

<원 저>

난백 유래 라이소자임의 마우스 살모넬라증에 대한 항균 및 치료 효과

김희규^{1,†} · 황재승^{2,†} · 제우영^{2,†} · 손송이³ · 이후장^{3,*}

¹의령고등학교, ²진주고등학교, ³경상대학교 수의과대학

(접수: 2016년 4월 1일, 수정: 2016년 5월 11일, 게재승인: 2016년 5월 17일)

Evaluation of antibacterial and therapeutic effects of egg-white lysozyme against *Salmonella* Typhimurium in ICR mice infected with *Salmonella* Typhimurium

Hee-Gyu Kim^{1,†}, Jae-Seung Hwang^{2,†}, Woo-Young Jae^{2,†}, Song-Ee Son³, Hu-Jang Lee^{3,*}

¹Uiryeong High School, Uiryeong 52146, Korea

²Jinju High School, Jinju 52747, Korea

³College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

(Received: April 1, 2016; Revised: May 11, 2016; Accepted: May 17, 2016)

Abstract : Salmonellosis is a major bacterial zoonosis that causes self-limited enteritis in animals and foodborne disease and typhoid fever in humans. Recently, multi-drug-resistant strains of *Salmonella* spp. have increased and caused more serious problems in public health. The present study investigated the antibacterial effects of egg-white lysozyme (EWL) against *Salmonella* (*S.*) Typhimurium and the therapeutic effects of EWL for murine salmonellosis. Evaluation of the antibacterial effects of EWL against *S.* Typhimurium revealed a minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of EWL of 6.25 and 300 µg/mL, respectively. In the bacterial growth inhibition test, EWL at 300 ($p < 0.05$) and 600 µg/mL ($p < 0.01$) significantly inhibited the growth of *S.* Typhimurium at 4 h post-incubation. EWL administration at MIC (LYS-1), MBC (LYS-2) and 2× MBC (LYS-3) for 14 days resulted in mortality of mice infected with *S.* Typhimurium of 70, 40 and 10%, respectively, while that of control mice (CON) was 90%. Counts of *S.* Typhimurium in murine spleens were significantly lower in LYS-2 and LYS-3 than CON ($p < 0.05$). The results of this study indicate that EWL has the potential for treatment of ICR mice infected with *S.* Typhimurium.

Keywords : ICR mouse, egg-white lysozyme, salmonellosis, therapeutic effect

서 론

살모넬라 감염증은 가장 일반적이며 광범위하게 분포하는 식중독 중의 하나로서, 공중보건학적으로 매우 중요한 질병이다. 현재, 많은 나라에서 살모넬라 감염증으로 인해 천문학적 비용을 지출하고 있다 [35]. 전 세계적으로, 매년 9천 명 이상의 살모넬라 감염 환자가 발생하고 있으며, 이 중 15만 명 이상의 사망자가 발생하고 있다 [16]. 미국의 경우, 매년 백만 명이 비장티푸스성 살모넬라 감염증에 걸려 35만 명이 병원에 입원하고, 이 중에 약 400여 명이 사망하는 것으로 보고되고 있다 [30, 33]. 우리나라의 경우, 식품의약품안전처 식중독 통계에 따르면 [15], 2011~2015년 동안 살모

넬라 감염증은 83건 발생, 환자는 3,520명으로 국내 세균성 식중독 중 병원성 대장균 다음으로 발생빈도가 매우 높다.

사람의 살모넬라 감염은 오염된 육류, 계란, 우유 등과 같은 식품의 섭취와 살모넬라에 감염된 동물과의 직접적인 접촉을 통해 이루어진다 [4, 25]. 도축장에서 식육의 살모넬라 오염은 가축의 배설물에 접촉한 작업자와 작업 도구를 통해 발생하며, 식육에 오염된 살모넬라균은 식육을 슈퍼마켓에 진열할 때까지 생존할 수 있다 [26, 32].

살모넬라 감염증의 원인체인 *Salmonella* spp.는 그람 음성 간균으로, 숙주 영역이 사람과 동물에 걸쳐서 매우 넓고, 2,000여 종 이상의 다양한 혈청형을 갖고 있다 [20]. 또한, *Salmonella* spp.는 숙주세포 내로 침입하여 기생하면서 질병

*Corresponding author

Tel: +82-55-772-2352, Fax: +82-55-772-2308

E-mail: hujang@gnu.ac.kr

[†]The first three authors contributed equally to this work.

을 일으키므로 항생제를 이용한 치료가 매우 어려우며, 이로 인해 다량의 항생제를 사용함에 따라 항생제 내성균의 출현 역시 증가하고 있다 [20, 23].

최근에는 살모넬라균과 같은 병원성 식중독균에 의한 질병치료를 목적으로 많은 항생제가 인체에 사용되고, 병원성 세균의 예방 및 치료를 목적으로 과량의 항생제가 가축에도 사용됨에 따라 항생제 내성균의 출현이 빈번해지고 있어서 공중보건상에 중요한 문제로 대두하고 있다 [1].

일본의 경우, 1992~2012년 동안 동경의 슈퍼마켓에서 수거한 닭고기로부터 477종의 살모넬라균이 분리되었고 이 중 81.1%가 항생제 다제내성균이었다고 보고하였다 [19]. 우리나라의 경우, 5개의 육계 브랜드 업체에서 수거한 100마리의 육계 도체 중 45마리에서 살모넬라균이 분리되었고 이 중 29%가 5개 이상의 항생제에 대해 다제내성을 나타내었다고 보고하였다 [10].

오늘날 전 세계적으로 항생제 내성균의 출현 및 식품 내 잔류에 따른 공중보건학적 위해를 감소시키기 위해 기존의 항생제를 대체하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 식물 추출물 [5, 22], 생균제 [7, 11], 식물성 정유 [28] 등에서 항균 활성 물질을 탐색하기 위한 연구가 활발히 진행되었으며, 세포 내 절대 기생 세균의 에너지대사에 관여하는 효소의 활성을 저해하는 물질 [23, 29]을 이용한 항생제 대체 물질의 개발에 대한 연구도 진행된 바 있다.

Lysozyme은 계란과 우유와 같은 동물성 식품에서 세균의 증식을 억제하는 데 있어서 중요한 역할을 담당하는 효소로 알려져 있다 [18]. 앞선 연구를 통해 [6], 난백 유래 lysozyme(egg-white lysozyme [EWL])은 세균의 세포벽을 구성하고 있는 점액 다당류의 2합체인 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine의 β -1,4-linkage를 가수분해시켜 용균작용을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 작용기전을 통해 그람음성 및 그람양성균에 대해 항균효과를 갖는 것으로 보고되었다 [24].

본 연구에서는 살모넬라균과 같은 식중독 유발세균에 대해 항균 활성이 있는 것으로 알려진 EWL을 이용하여, *Salmonella*(*S.*) serovar Typhimurium에 대한 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration [MIC]), 최소살균농도 (minimum bactericidal concentration [MBC]), 증식억제 효과 그리고 살모넬라 감염 마우스에 대한 치료 효과 등을 평가하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에서 사용된 EWL(순도, 99.5%)은 케이씨에니헬(대한민국)에서 제공받아 사용하였다. 1.0 g의 EWL을 정량하여 증류수에 용해해서, 1 g/mL의 용액을 만들어 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용할 때마다 증류수로 희석하여 적정 농도로 만들어 사용하였다.

사용 균주 및 배양

본 실험에 사용한 *S. serovar Typhimurium*(ATCC 14028)은 경상대학교 수의과대학(진주)에서 보관하고 있던 균주를 사용하였다.

-80°C에서 보관 중인 *S. Typhimurium*을 해동시킨 후, Luria-Bertani(LB) agar(Difco Laboratories, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 2회 계대 배양한 후, 이를 다시 5 mL의 LB broth(Difco Laboratories)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 0.1 M phosphate buffer solution (PBS; pH 7.2)을 가하여 집락을 부유시킨 다음, 1,000 × g에서 10분간 원심분리했다. 원심분리 후, 균주 현탁액을 단계 희석하여 실험에 사용하였다.

MIC와 MBC 측정

각 균주에 대한 EWL의 MIC와 MBC를 액체배지 희석법 [2]을 이용하여 측정하였다. MIC의 측정은 96-well plate의 각 well에 LB broth를 이용하여 10^8 colony forming unit (CFU)/mL로 조정된 균주액 100 μ L를 넣고, 1개의 column을 제외하고, 2단계씩 희석한 농도(50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ g/mL)의 EWL 용액을 50 μ L 첨가한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, EWL 용액을 첨가하지 않은 균 배양액과 EWL 용액을 첨가한 균 배양액을 비교하여 최초로 균의 증식이 억제된 농도를 MIC로 하였다.

MBC의 측정은 96-well plate의 각 well에 LB broth를 이용하여 10^8 CFU/mL로 조정된 균주액 100 μ L를 넣고, 앞서 확인된 MIC 이상의 농도로 EWL 용액(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/mL)을 조제하여 50 μ L를 첨가한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 균의 사멸여부를 확인하기 위하여 각 well에 있는 배양액 50 μ L를 MacConkey agar(한일코메드, 대한민국)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후에 균이 완전히 사멸된 최소농도를 MBC로 하였다.

*S. Typhimurium*의 증식억제 효과

EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과를 알아보기 위하여 125 mL 삼각 플라스크에 30 mL LB broth, 10^6 CFU/mL로 조정된 균주 희석액 0.1 mL, 그리고 EWL을 각각 MIC, MBC, 2× MBC 농도로 첨가하여, 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 0, 4, 8, 16, 24시간에 각각 균수를 측정하였다. 균수 측정은 배양 시간별로 각각 1 mL의 배양액을 취하여 생리식염수로 10배수 단계 희석한 후, 0.1 mL씩 3개의 LB agar 평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 다음 균수를 측정하여 얻은 평균치를 log CFU/mL로 나타내었다.

실험동물

6주령의 specific pathogen free(SPF) ICR 마우스 수컷 40마리(체중, 29.3 ± 1.21 g)를 구매하여(샘타코바이오키리아, 대한민국) SPF 마우스임을 확인하기 위한 미생물학적 검사

를 하여 특정 병원체가 없는 것을 확인한 후 실험에 사용하였다. 마우스는 대조군과 실험군 각각 10마리씩 임의로 선택하여 cage에 분리하여, 1주일간의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. SPF 상태를 유지하기 위해 음수, 사료, 깔짚 등은 모두 고압멸균 후 사용했고 사육온도와 습도는 각각 $22 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 와 $50 \pm 10\%$ 로 하였으며, 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 또한, 환기가 자동으로 조절되는 실험동물 사육장치(쓰리샤인, 대한민국)에서 사육하였다.

마우스 접종 및 약제 투여

마우스를 이용한 모든 실험절차는 경상대학교의 동물윤리 협의회 승인을 받아 본 위원회의 규정에 따라 실험을 수행하였다(GNU-LA-2015-85).

대조군과 실험군 모두 2×10^5 CFU/mL *S. Typhimurium* 0.1 mL를 마우스 복강에 주입하여 감염시켰다. *S. Typhimurium*을 마우스에 감염시킨 후, 실험 기간 동안 대조군(CON)에는 0.1 mL의 생리식염수를 매일 강제 경구투여하였고, 실험군에는 각각 EWL의 MIC(EWL 6.25 µg/mL; LYS-1), MBC(EWL 300 µg/mL; LYS-2), $2 \times$ MBC(EWL 600 µg/mL; LYS-3) 농도의 용액 0.1 mL를 매일 강제 경구투여하였다. 음용수와 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고 14일 동안 매일 마우스의 생존율을 관찰하여 기록하였다.

마우스 비장 중 *S. Typhimurium* 균수 확인

실험 종료 시점에 생존한 모든 마우스를 경추 탈골해서 안락사시킨 후, 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 조직균질기(Tissue-Tearor; Biospec, USA)를 이용하여 균질화한 다음, 균질화된 비장조직 0.5 g에 멸균 생리식염수 5 mL를 넣어 현탁 시켰다. 현탁액을 멸균 생리식염수로 2배 희석한 다음, 희석액 100 µL를 LB agar에 도포하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하여 CFU/mL로 나타내었다. 모든 비장조직에 대해 위의 과정을 3번 반복 수행하였다.

통계학적 분석

결과에 대한 통계적 처리는 Sigma plot(Systat Software, USA)을 이용하여 student's *t* test로 실시하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

난백 유래 lysozyme의 항균효과

EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 항균효과를 조사하기 위하여 액체배지 희석법을 이용하여 MIC와 MBC를 측정

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of egg-white lysozyme against *Salmonella Typhimurium*

Bacteria	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	6.25	300

결과를 Table 1에 나타내었다. EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 MIC와 MBC는 각각 6.25와 300 µg/mL로 나타났으며 EWL의 MBC가 MIC보다 매우 높게 나타났다.

*S. Typhimurium*의 증식억제 효과

Figure 1은 EWL의 여러 농도(6.25, 300, 600 µg/mL)에서 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과를 나타낸 것이다. EWL을 첨가하지 않은 대조군의 경우에는 배양 후 8시간까지 증가하고 이후에는 24시간까지 비슷한 균수를 유지하였다. EWL을 MIC(6.25 µg/mL)로 첨가한 실험군의 경우 배양 후 16시간과 24시간에 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$). EWL을 MBC(300 µg/mL)로 첨가한 실험군의 경우, 배양 기간 동안 무첨가 대조군과 비교하여 균의 증식이 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었다(4시간, $p < 0.05$; 8시간, 16시간, $p < 0.01$; 24시간, $p < 0.001$). EWL을 $2 \times$ MBC(600 µg/mL)로 첨가한 실험군의 경우에도 MBC로 첨가한 경우와 같이 배양 기간 동안 무첨가 대조군과 비교하여 균의 증식이 유의성 있게 감소하였다(4시간, $p < 0.01$; 8시간, 16시간, 24시간, $p < 0.001$).

S. Typhimurium 감염 마우스의 생존율

Figure 2는 *S. Typhimurium*을 공격 접종한 마우스에 EWL을 경구로 강제 급여한 후 경시 별로 마우스의 생존율을 관찰한 결과를 나타낸 것이다. CON의 경우에는 감염 후 5일째부터 마우스의 폐사가 나타나기 시작하여 10일째 1마리만 생존하였으나, LYS-1에서는 감염 후 6일째부터 폐사가 발생하여 실험종료 시까지 3마리가 생존하였다. 한편, LYS-2에서는 감염 후 6일째부터 폐사가 발생하여 실험종료 시

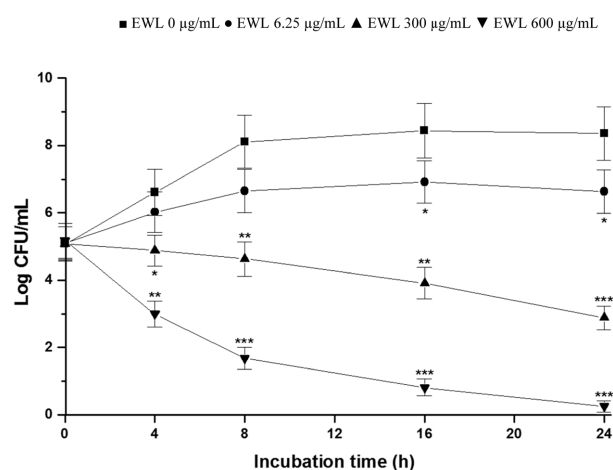


Fig. 1. Growth inhibitory effect of egg-white lysozyme (EWL) against *Salmonella (S.) Typhimurium*. The bacteria were incubated with different concentrations of EWL for 24 h. Bacterial viability was measured based on colony forming units (CFUs) on culture plates for three independent experiments on 0, 4, 8, 16 and 24 h post-incubation. Significant difference compared with the untreated control ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$).

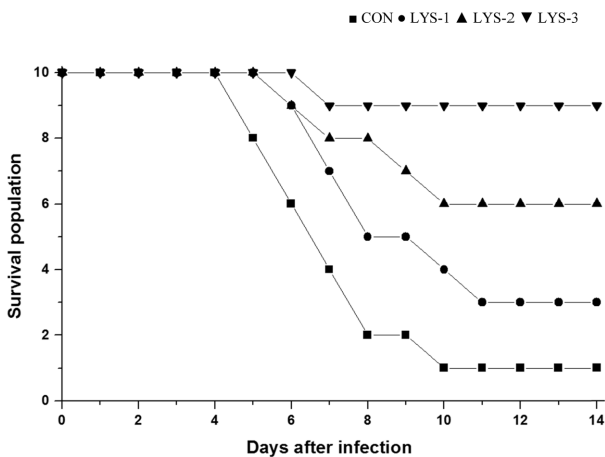


Fig. 2. Therapeutic effect of EWL on ICR mice infected with *S. Typhimurium*. Mortality was observed daily for 14 days post-infection. CON, control orally treated with saline (n = 10); LYS-1, orally treated with EWL 6.25 µg/mL (n = 10); LYS-2, treated with EWL 300 µg/mL (n = 10); LYS-3, treated with EWL 600 µg/mL (n = 10).

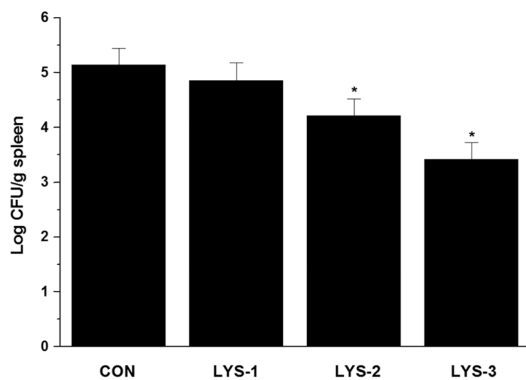


Fig. 3. The counts of *S. Typhimurium* in spleens of mice treated with EWL on 14 days post-treatment. * $p < 0.05$, significant difference compared to control.

지 6마리가 생존하였으며, LYS-3에서는 감염 후 7일째부터 폐사가 발생하여 실험종료 시까지 9마리가 생존하여 90%의 높은 생존율을 나타내었다.

마우스 비장 중 *S. Typhimurium* 균수

Figure 3은 실험 최종일에 마우스의 비장을 적출하여, 비장 내 *S. Typhimurium* 균수를 측정된 결과를 나타낸 것이다. LYS-1의 경우에는 비장 내 *S. Typhimurium*의 균수가 다소 감소하였으나, CON과 비교하여 통계적으로 유의성이 없었다. 그러나 LYS-2와 LYS-3의 경우에는 CON과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 비장 내 *S. Typhimurium*의 균수가 감소하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

고 찰

Lysozyme은 분자량이 약 14.4 kDa인 구형의 열기성 단백질

질로서 일반적으로 자연계에서 널리 분포하는 용균성 효소이다. 계란의 총 난백 단백질 중에는 3.5%의 lysozyme이 함유되어 있어서 lysozyme을 쉽게 이용할 수 있는 공급원으로 알려져 있다 [8]. Lysozyme은 정균 및 살균효과를 갖고 있어서 인의 및 수의 약제뿐만 아니라 다양한 종류의 식품에서 보존제로 사용되고 있다 [9].

EWL의 그람양성균에 대한 항균 활성은 가수분해를 통해 이루어지는 것으로 밝혀져 있으며 *S. Typhimurium*과 같은 그람음성균인 *E. coli*에 대한 항균 활성은 *E. coli*의 세포 외벽에 구멍을 내어 투과성을 증가시켜 사멸시키는 것으로 보고되었다 [13].

본 연구에서 EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 MIC와 MBC가 모두 300 µg/mL 이하로 나타나서 *S. Typhimurium*에 대한 EWL의 항균 활성이 뛰어난 것으로 확인되었다. 다만, EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 MBC가 MIC에 비해 높은 농도를 나타낸 것은 *S. Typhimurium*이 peptidoglycan을 합성하여 EWL의 가수분해 작용에 저항성을 나타내었기 때문인 것으로 보인다 [9, 12].

앞선 연구에서 lysozyme HCl을 이용해 식중독 유발 병원성 세균에 대한 항균효과를 확인한 결과, lysozyme HCl의 *S. Typhimurium*에 대한 MIC가 500 mg/mL 이상이었다고 보고하였다 [17]. 또한, 한우와 젖소의 초유로부터 분리한 lactoferrin의 *S. Typhimurium*에 대한 항균효과를 확인한 연구에서 lactoferrin의 MIC가 각각 0.3과 18 mg/mL이었다고 보고하였다 [36]. 한편, 식물유래 천연물을 이용한 *S. Typhimurium*에 대한 항균 활성에 대한 연구에서 오레가노 오일의 주요 항균 성분인 carvacrol의 *S. Typhimurium*에 대한 MIC와 MBC는 모두 250 µg/mL이었다고 보고하였다 [21]. 위의 선행연구 결과로부터, 본 연구에서 사용한 EWL은 화학적으로 합성한 lysozyme과 소 초유 유래 lactoferrin과 비교하여 *S. Typhimurium*에 대한 MIC와 MBC가 모두 낮게 나타나 항균활성이 높았던 반면에, carvacrol과 비교해서는 *S. Typhimurium*에 대한 MIC는 낮았으나 MBC는 높게 나타났다.

본 연구에서 EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과를 24시간 동안 배양하면서 확인한 결과, 6.25 µg/mL의 EWL을 첨가한 경우에 배양 후 16시간부터 무첨가 대조군보다 통계적으로 유의성 있게 감소하는 결과를 보여 EWL의 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과가 매우 뛰어난 것을 확인하였다. 앞선 연구에서는 250 MPa의 압력 아래에서 *S. Typhimurium*에 EWL을 100 µg/mL 첨가하고 24시간 동안 배양한 실험에서 EWL을 첨가한 *S. Typhimurium*이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다고 보고하였다($p < 0.05$) [24]. 한편, 사람 태반 유래 lysozyme의 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과를 확인한 연구에서는 lysozyme을 500 µg/mL 농도로 *S. Typhimurium* 배양매지에 첨가하고 24시간 동안 배양하였으나 대조군과 lysozyme 첨가군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고하였다 [14]. Lysozyme의 기원과 *S. Typhimurium*의 처리 조건 등

을 고려한다고 하여도 본 연구에서 사용한 EWL이 앞선 연구에서 사용된 lysozyme에 비해 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 효과가 매우 높은 것으로 생각된다. 이러한 결과는 EWL이 사람 태반 유래 lysozyme보다 *S. Typhimurium*에 대해 항균 활성이 높으며 가금의 품종에 따라 항균 활성의 차이가 존재하는 것으로 추정된다.

본 연구에서 마우스의 살모넬라증에 대한 EWL의 치료 효과를 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, EWL을 300 µg/mL 이상 투여한 군에서 *S. Typhimurium* 감염 14일 후에 60% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 앞선 연구에서 젓소 유래 lactoferrin(10 mg/mL)을 *S. Typhimurium*에 감염시키기 전 2시간 그리고 감염시킨 후 매일 7일 동안 0.2 mL씩 경구로 투여한 결과, 감염 후 7일째에 생존율이 96.6%(1마리/29마리)였다고 보고하였다 [27]. 다른 선행연구에서는 *S. Typhimurium*을 감염시킨 마우스에 항생제 aceftriaxone을 1일 3회 피하에 1 mg/kg body weight(BW) 농도로 투여한 결과, 감염 후 12일째에 60% 생존율을 보였다고 보고하였다 [3]. 투여 농도와 횟수를 고려할 경우 본 연구의 LYS-3의 *S. Typhimurium* 감염 마우스에 대한 치료 효과는 선행연구에서 사용한 lactoferrin과 aceftriaxone보다 우수한 것으로 생각된다.

본 연구에서 *S. Typhimurium*를 마우스에 감염시킨 다음 14일 후에 마우스의 비장에서 *S. Typhimurium*의 생존 수를 확인한 결과, EWL을 300 µg/mL 이상 투여한 군에서 대조군보다 통계적으로 유의성 있게 감소하여 높은 항균 활성을 나타내었다. 선행연구에서 *S. Typhimurium*에 감염시킨 ICR 마우스에 울금의 주요 항균 성분인 curcumin을 100과 150 mg/mL BW의 농도로 5일 동안 경구투여한 결과, 비장 내 *S. Typhimurium*의 균수가 대조군보다 로그 값으로 각각 1.1과 2.5 감소하였다고 보고하였다 [31]. 다른 선행연구에서는 *S. Typhimurium*을 감염시킨 마우스에 nisin을 25와 50 mg/kg BW 농도로 12시간 간격으로 4회 피하 주사한 결과, 비장 내 *S. Typhimurium*의 균수가 대조군보다 로그 값으로 각각 0.1과 0.3 정도 감소하였다고 보고하였다 [34]. 투여 농도와 횟수를 고려할 경우 본 연구의 LYS-2와 LYS-3는 연구 기간 동안 마우스 한 마리당 각각 0.42와 0.84 mg의 EWL을 투여하여 선행연구에서 사용한 curcumin과 nisin보다 마우스의 비장 내 *S. Typhimurium*의 감소 효과가 높은 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 EWL은 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제 및 항균 활성이 뛰어나며 마우스의 살모넬라증의 치료 효과도 우수한 것으로 평가되었다. 따라서 난백 유래 lysozyme은 식품 내 *S. Typhimurium*의 증식억제를 위한 식품보존제, 가축의 살모넬라증 예방 및 치료제로 유용할 것으로 생각된다.

References

1. **Andremont A, Fleck F.** What to do about resistant bacteria in the food-chain? *Bull World Health Organ* 2015, **93**, 217-218.
2. **Andrews JM.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001, **48** (Suppl 1), 5-16.
3. **Anton PA, Kemp JA, Butler T, Jacobs MR.** Comparative efficacies of ceftriaxone, moxalactam, and ampicillin in experimental *Salmonella typhimurium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1982, **22**, 312-315.
4. **Bagcigil AF, Ikiz S, Dokuzeylu B, Basaran B, Or E, Ozgur NY.** Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs. *J Vet Med Sci* 2007, **69**, 775-777.
5. **Bartfay WJ, Bartfay E, Johnson JG.** Gram-negative and Gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of willow herb (*Epilobium angustifolium*). *Biol Res Nurs* 2012, **14**, 85-89.
6. **Berger LR, Weiser RS.** The β -glucosaminidase activity of egg-white lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 1957, **26**, 517-521.
7. **Bravo MV, Bunout D, Leiva L, de la Maza MP, Barrera G, de la Maza J, Hirsch S.** Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* on prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult outpatients with amoxicillin treatment. *Rev Med Chil* 2008, **136**, 981-988.
8. **Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas MV.** Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *J Food Prot* 2014, **77**, 1732-1739.
9. **Cegielska-Radziejewska R, Leńnierowski G, Kijowski J.** Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations – a review. *Pol J Food Nutr Sci* 2008, **58**, 5-10.
10. **Choi D, Chon JW, Kim HS, Kim DH, Lim JS, Yim JH, Seo KH.** Incidence, antimicrobial resistance, and molecular characteristics of nontyphoidal *Salmonella* including extended-spectrum β -lactamase producers in retail chicken meat. *J Food Prot* 2015, **78**, 1932-1937.
11. **Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y.** The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab* 2009, **10**, 68-78.
12. **Cooper S, Hsieh ML, Guenther B.** Mode of peptidoglycan synthesis in *Salmonella typhimurium*: single-strand insertion. *J Bacteriol* 1988, **170**, 3509-3512.
13. **Derde M, Lechevalier V, Guérin-Dubiard C, Cochet MF, Jan S, Baron F, Gautier M, Vié V, Nau F.** Hen egg white lysozyme permeabilizes *Escherichia coli* outer and inner membranes. *J Agric Food Chem* 2013, **61**, 9922-9929.
14. **Ellison RT 3rd, Giehl TJ.** Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 1991, **88**, 1080-1091.
15. **Food Safety Information Portal.** Foodborne disease outbreaks by year and cause substance: 2011-2015. Ministry of Food and Drug Safety (KR), Cheongju, 2016.
16. **Gharieb RM, Tartor YH, Khedr MHE.** Non-typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut Pathog* 2015, **7**, 34.
17. **Gill AO, Holley RA.** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *Int J Food Microbiol* 2003, **80**, 251-259.
18. **Hughey VL, Johnson EA.** Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**, 2165-2170.

19. **Katoh R, Matsushita S, Shimojima Y, Ishitsuka R, Sadamasu K, Kai A.** Serovars and drug-resistance of *Salmonella* strains isolated from domestic chicken meat in Tokyo (1992-2012). *Kansenshogaku Zasshi* 2015, **89**, 46-52.
20. **Kim DH, Lee JJ, Lee JJ, Kim DG, Kim G, Lee HJ, Min W, Rhee MH, Chang HH, Kim S.** Antibacterial and intracellular clearance effect of *Saururus chinensis* Baill water extract against *Salmonella typhimurium*. *J Agric Life Sci* 2011, **44**, 111-119.
21. **Kim JM, Marshall MR, Cornell JA, Preston JF, Wei CI.** Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *J Food Sci* 1995, **60**, 1364-1368.
22. **Kim S, Fung DY.** Antibacterial effect of water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. *J Food Prot* 2004, **67**, 1953-1956.
23. **Lee YE, Cha CN, Park EK, Kim K, Lee HJ.** Evaluation of antibacterial and therapeutic effects of a sodium salts mixture against *Salmonella typhimurium* in murine salmonellosis. *J Food Hyg Saf* 2011, **26**, 222-226.
24. **Masschalck B, Van Houdt R, Van Haver EGR, Michiels CW.** Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**, 339-344.
25. **Meldrum RJ, Wilson IG.** *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. *J Food Prot* 2007, **70**, 1937-1939.
26. **Molla B, Alemayehu D, Salah W.** Sources and distribution of *Salmonella* serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personnel and retail meat products in Ethiopia: 1997-2002. *Ethiop J Health Dev* 2003, **17**, 63-70.
27. **Mosquito S, Ochoa TJ, Cok J, Cleary TG.** Effect of bovine lactoferrin in *Salmonella* ser. Typhimurium infection in mice. *Biometals* 2010, **23**, 515-521.
28. **Ozogul Y, Kuley E, Ucar Y, Ozogul F.** Antimicrobial impacts of essential oils on food borne-pathogens. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2015, **7**, 53-61.
29. **Patchanee P, Crenshaw TD, Bahnson PB.** Oral sodium chlorate, topical disinfection, and younger weaning age reduce *Salmonella enterica* shedding in pigs. *J Food Prot* 2007, **70**, 1798-1803.
30. **Cummings PL, Sorvillo F, Kuo T.** The burden of salmonellosis in the United States. In: Mahmoud BSM (ed.). *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. pp. 2-3. InTech, Rijeka, 2012.
31. **Rahayu SI, Nurdiana N, Santoso S.** The effect of curcumin and cotrimoxazole in *Salmonella Typhimurium* infection in vivo. *ISRN Microbiol* 2013, **2013**, 601076.
32. **Redmond EC, Griffith CJ.** Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *J Food Prot* 2003, **66**, 130-161.
33. **Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM.** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**, 7-15.
34. **Singh AP, Prabha V, Rishi P.** Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*. *PLoS One* 2013, **8**, e76844.
35. **Wu J, Hu Y, Du C, Piao J, Yang L, Yang X.** The effect of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic cows on *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection in mice. *Food Funct* 2016, **7**, 308-314.
36. **Yang HJ, Lee SW.** Antimicrobial activities of lactoferrin and its hydrolysate obtained from the colostrum of Hanwoo and Holstein cattle. *J Anim Sci Technol* 2006, **48**, 595-602.