 역가 저하가 일어나지 않을 것으로 사료되었다.

Specific IgY의 역가도 시간에 따른 역가 저하는 관찰되지 않아 2% 분말에는 거의 변화가 없고 1% 분말의 경우 24시간 후 약간 떨어지는 것을 볼 수 있다.

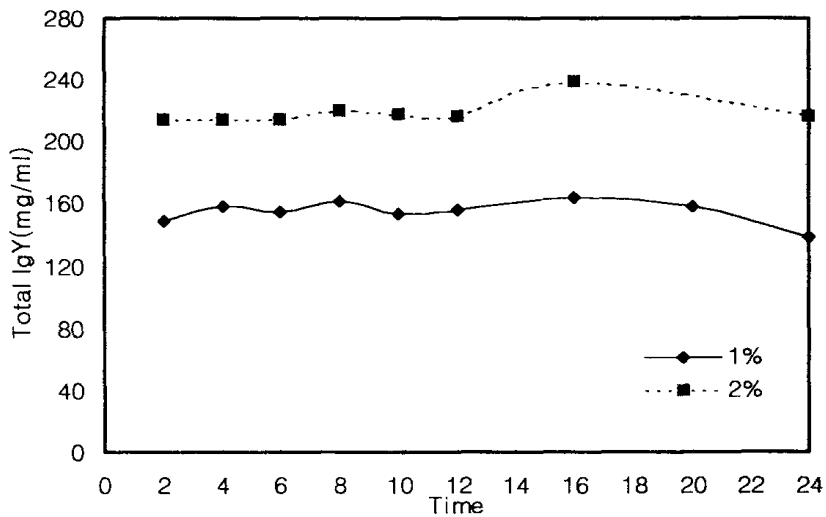


Figure 77. Timely changes of total IgY activity of IgY in water

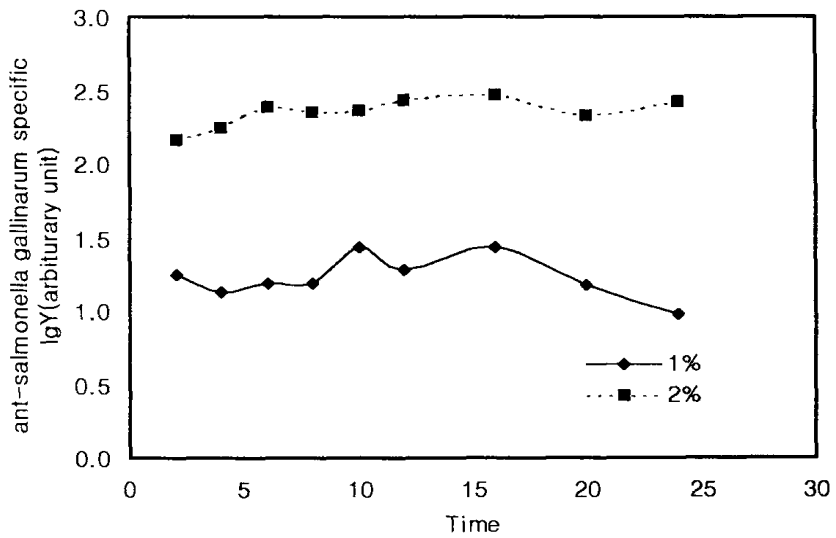


Figure 78. Timely changes of specific IgY activity of IgY powder in water

나. 닭 사료 중의 변화

일반 닭 사료에 IgY 파우더 1%, 2%를 첨가하여 막자사발로 균질화하여 잘 섞은 후 상온에 방치 한 후 PBS buffer를 넣고 시간별로 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24시간마다 일부를 채취하여 filter paper 2 번으로 filter한 후 Total IgY, Specific IgY 역가를 구하여 Figure 79와 같은 결과를 나타내었다.

조항체 분말 1%, 2% 모두 약간의 변화가 있지만 전체적으로 Total IgY의 함량의 차이가 없고 2% 분말은 20시간에 떨어지는 것을 볼 수 있다.

Specific IgY는 1% 분말에는 거의 변화가 없고 2% 분말은 시간에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

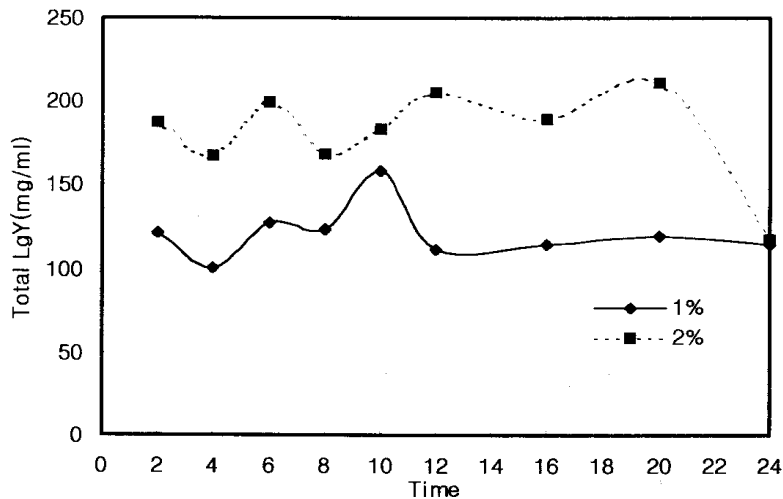


Figure 79. Timely changes of total IgY activity of IgY powder in feed

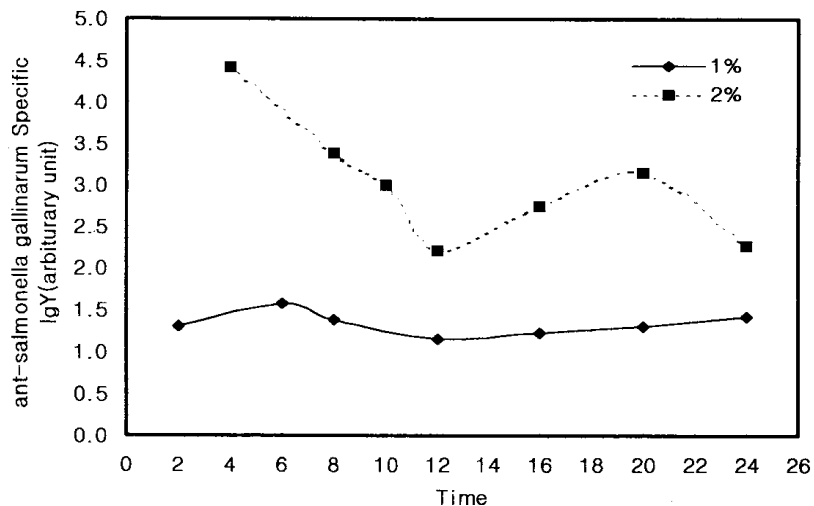


Figure 80. Timely changes of specific IgY activity of IgY powder in feed

6. 산란계 시험을 통한 IgY 효능성 시험

IgY를 다양한 농도로 투여한 계군과 비투여계군을 비교하였을 경우 가금 티프스 균의 접종에 따른 폐사율은 85%에서 90%로서 비투여군 공격접종군의 85%와 비슷한 수준을 보여 시험구간의 차이가 인정되지 않았다. 또한, 균분리율에 있어서도 비투여 비공격군을 제외하고는 대부분의 시험구에서 장기에 상관없이 90%이상의 닭에서 균분리가 됨으로서 IgY 처리구와 비처리구간의 통계학적 유의차가 없었다. 이와 같은 결과가 나타난 이유는 여러 가지가 있을 수 있으나 가장 가능성이 높은 것은 IgY의 효능을 가금 티프스 생균백신과 비슷한 수준의 효과가 있을 것으로 추정을 하여 균 공격량을 10^7 cfu로

높게 책정한 사실일 것이다. 하지만 일반적으로 10^7 cfu 정도의 균접종량은 흔히 사용하는 공격접종량이기 때문에 충분한 설명이 될 수는 없지만 추후 시험에 있어서는 다양한 농도의 공격접종을 하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 또 다른 이유로는 이번에 수당 0.05에서 0.2g 까지 투여한 IgY의 농도가 야외 가금 티프스 강독주를 방어하기 위해서는 매우 낮은 농도일 것이라는 것이다. 현재 기존에 이와 같은 실험이 진행되지 않았기 때문에 정확한 효능을 얻을 수 있는 농도를 알 수는 없으나 현재 투여한 농도보다는 좀더 높은 수준의 IgY를 투여하여야 할 것으로 판단된다. 특히, 야외에서 본 실험과 같은 목적으로 실험을 실시한다면 반드시 고농도의 IgY를 투여하여야 야외현장의 다양성을 극복하여 효능을 평가할 수 있을 것이다.

본 시험에서 투여군이 비투여군보다 폐사율이 같거나 5%정도 높았다. 그 이유로서는 매일 일정한 시간에 투여군에 대하여 일정량의 IgY를 투여함으로써 닭이 많은 스트레스를 받아 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다. 실제로 살모넬라 병은 스트레스와 매우 밀접한 관계를 가지고 있음으로 포획과정에서의 스트레스가 오히려 IgY 투여군에 대하여 폐사율이 높게 나오게 만든 요소로 작용했을 충분한 가능성이 있는 것으로 판단된다. 따라서, 추후 이와 같은 실험을 할 때는 이러한 점을 충분히 고려하여야 할 것으로 판단된다. 그러나, 현실적으로는 적은 양의 닭으로 실험을 해야하기 때문에 사료에 섞는 과정이 무척 어려울 가능성이 있다.

결론적으로 본시험을 통하여 IgY의 효능을 충분히 검토할 수는 없었으나 IgY와 같은 물질에 대한 평가를 하는데에 좋은 모델로서 제시된 것은 바람직한 것으로 판단된다. 추후 이와 같은 실험을 진행

하기 위해서는 일정한 양의 시료가 정확하게 시험닭에 투입이 될 수 있도록 실험이 구성되어야 하고 야외에서 실험을 할 때에는 특히 효능도 등 시료에 대한 완전한 정보를 사전에 충분히 획득하여야 한다.

Table 18. 각 처리군간의 폐사율 및 균분리율의 비교

시험구	폐사수 수(폐사율)	균분리율		
		간	비장	맹장
I	18/20(90%)	20/20(100)	20/20(100)	19/20(95)
II	18/20(90%)	20/20(100)	20/20(100)	19/20(95)
III	17/20(85%)	20/20(100)	20/20(100)	18/20(90)
IV	15/20(85%)	20/20(100)	20/20(100)	18/20(90)
V	0/20(0)	0(0)	0(0)	0(0)

7. IgY 생산비 분석과 경제성 평가

가. 살모넬라 질병예방 IgY 강화계란 생산원가

항-살모넬라 갈리나룸 IgY 항체가 강화된 계란의 생산원가는 Table 19와 같다. 일반란에 비해 백신제조비와 백신접종비가 추가로 계상된다고 볼 때 계란 1개당 약 15원의 비용이 추가로 소요되는 것으로 나타났다.

Table 19. 살모넬라 질병예방 IgY 강화계란 생산원가

항 목	산 출 내 역	금액 (원/일)	비율 (%)	원/ 계란	비고
사 료 비	350,000수×0.115Kg ×250원/Kg	10,062,500	48.16	35.94	
인 건 비	20,000,000원/월÷30일	666,670	3.19	2.38	
약 품 비	3,000,000원/월÷30일	100,000	0.48	0.36	
수도광열비	6,000,000원/월÷30일	200,000	0.95	0.71	
금 용 비	10,000,000원/월÷30일	333,330	1.59	1.19	
기타비용	2,000,000원/월÷30일	66,660	0.32	0.24	
소 계		11,429,160	54.70	40.82	
백신제조비	3,517원/수÷250개	3,939,600	18.86	14.07	※
백신접종비	30원/수×4회÷250개	134,400	0.64	0.48	※
소 계		4,074,000	19.50	14.55	
육성감가비	4,200원/수 ÷ 250개	4,704,000	22.51	16.80	※
시설감가비	5,000,000,000원÷20년 ÷365일	684,930	3.29	2.45	
총 계		17,453,690	100	74.62	

※ 일비역산출

< 생산원가 산출근거 >

(1) 사육규모

- ① 사육수수 : 350,000수
- ② 계사규모 : 70,000수, 6단 4열, 5동
- ③ 급이시설 : 호퍼식 급이기, 낱플급수기
- ④ 환기시설 : 크로스방식
- ⑤ 선별기 : 54,000개/시간
- ⑥ 총시설비 : 50억원, 내용년수 20년

(2) 종사인원

- ① 관리책임자 : 남 1명
- ② 시설관리자 : 남 2명
- ③ 계사관리자 : 여 5명
- ④ 계란선별직 : 여 7명
- ⑤ 경리사무직 : 남 1명 여 2명
- ⑥ 총인건비 : 2,000만원

(3) 병아리육성비 : 4,200원/수(120일령)

(4) 사료비 : 산란사료 230원/Kg, 특수사료 20원/Kg, 일일섭취량
115g

(5) 가금 티프스 질병예방 IgY 백신제조

: 재료비 1,453원/수, 인건비 2,064원/수

(6) 가금 티프스 질병예방 IgY 백신접종 : 외부용역, 4회, 30원/수

(7) 금융비용 : 월 1,000만원(대출원금 10억원)

(8) 평균산란율 : 80%, 280,000개/일

(9) 일생산란수 : 가금 티프스 질병예방 IgY 강화계란 250개

나. 가금 티프스 질병예방 IgY 생산원가

항-살모넬라 갈리나룸 IgY 항체의 생산원가는 Table 20과 같다. 조항체 분말 1g 당 약 300원 정도가 소요되는 것으로 나타났으나, 이는 조항체 분리방법의 변화 등으로 충분한 감소 가능 요인이 내재하는 것으로 나타났다.

Table 20. 살모넬라 질병예방 IgY 분말의 생산원가

항 목	산 출 내 역	금액 (원/일)	비율 (%)	원/ 계란	비고
계란생산원가	5,000,000원/월 ÷ 30일	17,453,690	97.89	74.62	
인 건 비		166,650	0.93	33.33	
재료비		83,400	0.47	16.68	
수도광열비		2,850	0.02	0.57	
금 용 비		121,450	0.68	24.29	
기타비용		1,200	0.01	0.24	
합 계		17,829,240	100	149.73	
※ 1개당 동결건조 분말 0.5g생산 : g당 299.46원-생산원가					

< 생산원가 산출근거 >

(1) 실험실 생산규모 추정

생산규모 : 5,000개/일

(2) 인건비

종사인원 : 5명 × 1,000,000원 ÷ 30일 ÷ 5,000개 = 33.33원/개

(3) 재료비(계란 1개 기준: 난황 15g기준)

- 추출액 비용: 계란 1개당 60ml gum solution(0.1%용액)필요.

MSC CO. LTD기준 # 10387

냉수가용성 kg당 38,000원, g당 38원,

0.1%용액 제조시 0.038원/개

- Filtering 비용: #2 paper(Toyo사 제품) 장당 40원,

8장×40원÷35개=9.14원/개

- Freeze-drying 비용: 수율 1% 기준

(Water soluble fraction 50ml에서 0.5g 생산(계란 1개당)

분말 kg당 15,000원(대량생산시 동결건조비용),

g당 15원, 계란 1개당 7.5원

(4) 수도광열비 : (17.14원=35만수 사육시 1수당 환산자료)

5,000수×17.14원=85,700원/월÷30일÷5000 수=0.57원/개

(5) 금융비용(기기 감가상각으로 계산함) :

- 난황분리기 (5,000개 기준)

108,000,000원÷20년÷365일=14,795원/일 ÷5,000개=2.96원/개

- 원심분리기 (대형)

64,000,000원÷20년÷30일÷5,000개=21.33원/개

(6) 기타비용 : 기기수리비등 일일 1,200원 추정

산란계 10만수 기준 : Adjuvant 사용시 비용

- 1차 백신 : Adjuvant complete Freund

- 2·3차 백신 : Adjuvant incomplete Freund

60,882,000원+(42,202,000원×2)=145,286,444

Table 21. 산란계 면역을 위한 Adjuvant 사용 비용

	Adjuvant complete Freund	Adjuvant incomplete Freund
규격	6×10mL(1BOX): 산란계 120수 백신량	6×10mL(1BOX): 산란계 120수 백신량
단가	73,000원	53,000원
1마리 사용량(산란계)	0.5mL	0.5mL
10만수 기준 필요량	50,000mL	500,000mL
10만수 기준 비용 (Adjuvant 834 box 필요)	73,000 × 834 = 60,882,000원	53,000 × 834 = 42,202,000원

※ 145,286,444원 ÷ 100,000수 = 1,453원/수

1,453원/수 ÷ 200개 계란 = 7.3원/개. 계란

산란계 한 마리당 질병 예방 치료약값은 산란전까지 평균적으로 420원이 소요되며 그중에서도 가금 티프스 예방을 위해서는 170원이 든다. 가금 티프스 예방 약값이 전체 예방 약값의 무려 40%이상이나 차지하는 셈이 된다. 그러나 이 병은 근절이 안되고 일단 감염되면 그 농장 산란계는 거의 폐사하므로 10만수 농가의 경우에 10억원이상 손해를 보며, 전국적인 피해 단위는 대단히 크다. 그러므로 조항제 분말의 생산 비용으로만 고려한다면 가금 티프스 예방을 위한 IgY를 사료에 첨가하는 방법이 너무 고가이는 하나, 산란 중인 산란계에는 항생제 등을 투여할 수 없음을 생각할 때 IgY는 산란 중인 산란계에 투여하여도 산란계가 낳는 계란에 아무 영

향을 미치지 않으므로 가급 티프스의 예방 또는 치료제로 고려될 수 있다.

참 고 문 헌

- 특수면역 단백질 문헌 -

1. Hatta, H., Sim, J.S. and Nakai S. : Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water soluble proteins, *J. Food Sci.*, 53(2) 425-431. 1988
2. Lee, K., Ametani A., Shimizu M., Hatta H., Yamamoto T., and Kimnogawa S. : Production and characterization of anti-human insulin antibodies in the hen's egg. *Agric Biol. Chem.*, 55(8):2141-2143. 1991
3. Larsson, A., Balow R.M., Linda T.L. and Forsberg P.O. : Chicken antibodies : Taking advantage of evolution - A review. *Poultry Sci.*, 72(9):1807-1812. 1995.
4. McBee, L.E. and Cotterill O.J. : Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *J. Food Sci.*, 44:656-667. 1979.
5. Bade, H. and Stegemann H. : Rapid method of extraction antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods.* 72:421-426. 1984.
6. Polson A. and Von Wechmar M.B. Insolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9(4):475. 1980.
7. Hassl, A., Aspöck M. and Flamm H. : Comparative studies on

the purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with *Toxoplasma gondii* antigen. Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, Abteilung A 267, 247-253, 1987.

8. Jensenius, J.C., Anderson I., Han J., Crone H.M. and Koch C. : Egg ; conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J. Immunol. Methods 46(1):63-68. 1981.
9. Hatta, H., Kim. M. and Yamamoto T. : A novel isolation method for hen egg yolk antibody "IgY". Agric. Biol. Chem. 54(10):231-253. 1990.
10. Yolken, R.H., Leister F., Wee S.B., Miskuff R, and Vonderfecht S. : Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs : a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. Pediatrics 81(3):291-295. 1988.
11. Shimizu, M., Fitzsimmons R.C., and Nakai S. : Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk immunized chickens as a potential food ingredient. J. Food Sci., 53(5):1360-1366. 1988.
12. Yokoyama, H., Peralta R.C., Horikoshi T., Hiraoka J., Ikemori Y., Kuroki M. and Kodama Y. : A two-step procedure for purification of hen egg yolk immunoglobulin G : Utilization of hydroxypropylmethylcellulose phthalate and synthetic affinity ligand gel. Poultry Sci., 72(2):275-281.

- 1993.
13. O'Farrelly C., Branton D., and Wanke C.A. : Orage ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic Escherichia coli strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infection and Immunity* 60(7):2593-2597. 1992.
 14. Shimizu, M., Miwa Y., Hashimoto K. and Goto A. : Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G(IgY) by liposomes. *Biosci. Biotech.* 57(9):1445-1449. 1993.
 15. 김정우, 김춘수, 박근식, 김상희. 영양소의 수준별 parameter와 면역기전과의 상관성이 닭 질병의 저항성에 미치는 영향에 관한 연구. 과학기술처 특정연구과제. 1991.
 16. 김정우, 김춘수, 김상희, 박근식 : Copper, selenium과 vitamin E의 첨가급여가 육용계의 IgG 수준 과 성장율에 미치는 효과. *한국가금학회지* 20(2):55-64. 1993.
 17. 김정우, 이진언, 김춘수, 김상희, 박근식. 육용계의 혈청중 면역 글로부린(IgA, IgG, IgM) 농도의 발육시기 별 변화상. 1. 혈청 IgG의 분리 및 발육시기별 농도수준. *한국가금학회지.* 20(2):65-72. 1993.
 18. Markinson, M. : *Immunology* 9:311-317. 1965.
 19. Fraser, D.T., Jukes T.H., Branion H.O. and Halpern K.D. J. The inheritance of diphtheria immunity in ducks. *Immunol.* 26(6):347-446. 1934.
 20. Patterson, R., Younger J.S., Weigle W.O. and Dixon F.J. : The metabolism of serum proteins in the hen and chick and

- secretion of serum proteins by the ovary of the hen. J. Gen. Physiol. 45:501-513. 1962.
21. Leslie G.A. and Martin L.N. Studies on the secretory immunologic system of fowl. J. Immunol. 110:1-9. 1973.
 22. Rose M.E., Orlans E., and Butteress N. : Immunoglobulin classes in hens egg : their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 4:521-523. 1974.
 23. Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M. and Yamamoto T. : Oral pasive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior proteolytic enzymes. Biosci. Biotech. Biochem. 57(7):1077-1081.
 24. Jensenius J. C., Anderson I., Hau J, Crone H.M. and Koch C. : Eggs : Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J. Immunol. Methods 46(1):63-68. 1981.
 25. Gottenstein, B. and Hemmeler H. : Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. Zeitschrift fur parasiten-human 71:273-276. 1985.
 26. Butler J.E : Lactation. A comparative treatise III. Nutrition and Biochemistry of milk/maintenance. pp 239-246. 1974.
 27. Kinsella J.E. and White head D.M. : Advances in Food and Nutrition Research. vol. 33 pp 421-425. 1989.
 28. Kuzuya M., Yokoyama H. and Kodama Y. : Purification of K 88

and K 99 pili from porcine enterototigenic Escherichia coli by affinity chromatography. Jpn. J. Vet. Sci., 50(4):951-953. 1988.

29. Issacson R.E. and Richter P. : Escherichia coli 987p pilus : purification and partial characterization. J. Bacteriol. 146:784-789. 1981.
30. 김정우, 고승연, 조석현 : ELISA 법을 이용한 돼지의 혈청 IgG 농도 측정. 한국축산학회지 30(5):453. 1994.
31. 이남형, 한찬규, 이복희, 윤미경 : 특수계란의 유효성 평가에 관한 연구. 한국식품개발연구원 보고서(E1278-0514). 1994.
32. 이민호. 젖소 초유로부터 Gammaglobulin의 대량분리와 이의 급여가 신생자돈의 성장율에 미치는 효과. 단국대학교 석사학위논문. 1995.

- 가금 티프스 문헌 -

1. W. 더글라스 월트만과 앨리스 M. 혼. 1995. 추백리- 가금 티프스 급속 평판 응집 반응 시험에서 양성 반응을 보이는 닭으로 부터의 살모넬라 균의 분리(미국 조지아 가금실험소). 양계연구 12:56-60
2. 우용구. 1995. 살모넬라 균의 배양, 분리 및 확인 기법 (수의과학 연구소 계역과). 양계연구 12 : 62-66
3. 문성철. 1995. 한국에서 처음 시판되는 가금 티프스 불활화 백신 "FT-Vac" (한국 미생물 연구소). 양계연구 12: 68-70

4. 정현진 .1995. 인터베트 SG 생독백신 “ 노빌리스” (양지화학). 양계연구 12: 72-73
5. 모인필.1995. 중추 구입 후 가금 티프스 발생으로 폐사 다발 (수의과학연구소 계역과) 양계연구 12:52-53
6. 나만체. 1999. 국내 산란계에서 다발하는 주요 질병 및 대책 (한국 가금연구소) 월간양계 2: 85-89
7. 오경록. 1999. 가금용 살모넬라균 백신의 장단점 (남덕 새니테크) 월간양계1:52-53
8. 유종철.1999. 전체 가금 질병의 101가지 종류와 국내 필드 대처 상황 (유수의과 양계병원). 현대양계 1: 54-59
9. 오경록. 1995. 살모넬라균의 총합적 방역 프로그램. 양계연구 6: 41-46
10. 박경윤.1995. 양계장의 살모넬라 감염실태와 대책 (바이엘 코리아). 양계연구 6: 54-58
11. E. 비에리쯔. 1994. 계란의 살모넬라 오염 문제 해결(독일 쿠사벤 질병 연구소). 양계연구 9:62-65
12. 문성철.1995. 국내에서의 가금 티프스 발생 사례. 양계연구 12: 40-44
13. 박경윤. 1995. 가금 티프스의 예방과 근절을 위한 대책. 양계연구 12: 46-50
14. 이희수.1995. 가금 티프스 예방 백신 (수의과학 연구소). 양계연구 12: 52-53
15. 강문일. 1993. 살모넬라에 의해 발생하는 주요 질병들 (전남대 수의대) 양계연구 1: 46-50
16. 강문일.1992. 살모넬라 없는 계란과 계육 생산 대책. 양계연구

11: 40-43

17. 권오웅. 1995. 닭고기와 계란의 살모넬라 오염. 양계연구 6: 62-65
18. 오경록. 1995. 사료의 살모넬라 오염. 양계연구 6: 66-71
19. Habil Horst Meyer. 1995. 백신, 생균제와 탄수화물 첨가, 사료의 펠릿화로 살모넬라 감염 예방(독일 수의과학연구소). 양계연구 6: 72-75
20. 하다게야마 히데오 . 1996. 양계 질병 발생시의 경제성 평가(일본 중앙 축산회). 양계연구 1 : 72-77
21. 권오웅.1995. 살모넬라속 균의 검출. 양계연구 6: 76-78
22. 송용준.1996. 살모넬라 살균을 위주로 개발된 “익스팬더”의 양계사료에의 이용, 양계연구 2: 64-66