

Helicobacter pylori 항원을 이용한 면역우유의 항체특성에 관한 연구

박창호[†] · 예은주 · 김수정 · 배만종

대구한의대학교 한방바이오식품학과

Study on Characteristics of Antibody from Milk Immunized with Some *Helicobacter pylori* Antigen

Chang-Ho Park[†], Eun-Ju Ye, Soo-Jung Kim and Man-Jong Bae

Dept. of Oriental Medicine Biofood Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Abstract

This study has been carried out to examine the characteristics of anti-*H. pylori* antibodies of milk produced from cows immunized with antigen of *Helicobacter pylori* such as peculiarity of antigen antibody, agglutination of *H. pylori* strain, stability of antibody against acid, alkali and heat treatments. The molecular weight of anti-*H. pylori* antibody measured by SDS-PAGE were turned out as about 50 kDa in the heavy chain and about 24 kDa in the light chain. Twenty protein bands were visualized in *H. pylori* interacting with anti-*H. pylori* antibody which was made in dairy cow by immunization with *H. pylori*. The western blotting was performed in order to examine the antigen peculiarity of anti-*H. pylori*. The results were all 7 antigen substances including serum, furified serum, whey and furified whey could be confirmed and the major antigen substances were 97, 66, 34 kDa of molecular weight. As a result of agglutination response anti-*H. pylori* antibody in whey showed 1/10 agglutination value against *H. pylori*. In stability test about acid and alkali of antibody, there was 100% activated at the range of pH 5~pH 10. In stability test about heat, the antibody showed stable condition at 60°C for 60 minutes and comparatively stable condition at 70°C, but reduced activation to 40% after 60 minutes. It maintained 77% activation at 80°C for 4 minutes and comparatively stable at 100°C for 1 minute.

Key words: SDS-PAGE, western blotting, agglutination

서 론

*Helicobacter pylori*는 우측나선형 몸통과 4~8개의 유초성 편모(flagella)를 가진 미호기성 그람음성 단간균으로서 1983년 오스트레일리아의 Warren과 Marshall에 의해 처음으로 위점막에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기질환의 원인균으로 알려져 있다(1-3).

미래의 *H. pylori* 감염을 치료하기 위한 근본적인 대책은 백신에 있지만 아직 실험실 연구에 그칠 뿐 현재까지 효과적인 백신으로 상용화되지 못하고 있어(4,5) *H. pylori* 관련성 위염의 치료는 앞으로도 상당 기간 고식적인 치료방법에 의존할 수밖에 없는 상황이다. 최근에는 항생제를 사용하지 않는 *H. pylori*의 새로운 치료개념의 일환으로 비항생제성 물질들이 관심을 끌고 있다(6-9). 따라서 *H. pylori*균을 항원으로 면역시스템 기법이나 항원항체 반응을 이용한 특이항체의 생산 및 그 활용도가 점점 증대되고 있다. 수동면역 소재로서의 항체는 선천적 또는 후천적 면역결핍증을 앓고 있는 신생아나 어린이처럼 면역기능이 떨어져 항체를 생산

할 수 없는 이들에게 소화관 감염에 대한 보호기능이 있고 또한 약물, 영양결핍, 노화에 의해서 면역기능이 떨어진 성인이나 어린이에게도 활용할 수 있다. 최근에 *H. pylori*의 부착을 억제하고 또 이미 부착된 균을 탈착시키기 위해 난황(egg yolk) 항체가 이용되고 있으며, *H. pylori*균 성장에 있어서도 억제하는 것으로 보고되고 있다(10). 그리고 오늘날 *H. pylori* 박멸 및 감염률 감소를 위해 각종 건강보조식품형태로 계란이 출시되고 있으나, 계란은 콜레스테롤 함량이 높아 사람들이 섭취를 회피하는 경향이 있다.

따라서 본 연구에서는 위염, 위궤양의 원인균인 *H. pylori*를 항원으로 하여 젖소에 면역시켜 특이항체가 함유된 면역우유를 생산하여 건강보조식품으로 이용하고자 항원의 특성을 조사하고 우유내 anti-*H. pylori* 항체의 첨가제에 따른 열에 대한 안정성, 산에 대한 안정성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

항원의 준비

한국유전자은행으로부터 분양받은 *H. pylori*(KCTC12083)

[†]Corresponding author. E-mail: 9224017@daum.net
Phone: 82-53-819-1425. Fax: 82-53-802-2490

균주는 sheep blood agar(SBA) plate를 사용하여 CO₂ 농도 10%, 37°C에서 2~3일 간격으로 계대배양하였다. 계대배양으로 활성화된 균주는 56°C에서 30분간 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)이 5% 첨가된 MHB(Mueller Hinton Broth)배지에서 48시간 동안 액체 배양하였다. 실험균주의 검정은 현미경적 관찰, Gram염색과 urease test를 통해 실시하였다.

액체 배양된 균주는 0.5% formalin용액으로 3시간동안 불활성화시킨 후 4°C, 4,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 회수하고, 회수된 균은 다시 멸균 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 세척된 균은 얼음물에서 5분간 sonicate(pulse 20, duty cycle 50)하여 파장 667 nm에서 OD=1.0이 되도록 맞춘 후 백신용 항원으로 사용하였고, 파장 405 nm에서 OD=0.5로 맞춘 것은 ELISA 분석용 항원으로 사용하였다.

면역

초산에서 3산차에 이르는 착유우 홀스타인(Holstein) 6두를 대상으로 백신투여하였으며, 면역횟수는 총 4회 실시하였다. 1차 면역은 *H. pylori* 항원을 Freund's incomplete adjuvant(Sigma F-5881)와 1:1 비율로 유화(5,000 rpm, 5 min)한 다음 젖소의 양쪽어깨 견갑골(scapula)부위 근육에 20 mL를 각각 4곳에 동일량으로 나누어 근육주사(intramuscular)하였다(11-13). 2, 3차 면역은 1차 면역 후 2주 간격으로 항원과 Freund's complete adjuvant(Sigma F-5506)를 같은 방법으로 백신주사하고, 4차 백신은 3차 백신 3주 후에 면역시켰다(10).

우유로부터 항체 분리

우유 sample에서 항체를 분리해내기 위해 4°C, 14,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 지방을 제거하고, rennin (2 mg/L)과 calcium carbonate(4 g/L)를 용해한 후 응유가 형성될 때까지 30°C에서 incubation하여 casein을 침전시켰다. 침전된 casein은 실온에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액 65 mL에 포화 ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄) 35 mL를 가하여 침전시키는 것을 3회 반복하였다. 침전된 단백질은 borated-buffered saline(BBS, pH 8.4)에 투석막으로 투석하여 동결건조하였다.

혈청으로부터 항체의 분리

혈액으로부터 항체를 분리하기 위해 젖소 경정맥에서 채취한 혈액은 4°C, 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 분리된 혈청 10 mL에 PBS 10 mL를 가한 다음 포화 ammonium sulfate 20 mL를 첨가하여 30~60분 동안 서서히 교반 후 실온에서 6,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 분리된 침전물을 PBS에 용해시키고 전량을 10 mL로 한 다음 다시 포화 ammonium sulfate를 20% 되도록 첨가하여 원심분리 후 침전물을 제거하였다. 다시 상층액에 30% 포화 am-

monium sulfate를 가하고 원심분리하는 과정을 2회 더 반복하여 얻은 침전물에 소량의 PBS로 용해하여 투석하여 탈염하였다.

Anti-*H. pylori* 항체의 정제 및 분획

고순도의 specific anti-*H. pylori* 항체를 정제 및 분획하기 위해 PBS로 anti-*H. pylori* 항체를 40 mg/mL로 녹인 후 총량 45 mL되게 하였다. 만들어진 시료는 Bio-Gel A-1.5 m Gel이 충전된 column(φ 2.0×25 cm)에 유속 2 mL/min로 통과시켜 그 fraction을 수집하였다(11-13). 각 fraction의 단백질 함량을 측정하기 위해 OD=280 nm에서 흡광도를 측정하고, specific anti-*H. pylori* 항체를 분획하기 위해 405 nm에서 ELISA 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

*H. pylori*균과 anti-*H. pylori* 항체의 특성을 조사하기 위한 분자량 측정은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 행하였다. 0.5 M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide를 함유한 4.0%(v/v) 농축 겔(stack gel)을 사용하고, 분리겔(separating gel)은 1.5 M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide를 함유한 10%(v/v) 겔을 사용하였다. 분리정제된 항체단백질 30 µg/µL(DW)를 sample buffer로 1:4로 희석하여 각 well에 20 µL씩 loading하였다. Sonicate된 *H. pylori*균 40 µg/mL(D.W)를 sample buffer와 1:4로 희석한 후 20 µL씩 loading하였다. Marker는 wide range(Sigma M4038)와 low range(Sigma M3913) 두 종류를 5 µL씩 loading하였다. 전기영동 후 겔은 Coomassie blue로 염색하여 단백질 band를 확인하였다.

Western blotting에 의한 항원의 특이성 확인

H. pylori 항원에 의해 생성된 anti-*H. pylori* 항체가 항원에 특이적으로 반응하는지를 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. *H. pylori* whole cell을 sonicator로 파쇄하여 원심분리(4,000 rpm, 5 min, 4°C)한 상등액을 sample buffer와 1:4로 희석하여 각 well에 20 µL씩 loading후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 Fig. 1과 같이 NC membrane(Nitrocellulose, Gelman Sciences Co.)에 transfer하여 western blotting하였다.

1차 항체(primary antibody)는 우유정제와 혈청정제로 얻은 항체를 결합시키고, 2차 항체(secondary antibody)는 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 1:30,000으로 희석하여 반응시켰다. 기질로 alkaline phosphatase substrate를 사용하여 3분 반응시켜 X-ray 필름상에서 항원물질의 확인하였다.

Anti-*H. pylori* 항체에 의한 *H. pylori*균 응집 반응

*H. pylori*균을 PBS로 405 nm에서 OD=1.0으로 조절하여 well당 100 µL씩 coating 후 2시간동안 실온에 incubation하

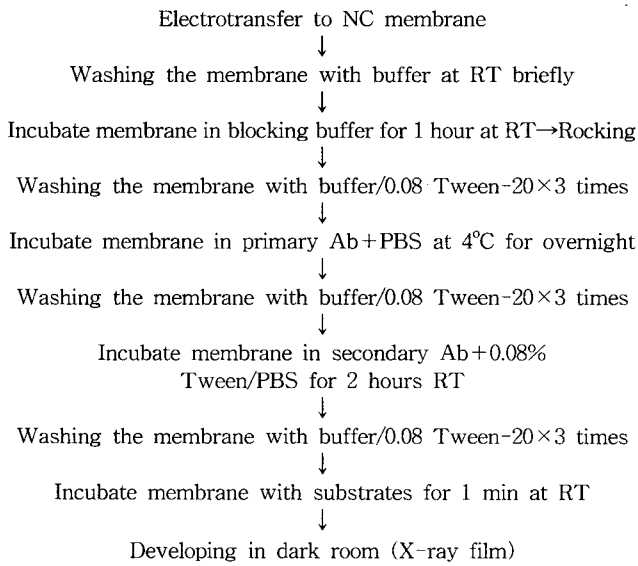


Fig. 1. Western blotting.

였다. Anti-*H. pylori* 항체를 함유한 유청(whey)을 단계별로 희석하여 각 well당 100 µL씩 분주하고 2시간동안 incubation 후 응집정도를 ×500배 광학현미경으로 관찰하였다.

Anti-*H. pylori* 항체의 산과 알칼리 및 열에 대한 안정성 실험

우유중에 생성된 항체의 열에 대한 안정성을 알아보기 위해 유청(whey)을 분리하여 시료로 사용하였다. 또한, 첨가물 첨가에 따른 열에 대한 안정성변화를 알아보기 위해 whey, 20% maltose, 20% glycerol, 0.2% glutamic acid를 첨가하여 0.5 mL centrifuge tube에 150 µL씩 나누어 담아 heating block(model: HF-21, Yamato Scientific Co., Ltd)으로 60°C, 70°C, 80°C, 100°C 그리고 135°C에서 시간별로 처리한 다음 Fig. 2와 같이 ELISA reader로 anti-*H. pylori* 항체 활성을 측정하였다.

산과 알칼리에 대한 안정성 실험은 유청을 1 N HCl로 pH 7~1까지 조절하고, 알칼리상태는 1 N NaOH로 pH 8~12까지 조절하여 ELISA reader로 anti-*H. pylori* 항체 활성을 측정하였다(14).

결과 및 고찰

Anti-*H. pylori* 항체의 특이성

분리정제된 anti-*H. pylori* 항체와 항원 *H. pylori*균을 분석하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 항원의 종류에 따라 면역반응을 일으킬 수 있는 항체 단백질의 종류에는 여러 가지가 있을 수 있지만 소의 혈청과 유청 중에 있는 항체는 항원 반응의 특성에 따라 IgG1, IgG2, IgM, IgA 등의 4종으로 분류된다(15). IgG항체는 두 종류의 폴리펩티드로 이루어진 분자량이 150 kDa 정도 되는 커다란

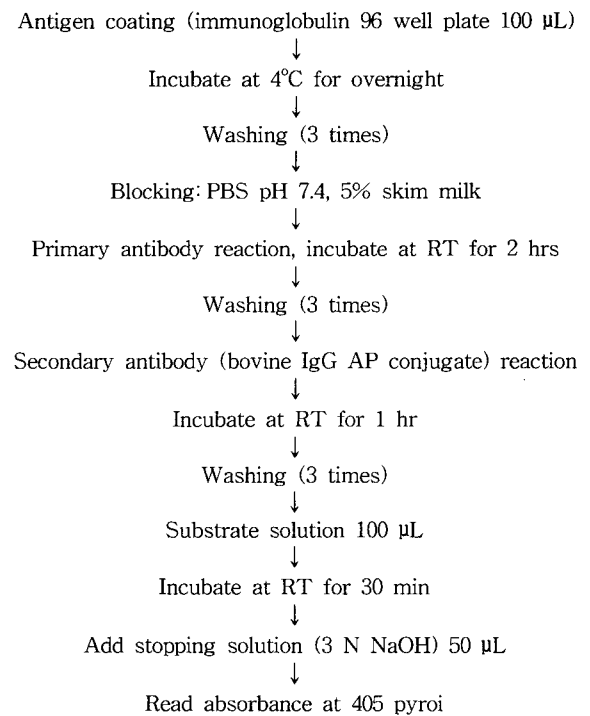


Fig. 2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent) test.

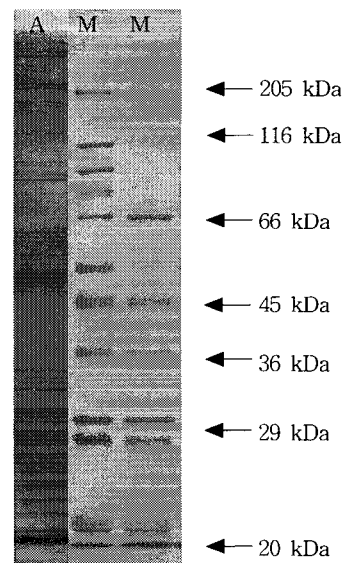


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of antibody from dairy cows immunized with *H. pylori* antigen.

M: Marker (20 kDa: trypsin inhibitor, 29 kDa: carbonic anhydrase, 36 kDa: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 45 kDa: ovalbumin, 66 kDa: albumin, bovine serum, 116 kDa: β-galactosidase, 205 kDa: myosin).
A: Purification IgG from milk of hyper-immunized dairy cows.

분자이다. 약 50 kDa 정도 되는 중쇄(heavy chain)와 25 kDa 되는 경쇄(light chain)로 이루어져 있으며, Ig(immunoglobulin)는 두 개의 동일한 중쇄와 경쇄로 이루어져 있다(16).

본 실험에서도 anti-*H. pylori* 항체는 분자량 50 kDa의 heavy chain과 분자량 24 kDa 정도에서 light chain으로 보

여지는 각각 1개의 band가 형성되는 것을 볼 때 Kim 등(6)과 Shin 등(17)이 보고한 결과와 동일한 양상을 나타내었다.

항원의 특이성

Fig. 4는 anti-*H. pylori* 항체에 의한 항원의 특이성을 알아보기 위해 western blotting을 실시한 결과이다. 항원인 *H. pylori*균의 SDS-PAGE로 분자량 측정결과 항원 단백질은 12개 band를 형성하였다. 12개의 단백질 가운데 1차 항체(primary antibody)로 혈청, 혈청정제, 유청, 유청정제물을 이용하여 western blotting한 결과 7개의 항원성 물질을 확인할 수 있었고, 그중 주 항원성 물질은 분자량이 97, 66, 34

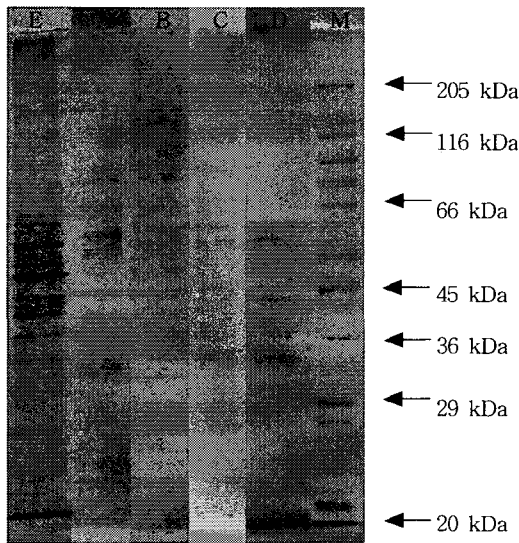


Fig. 4. Western blotting profile of purified antibody from dairy cows immunized with *H. pylori* antigen.
 Primary antibody was serum (line A), purified serum (line B) whey (line C) and purified whey (line D).
 E: Sonicated *H. pylori* whole cell antigen.
 M: Marker (20 kDa: trypsin inhibitor, 29 kDa: carbonic anhydrase, 36 kDa: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 45 kDa: ovalbumin, 66 kDa: albumin, bovine serum, 116 kDa: β -galactosidase, 205 kDa: myosin).

kDa인 3개의 band를 확인할 수 있었다.

Anti-*H. pylori* 항체의 정제 및 분획

우유로부터 분리된 항체에서 specific anti-*H. pylori* 항체를 정제 및 분획하기 위해 Bio-Gel A-1.5 m Gel을 통과시킨 후 각 fraction의 단백질 함량과 항체 함량을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다.

대부분의 항체 단백질은 fraction 9~30 사이에 함유되어 있었으며, specific anti-*H. pylori* 항체는 fraction 17~25 사이에 위치하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 fraction 17~25를 합하여 specific anti-*H. pylori* 항체로 사용하였다.

응집반응

응집반응은 세균, 적혈구와 같은 일정한 크기를 가진 항원입자가 그 항체와 반응해서 응집괴를 만드는 현상을 말한다(18).

항체의 항원에 대한 응집정도는 Fig. 6과 같이 면역하지 않은 대조구에서는 응집반응을 일으키지 않은 반면 *H. pylori*균으로 면역시킨 anti-*H. pylori* 항체는 *H. pylori*균에 대해 강한 응집반응을 일으켰다. 이미 보고된 바에 의하면 IgY 특이항체가 *H. pylori* 성장을 억제하는 것이 관찰되었으며(6) 4종의 *H. pylori*균으로 면역시켜 얻은 유청 항체에

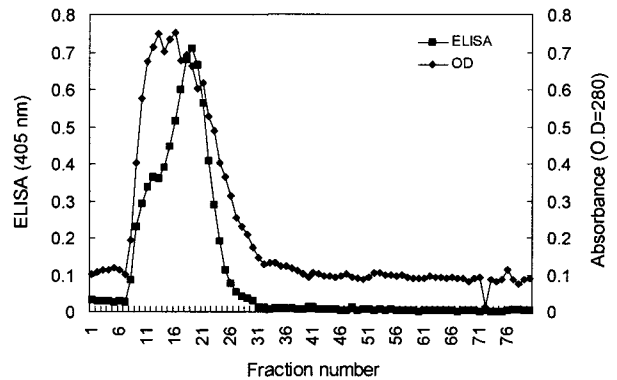


Fig. 5. Fraction pattern of whey acquired from cows milk immunized with *H. pylori* antigen.

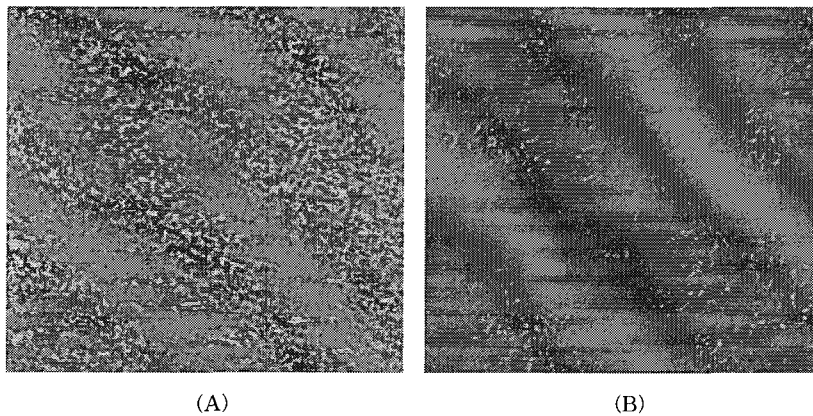


Fig. 6. Agglutination of antigen by anti-*H. pylori* antibody.
H. pylori strains show change of agglutination after treatment (B) when compared with before treatment (A). Magnification: $\times 500$.

Table 1. Agglutination value of antigen by anti-*H. pylori* antibody

Antibody	Agglutinating dilution fold of anti- <i>H. pylori</i> antibody
Negative control	-
Anti- <i>H. pylori</i> antibody	1/10

H. pylori (100 µL, OD 1.0 at 405 nm in PBS) and same volume of diluted anti-*H. pylori* antibody were mixed in immunoglobulin 96 well plate for 2 hr at RT. The aggregation was detected by simple visual inspection.

서도 높은 살균력을 보인다는 보고(7)가 있다. 본 실험에서도 유청내의 anti-*H. pylori* 항체가 *H. pylori*균에 대해 1/10의 높은 응집가를 나타내었으며(Table 1), Fig. 6과 같이 *H. pylori*균의 응집반응 결과를 볼 때 우유를 섭취함으로써 *H. pylori* 감염예방 및 치료효과가 가능할 것으로 판단된다.

항체의 산 및 알칼리 처리에 대한 안정성

Anti-*H. pylori* 항체의 산과 알칼리 처리에 대한 안정성을 알아보기 위해 원유에서 casein이 제거된 유청(whey) 단백질을 pH 1~12 범위에서 항체 활성을 측정하였다. Anti-*H. pylori* 항체의 활성을 측정한 결과 pH 5~10 범위에 100%의 활성을 나타내었으나, pH 4 및 pH 11에서는 항체활성이 70%로 감소하였다. 그리고 pH 1~3 및 pH 12에서는 거의 활성을 나타내지 않았다(Fig. 7). 이러한 결과는 난황에서의 IgY 안정성에 대한 연구보고(19)와 유사한 경향을 나타내었으며 유청내 항체 또한 산과 알칼리에 대해 비교적 안정성을 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 유제품 생산 시 처리될 수 있는 산 처리에 대해 항체는 비교적 안정성을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

항체의 열처리에 대한 안정성

우유 열처리는 우유의 기능적 특성을 변화시키고 다양한 유제품의 생산에 널리 이용된다. 이러한 열처리는 우유성분에 영향을 미쳐 우유의 관능적, 영양적 품질 변화를 주게 되므로 최종산물의 특성에 중요하다. 우유에서 열처리로 인

한 성분의 변화는 유청단백질의 열 유도성 상호작용과 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(15).

설탕용액을 IgG와 IgY에 첨가하였을 때 열에 대한 방어 효과가 있는 것으로 나타난 연구보고(11)에 따라 본 실험에서는 20% maltose, 20% glycerol, 0.2% glutamic acid를 첨가하여 열에 대한 안정성을 실험한 결과 Fig. 8과 같다. 항체는 60°C에서는 각 첨가물 유청에서 모두 60분간 비교적 안정성을 유지하였고, 70°C에서는 시간이 경과함에 따라 활성이 떨어지기 시작하여 60분 경과 후 전체적으로 활성이 40% 감소하였다. 항체는 80°C에서는 4분간 77%의 활성을 유지하였고, 시간이 지남에 따라 활성이 떨어져 8분 이후에는 모두 활성이 나타나지 않았다. 항체는 100°C에서는 1분간 비교적 안정성을 유지하였으나, 1분 후에 활성이 급격히 떨어져 3분 이후 거의 활성이 나타나지 않았으며, 135°C에서도 1분 이내 활성이 80~90% 이상 떨어지고 2분 이후는 거의 활성이 나타나지 않았다.

유청 단백질의 열에 대한 변성을 전기영동법으로 조사한 결과에 따르면 immunoglobulin, serum albumin, β-lactoglobulin, α-lactalbumin 순으로 열에 대해 안정한 것으로 보고된 결과가 있으며, 또한 70°C에서 3분간 열처리에서도 안정성이 11%, 48%, 68%, 95% 정도로 감소한 연구결과(20)를 볼 때 본 실험에서도 열에 대해 비교적 안정한 것으로 나타났다.

또한 IgY(immunoglobulin yolk)를 1분간 가열했을 때 상대적 항체가는 70°C에서 87%, 75°C에서 70%까지 활성을 나타내었고, 90°C에서는 거의 활성을 나타내지 않았다는 보고(14)가 있다. 우유는 100°C에서도 1분 동안 어느 정도 안정성을 나타내는 결과를 볼 때 IgY보다 더 큰 안정성을 보이는 것으로 판단된다. 또한 항체에 첨가물 첨가가 열에 대해 안정성에 영향을 끼친다는 보고(21)가 있다. 그러나 본 실험에서는 유청에 20% maltose, 20% glycerol, 0.2% glutamic acid의 첨가가 열 안정성에 대해서 전체적으로 큰 영향은 끼치지 못하였다. 이는 다른 보고들과 달리 열처리 시간과 온도에서의 실험방법적인 차이로 인해 본 실험과 다른 결과를 나타낸 것으로 보여진다.

이상의 열에 대한 안정성 실험결과를 볼 때 우유살균 처리 방법 중 저온유지살균법(62~65°C, 30분), 고온살균법(HTST, 70°C~75°C, 15초), 초고온살균법(UHT, 130°C~135°C, 1~5초) 가운데 저온 및 고온살균법에 의한 살균방법을 선택함으로써 열처리로 인한 anti-*H. pylori* 항체의 활성변화를 어느 정도 방지할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 위염, 위궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기 질환의 원인균으로 알려진 *H. pylori*균을 항원으로 하여 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 항원 항체의 특이성, *H.*

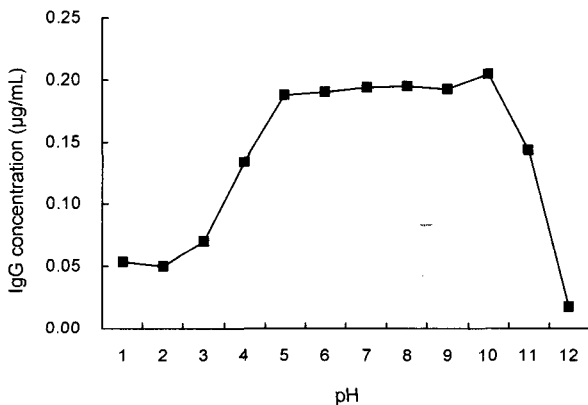


Fig. 7. Change in the antibody activity of anti-*H. pylori* antibody after incubating at acidic or alkaline conditions.

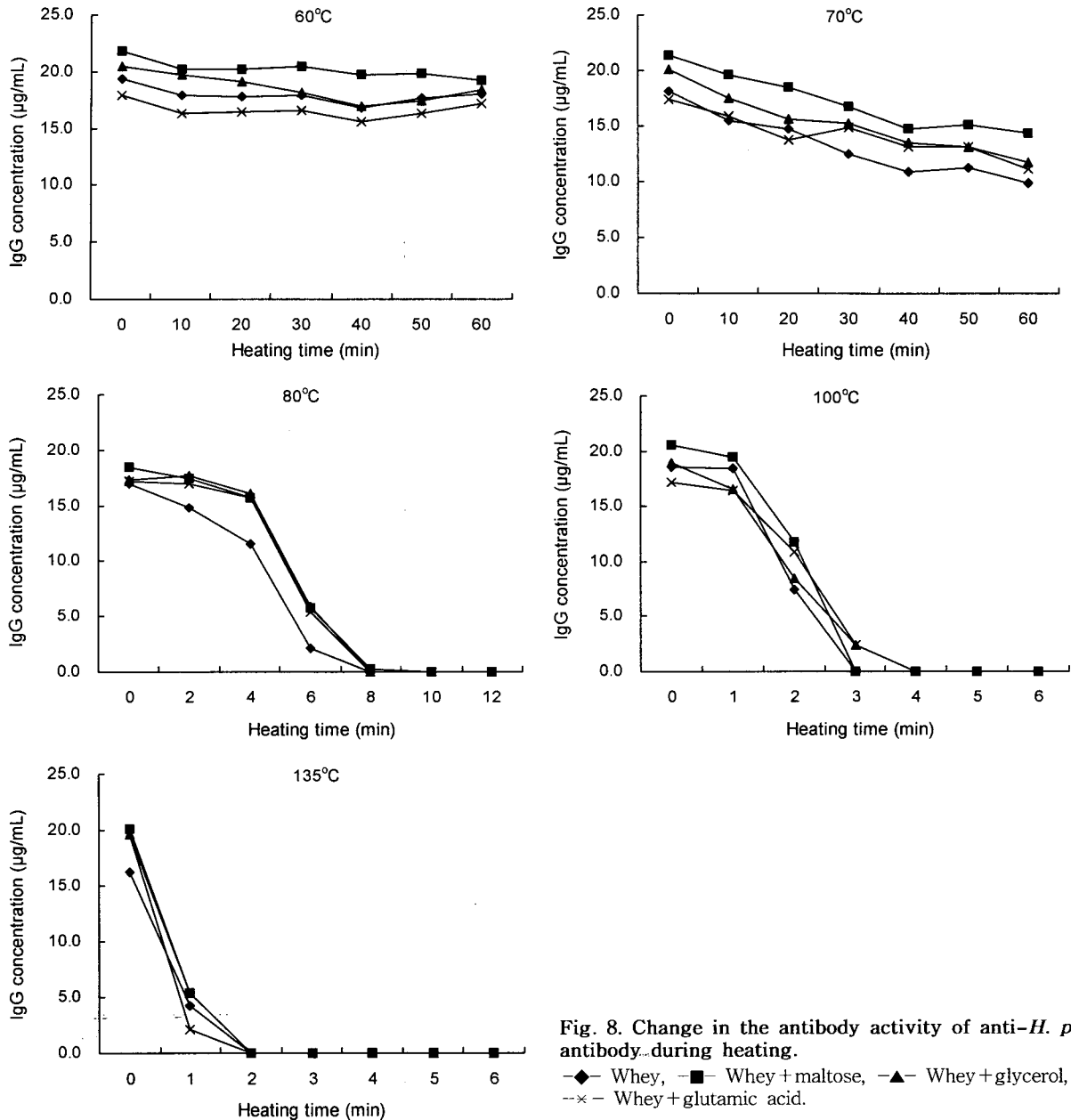


Fig. 8. Change in the antibody activity of anti-*H. pylori* antibody during heating.

—◆— Whey, —■— Whey + maltose, —▲— Whey + glycerol, —×— Whey + glutamic acid.

*pylori*균 응집력, 항체의 산과 알칼리 및 열에 대한 안정성에 대해 조사하였다. Anti-*H. pylori* 항체의 SDS-PAGE에 의한 분자량측정 결과 heavy chain은 50 kDa 정도, light chain은 24 kDa 정도로 확인되었다. *H. pylori* 항원 단백질의 분자량을 측정된 결과 12개의 band가 확인되었고, anti-*H. pylori*의 항원 특이성을 알아보기 위해 western blotting을 한 결과 혈청, 혈청정제, 유청, 유청정제 모두 7개의 항원성 물질을 확인할 수 있었다. 그리고 주 항원성 물질은 분자량이 97, 66, 34 kDa이었다. 유청내 anti-*H. pylori* 특이항체의 항균작용에 대해 알아보기 위해 실시한 균응집 반응결과 *H. pylori* 균에 대해 1/10의 높은 응집가를 나타내었다. 우유 및 유제품 생산시 발생할 수 있는 산·알칼리 및 열에 대한

anti-*H. pylori* 항체의 안정성 실험결과 pH 5~10 범위에서 안정한 상태로 100%의 활성을 나타내었다. Anti-*H. pylori* 항체의 열에 대한 안정성 실험에서는 60°C에서 60분간 안정한 상태를 보였고, 70°C에서도 비교적 안정한 상태였으나 60분 경과 후 40%정도 활성이 감소하였다. 80°C에서는 4분간 처리했을 때 77%의 활성을 유지하였고, 100°C에서도 1분간은 비교적 안정한 상태였다.

감사의 글

이 연구는 농림부 시행 농림기술관리센터 지원에 의하여 수행된 농림기술개발 연구과제의 연구결과의 일부로서 이

에 감사드립니다.

문 헌

1. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 323: 1311-1315.
2. Warren JR, Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 321: 1273-1275.
3. Hunt RH. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* 100(5A): 42S-50S.
4. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Cortesy-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. 1999. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 116: 804-812.
5. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ. 2000. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine* 19: 601-612.
6. Kim BJ, Kang JH, Kim TY, Kim TH, Kim KW. 1997. Production and characterization of IgY specific to *Helicobacter pylori*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 612-616.
7. Mysore JV, Wigginton T, Simon PM, Zopf D, Heman-Ackam LM, Dubois A. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in Rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* 117: 1316-1325.
8. Simon PM, Goode PL, Mobasser A, Zopf D. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* vinding to gastrointestinal infect. *Immun* 65: 750-757.
9. Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1788-1791.
10. Mobley HL, Jarvis KG, Elwood JP. 1993. Osogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol Microbiol* 10: 143-155.
11. Roe IH, Nam SW, Yang MR, Myung NH, Kim JT, Shim JY. 2002. The promising effect of egg yolk antibody (immunoglobulin yolk) on the treatment of *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *Kor J Gastroenterology* 39: 260-268.
12. Early EM, Hady H. 2001. Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Appl Microbiol* 90: 741-748.
13. Brussow H, Hildert H. 1987. Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile *Rotavirus gastroenteritis*. *J Clin Microbiol* 25: 982-986.
14. Lee KA. 1996. Studies on the stability of Hen's egg yolk immunoglobulins. *Kor J Soc Food Sci* 12: 54-59.
15. 김현욱. 1998. 낙농화학. 선진문화사, 서울. p 84-85, 99-106.
16. 김태규, 박수정, 서영훈, 신동건, 엄현석, 이정립, 정낙균, 정대철, 정태준, 진종류, 한치화. 2002. 면역생물학. 제5판. 라이프사이언스, 서울. p 96-98.
17. Shin NR, Kim JM, Yoo HS. 2001. Control of swine respiratory disease using egg yolk antibodies III. Immunoprophylactic effect of IgY in mouse model. *Kor J Vet Res* 41: 351-356.
18. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP. 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
19. Chen CC, Tu YY, Chang HH. 2000. Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G (IgG) and the effect of added thermal protectants on the stability. *J Food Sci* 65: 188-193.
20. 김우호. 1993. 면역에 의한 생체방어와 생명유지의 기구. 강원대학교출판부, 춘천. p 50-60.
21. Morales FJ, Romero C, Jimenez-Perez S. 2000. Characterization of industrial processed milky analysis of heat-induced change. *Int J Food Sci Technol* 35: 193-200.

(2004년 9월 16일 접수; 2005년 3월 28일 채택)