

ANIMAL

Mitigating effect of dietary bromelain on inflammation at the injection site of food-and-mouth disease vaccine

Eun Young Ko^{1,2}, Hyun Kyu Jeong², Jung Ho Son³, Younghoon Kim⁴, Samooel Jung^{1*}

¹Division of Animal and Dairy Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Dodram Pig Farmers' Cooperative, Icheon 17405, Korea

³Noah Biotech Inc., Cheonan 31035, Korea

⁴Department of Animal Science and Institute of Milk Genomics, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

*Corresponding author: samooel@cnu.ac.kr

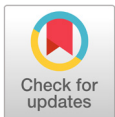
Abstract

The vaccination for foot-and-mouth disease (FMD) is an effective way to control FMD. However, the injection of FMD vaccine causes abnormalities in pork meat by the incidence of lesions at the injection site. This study was conducted to investigate the inhibition effects of dietary bromelain, a natural protease derived from pineapple stems, on the incidence of lesions at the vaccination site on pigs. A total of 335 pigs (LYD [Landrace × Yorkshire × Duroc]; 7-week-old) were randomly allotted to two dietary treatments: control (basic diet) and bromelain treatment (diet supplemented with bromelain 1 kg/ton). The injection of FMD vaccine was conducted on 56- and 84-day-old pigs. Pigs with the bromelain treatment were fed a diet supplemented with bromelain for 14 days from 5 days before the vaccine injection. After slaughtering the pigs, the number of carcasses that had abnormal meat at the injection site of the vaccine and the amount of abnormal meat, discarded meat, and trimmings were recorded. Pork from the bromelain treated pigs had a lower incidence of abnormal meat caused by vaccine injection as well as a lower amount of abnormal meat, discarded meat, and trimmings than those of the control ($p < 0.05$). Our result suggests that dietary bromelain could improve the quality of pork meat by inhibiting incidence of lesions at the vaccine injection site.

Keywords: abnormal meat, bromelain, disease vaccine, foot-and-mouth, inflammation

Introduction

구제역(foot-and-mouth disease)은 소, 돼지, 염소 등의 우제류에서 발생하는 전염성이 매우 강하고 감염 개체의 치사율이 매우 높은 제1종 바이러스성 법정전염병이다. 전 세계적으로 구제역은 가축에서 가장 크게 문제가 되는 질병으로 여겨지고 있으며, 구제역 발생 개체를 도살처분 함에 따라 축산업에서 많은 경제적 손실을 초래하고 있다(Hwang and Oh, 2014). 현재 구제역의 확실한 치료법은 개발



OPEN ACCESS

Citation: Ko EY, Jeong HK, Son JH, Kim Y, Jung S. 2018. Mitigating effect of dietary bromelain on inflammation at the injection site of food-and-mouth disease vaccine. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180080>

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180080>

Received: August 9, 2018

Revised: October 10, 2018

Accepted: October 16, 2018

Copyright: © 2018 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되지 않았으며, 국가적으로 구제역의 발생 및 전염을 예방하기 위해 노력하고 있다. 우리나라의 경우 2010/2011년 발생한 구제역으로 인해 국가적으로 큰 경제적 손실이 발생함에 따라 모든 우제류 가축에 구제역 백신을 접종하여 구제역 발생 예방을 도모하고 있다(Hwang and Oh, 2014).

구제역 백신 접종을 통한 구제역 발병 예방 효과는 분명하나 구제역 백신 접종의 부작용 또한 보고되고 있다. 기존 연구에 따르면 구제역 백신 접종 후 가축의 생산성 및 번식 효율이 감소함이 보고되었으며, 구제역 백신 접종 부위에서 농양, 섬유화 및 육아종 등의 병변이 발생함이 보고되고 있다(Valtulini et al., 2005; Gerlach et al., 2012; Jo et al., 2014; Van den Broeke et al., 2016). 가축에 구제역 백신 접종 시 목 부분인 이근부에 하도록 권고되고 있음에 따라 돼지의 경우 이근부에 구제역 백신 접종 후 목심 부위에서 농양, 섬유화 및 육아종 등의 병변이 발생되고 있는 실정이다. 우리 나라의 경우 식육의 소비 문화가 주로 구이 문화임에 따라 구이용으로 적합한 목심의 경우 삼겹살과 함께 소비자 선호도가 높아 돈육의 다른 부위와 비교하여 판매 가격이 높은 부위이다. 하지만 목심 부위에 병변의 발생 시 도체의 부위별 정형 과정에서 병변 발생 부위를 정형하여 폐기함에 따라 큰 경제적 손실이 발생되고 있다. 따라서 구제역 백신 접종 부위에서 농양, 섬유화 및 육아종 등의 병변 발생을 억제할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

Bromelain은 파인애플(*Ananas comosus*) 줄기의 여러 부분에서 파생된 단백질 분해 효소의 자연혼합물로 항염증, 항혈전 및 섬유소 용해, 항암작용 및 면역조절효과 등이 있음이 보고됨에 따라 백신 제형(formulation), 항 종양 및 화상 치료제 등 주요 의약품으로 연구 및 이용되고 있다(Báez et al., 2007; Rathnavelu et al., 2016). Rathnavelu et al. (2016)은 bromelain은 잠재적으로 세포의 스트레스에 대한 신속한 반응과 관련하여 건강한 면역계를 활성화한다고 보고 하였다. Bromelain은 면역 세포가 cytokine의 생산에 염증 유발 조건에서 이미 자극되었더라도 Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 분비를 감소 시키는 효과가 있음이 보고되었다(Onken et al., 2008). 따라서 bromelain은 대다수의 염증 매개체를 감소시키고 다양한 조건에서 항 염증 역할을 하는 것으로 나타났다(De-Giuli and Pirota, 1978). 또한, 식물성 단백질 분해 효소인 bromelain은 추가의 보조제(adjutant)없이 경구 투여 시 강력한 점막 면역을 생성한다(Hale et al., 2006). 이전 연구에서 부종을 유발시킨 쥐에게 bromelain (10 mg/kg weight)을 정맥 투여했을 시 그 크기가 유의적으로 감소되었음을 확인하였으며(Pirota and de Giuli-Morghen, 1978), 염증성 장 질환을 보인 쥐에게 bromelain을 5 mg/일 점차적으로 경구 투여 하였을 때 조직학적 중증도를 현저하게 감소시킨 것으로 나타났다(Hale et al., 2005).

따라서 본 연구는 돼지에서 bromelain의 사료 첨가 급여에 따른 구제역 백신 접종 부위의 화농 및 육아종과 같은 염증 병변 발생 감소 효과를 알아보기 위해 수행되었다.

Materials and Methods

동물 실험설계

본 연구를 위해 7주령된 이유 자돈 LYD (Landrace \times Yorkshire \times Duroc) 총 335두를 대조구(193 두, 기본 사료)와 실험구(142 두, bromelain 첨가 사료, 1 kg/ton) 두 그룹으로 나누었으며, 본 연구에 이용된 bromelain은 Challenge Bioproducts (Challenge Bioproducts Co., Ltd., Taiwan)사의 것을 구입하여 사용하였다. 각 그룹별 돼지를 두개의 펜스에 나누어 사육하였으며, 실험구의 경우 1(56일령) 및 2(84일령)차 구제역 백신 접종 5일 전부터 시작하여 총 14일 동안 bromelain 첨가 사료를 급여하였고, 그 외 기간에는 대조구와 동일한 사료를 급여하였으며, 사료 및 음수는 자유 채식하도록 하였다. 모든 그룹의 돼지는 8, 12주령에 오일 보조제의 불활성화 정제된 구제역 O, A 및 Asia 1 type (Aftopor[®], Merial Animal Health Ltd., Surrey, UK) 백신을 접종하였다. 백신접종은 일회용 주사기를 사용하여 우측 이근부에(2 mL/두) 접종하였으며, 돈방의 낮 평균 온도는 $26 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 였다. 돈군들은 Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural 관리 및 도드람

양돈협동조합 사육 안내서에 따라 관리되었다. 실험군과 대조군의 출하돈은 성장속도에 따라 3번에 걸쳐 출하되었으며, 출하 차량에 의해 도축장으로 수송되었다.

샘플 수집 및 육안 병변 확인

성장속도에 따라 3번 나눠서 출하된 돼지들의 도축 후, 가공장의 작업자들에 의해 우측백신접종 부위의 이상육 병변 상태를 관찰하였다. “심한 농양(Severe abscess)”, “섬유화(Fibrosis)”, “육아종(Granuloma)”은 Valtulini et al. (2005)의 기준에 의해 이상육 발생 두수로 체크하였다. “심한 농양”은 이근부 접종부위에서 발생하는 노란 계열 또는 흰색의 고름을 말하고, “육아종”은 근육 조직내에 돌출된 결절 형태이다(Fig. 1). 농양, 섬유화 및 육아종 등의 병변이 발생한 이상육(abnormal meat) 발생 비율(%)은 전체 출하 두수 대비 이상육 발생 두수로 계산하였다. 병변 발생으로 인해 이상육으로 분리 및 정형된 목심의 양을 기록하였으며, 이상육 중 폐기 처리된 양과 잡육 처리된 양을 각각 나누어 기록하였다.

통계분석

본 연구를 통해 사육된 돼지는 출하 체중을 고려하여 3번에 걸쳐 출하되었으며, 각 출하된 하나의 그룹을 반복으로 하여 이로부터 얻어진 결과값의 통계적 분석을 위해 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 t-test를 실시하여 분석 결과의 평균값 및 표준편차를 제시하였다. 통계 분석은 SAS 프로그램(version 9.3. SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다.

Results and Discussion

대조구의 목심 부위에서 농양, 섬유화 및 육아종 등의 병변 발생으로 인해 이상육(abnormal meat)이 발생한 도체의 비율은 대조구 및 bromelain 급여 처리구에서 각각 94.25% 및 26.85%로 나타나 대조구의 경우 대부분의 출하 도체에서 이상육이 발생한 반면 bromelain 첨가에 의해 이상육이 발생한 도체가 현저하게 감소함이 나타났다($p < 0.05$; Fig. 2). 대조구의 총 도체 중량은 17,268 kg이었으며 이상육으로 정형된 목심 중량은 422 kg으로 총 도체 중량 중 병변 발생으로 인한 이상육이 2.56% 수준임이 나타났다(Fig. 3). Bromelain 첨가구에서는 총 도체중량 16,867 kg 중 이상육으로 정형된 목심 중량은 80 kg으로 총 도체 중량 대비 0.48%의 이상육이 발생했음이 확인되었다. 돼지 도체의 정육 작업 중 이상육으로 분류된 목심의 경우 병변이 직접적으로 발생한 부위는 폐기되며, 그 외 부위는 잡육으로 분류하여 이용하고 있다. 본 연구에서 대조구의 경우

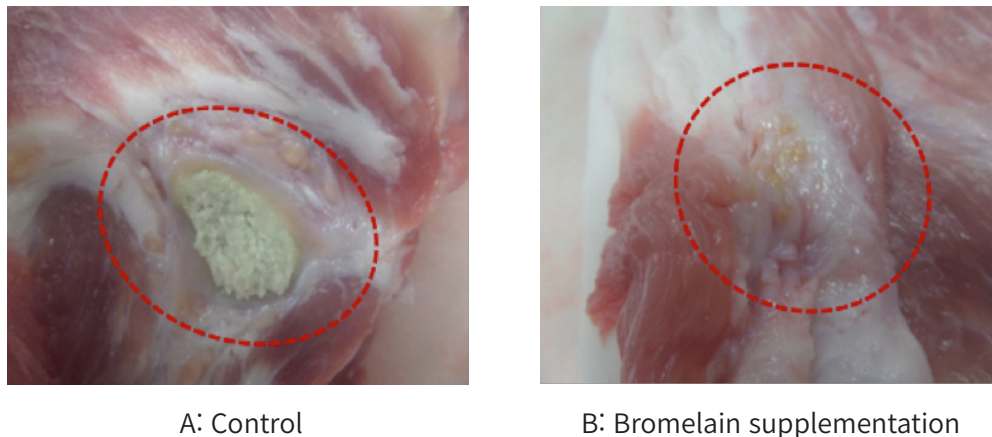


Fig. 1. Effects of supplemental bromelain on foot-and-mouth disease vaccination on injection site lesions. A: Control – No bromelain supplementation; B: Treatment –Supplemental bromelain were treated to the normal basic diet (1 kg /ton).

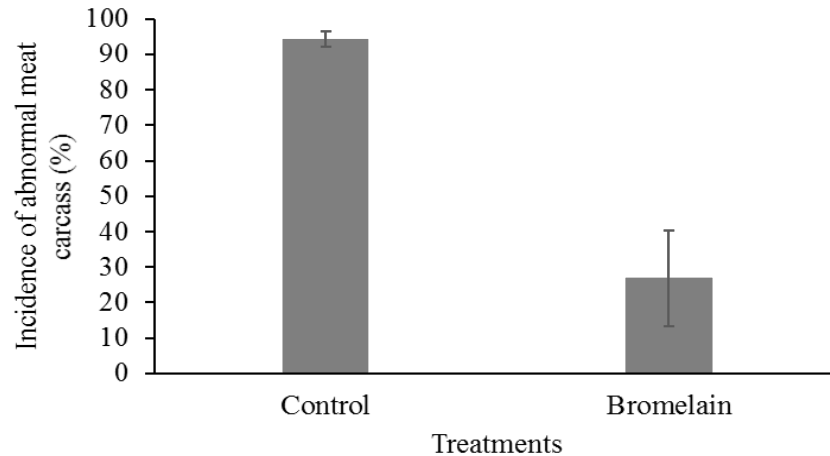


Fig. 2. The incidence of abnormal meat carcass caused by the foot-and-mouth disease vaccination. Values are means \pm standard deviation. A, B: Means with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

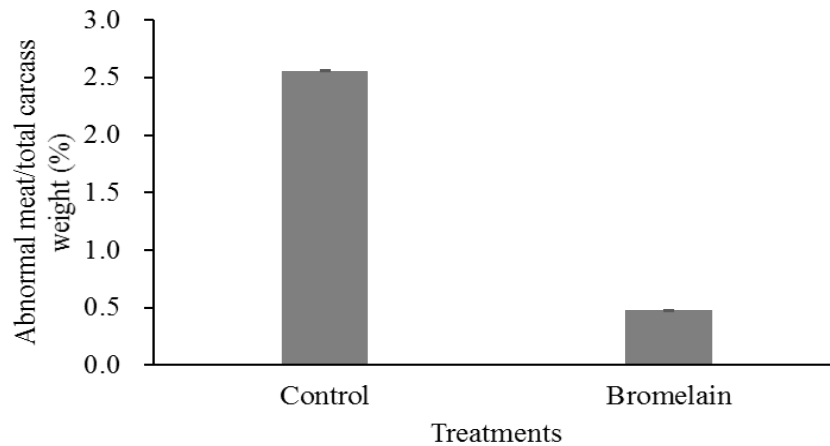


Fig. 3. The ratio of abnormal meat caused by the foot-and-mouth disease vaccination to total carcass weight. Values are means \pm standard deviation. A, B: Means with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

이상육 422 kg 중 폐기 또는 잡육 처리된 식육의 양은 각각 53.3 kg 및 388.7 kg으로 총 도체중 대비 0.31% 및 2.25%였다(Fig. 4). 하지만 실험구의 경우 이상육 80 kg 중 폐기 또는 잡육 처리된 식육의 양은 각각 9.6 kg 및 70.7 kg으로 총 도체중 대비 0.06%의 식육이 폐기되고 0.42%의 식육이 잡육으로 처리되어 대조구와 비교하여 이상육 발생으로 인한 손실량이 현저하게 감소됨이 확인되었다. 이상육 발생 부위에서 병변 발생 크기에 따라 폐기되는 돈육의 양이 영향을 받을 수 있다. 본 연구에서 bromelain 첨가구의 경우 육안상으로 병변의 크기가 대조구와 비교하여 작음이 나타났다(Fig. 1). 하지만 발생된 이상육 중 폐기된 돈육의 양을 비교한 결과 대조구와 bromelain 첨가구 사이에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이 결과를 보았을 때 bromelain의 첨가 급여가 이상육이 발생하는 개체의 수를 효과적으로 감소시켰지만 이상육이 발생한 개체에서는 bromelain이 병변 발생 억제에 큰 효과를 보이지 못한 것으로 사료된다.

오일 보조제/부형제(double oil adjuvant)가 함유된 구제역 백신을 돼지에 근육 접종한 뒤 접종 부위의 심각한 국소반응으

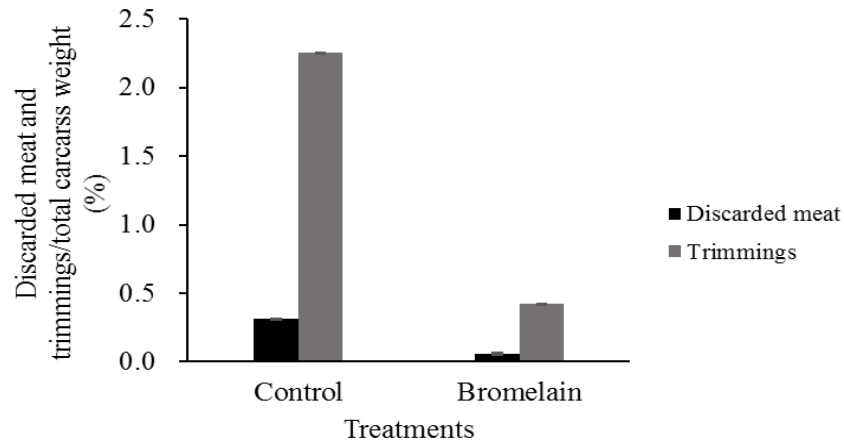


Fig. 4. The ratio of discarded meat and trimmings caused by the foot-and-mouth disease vaccination to total carcass weight. Values are means \pm standard deviation. A, B: Means with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

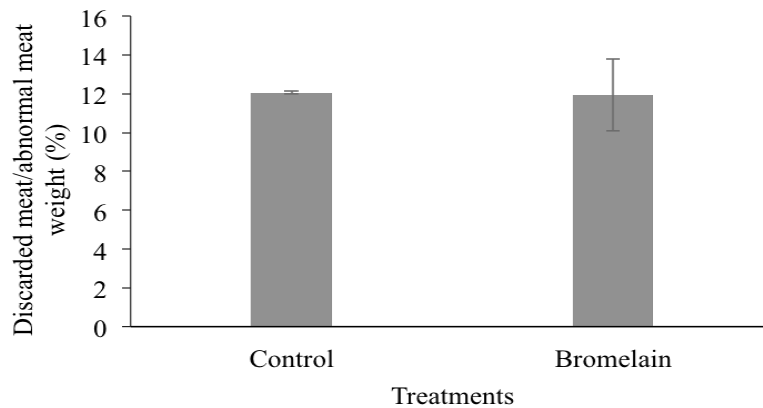


Fig. 5. The ratio of discarded meat caused by the foot-and-mouth disease vaccination to abnormal meat weight. Values are means \pm standard deviation.

로, 육류 안전성 관점에서 심각한 우려는 지속적으로 보고되고 있다(Dalsgaard et al., 1990; Valtulini et al., 2005). 하나의 백신에는 보조제로 미네랄 오일 및 다량의 수산화 알루미늄 부형제(aluminium hydroxide as adjuvant)가 함유되어 있다(Aucouturier et al., 2001; Valtulini et al., 2005). 이러한 부형제로 인하여 주로 접종 부위의 국소 반응이 나타나고 이는 육아종(granuloma) 형성의 원인이 되기도 한다(McKercher et al., 1971; Meyer, 2001; Valtulini et al., 2005; Woodward and Toon, 2009). 면역 보조제(adjuvants)는 항원에 대한 면역 반응을 현저히 향상시키는 화합물로 정의 할 수 있으며(Marciani, 2003), 염증을 유발하고, 대식세포 뿐만 아니라 림프구와 같은 항원 세포 모집을 자극하며, APC에 의해 항원 섭취를 쉽게 도와 면역 반응을 증가시키게 된다(Aucouturier et al., 2001; Marciani, 2003). 비 부형제를 이용한 백신 실험 연구에서는 백신 접종에 따른 국소 반응 염증 등이 현저하게 감소했음이 보고된다(Kass, 2004; Day et al., 2007).

본 연구에서 bromelain을 1 kg/ton 사료에 첨가하여 급여한 처리군에서 대조군 그룹에 비해 백신 접종 부위의 농양/염증/

육아종의 발병률이 감소된 것을 확인하였다. Bromelain의 염증 및 염증성 질환 효과는 다양한 동물 실험에서 보고된 바 있다. 기존 연구에 따르면 bromelain을 쥐의 피하에 투여한 것은 투여하지 않은 그룹과 비교하여 Lewis 폐 종양 세포를 극적으로 감소시키는 것으로 보고하였다(Batkin et al., 1988). Hale et al. (2005)은 bromelain을 쥐에 경구 투여했을 때 중증의 염증성 질환이 감소함을 확인하였다. Bromelain의 항 염증 기전은 여러 세포의 염증 반응에 중요한 역할을 담당하는 혈장 칼리크레인 시스템(plasma kallikrein system)이 bradykinin과 kallidin 생성을 억제하여 혈관을 확장하고 혈류를 증가시킴에 따른 결과이며, 또한 플라즈미노겐 활성화제와 동일한 기전으로 작용하여 피브린(fibrin)을 파괴시킴에 따른 결과임이 보고된 바 있다(Sarmento et al., 2010).

인간 임상연구와 동물 실험에 따르면, bromelain은 용량 의존적인 것으로 나타났다(McKercher et al., 1971; Rose et al., 2006). Bromelain을 반복적으로 노출시키면 항 bromelain 항체가 발현되지만(Sarmento et al., 2010), 이들 항체는 bromelain 단백질 분해 활성을 억제하지는 못한다(Hale, 2004). 이번 실험에서는 실험이 진행된 농장의 사육 형태 등의 이유로 bromelain의 용량 의존성 영향을 확인하지는 못하였다.

백신 접종 부위에서 발생하는 육아종 및 농양으로 인한 이상육의 발생은 경제적 손실의 결과를 낳고 있다. 따라서 본 연구에서 bromelain의 첨가 급여는 구제역 백신 접종에 따른 육아종 및 농양 발생으로 인한 이상육의 발생을 현저하게 감소시켰기 때문에, bromelain을 이용하여 구제역 백신 접종 돼지의 접종 부위의 염증 반응 완화를 위한 현장 적용 및 경제적 손실 감소 등 양돈 산업에 긍정적인 영향이 기대된다.

Conclusion

O, A 및 Asia1 type 구제역 백신을 접종한 돈군에게 bromelain을 사료에 1 kg/ton 첨가하여 급여하였을 때 처리하지 않은 대조군 그룹에 비해 접종 부위의 염증 및 육아종 등의 이상육 발생 개체가 현저하게 감소함이 확인되었다. 이를 통해 bromelain이 백신 접종 부위의 염증 및 육아종의 발생을 줄이는데 효과가 있는 것으로 사료된다. 하지만 bromelain의 양돈 산업에서의 효과적인 이용을 위해서는 bromelain의 처리 수준에 따른 구제역 백신 접종 부위에서의 염증 및 육아종 등의 병변 발생 억제 효과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(Project No. PJ01202703)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

Reference

- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19:2666-2672.
- Báez R, Lopes MT, Salas CE, Hernández M. 2007. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. *Planta medica* 73:1377-1383.
- Batkin S, Taussig S, Szekerczes J. 1988. Modulation of pulmonary metastasis (Lewis lung carcinoma) by bromelain, an extract of the pineapple stem (*Ananas comosus*). *Cancer Investigation* 6:241-242.
- Dalsgaard K, Hilgers L, Trouve G. 1990. Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. *Advances in veterinary science and comparative medicine* No. 35. pp. 121-160. Elsevier,

Amsterdam, Netherlands.

- Day M, Schoon HA, Magnol JP, Saik J, Devauchelle P, Truyen U, Gruffydd-Jones T, Cozette V, Jas D, Poulet H. 2007. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 25:4073-4084.
- De-Giuli M, Pirota F. 1978. Bromelain: Interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 4:21-23.
- Gerlach BM, Houser TA, Hollis LC, Tokach MD, Nietfeld JC, Higgins JJ, Anderson GA, Goehring BL. 2012. Incidence and severity of *Arcanobacterium pyogenes* injection site abscesses with needle or needle-free injection. *Meat Science* 92:805-807.
- Hale LP. 2004. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *International Immunopharmacology* 4:255-264.
- Hale LP, Fitzhugh DJ, Staats HF. 2006. Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain. *International Immunopharmacology* 6:2038-2046.
- Hale LP, Greer PK, Trinh CT, Gottfried MR. 2005. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology* 116:135-142.
- Hwang J, Oh C. 2014. A study on the spread of the foot-and-mouth disease in Korea in 2010/2011. *Journal of the Korean Data and Information Science Society* 25:271-280. [in Korean]
- Jo N, Jung J, Kim J, Lee J, Jeong S, Kim W, Sung H, Seo S. 2014. Effect of vaccination against foot-and-mouth disease on growth performance of Korean native goat (*Capra hircus coreanae*). *Journal of Animal Science* 92:2578-2586.
- Kass PH. 2004. Methodological issues in the design and analysis of epidemiological studies of feline vaccine-associated sarcomas. *Animal Health Research Reviews* 5:291-293.
- Marciani DJ. 2003. Vaccine adjuvants: Role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today* 8:934-943.
- McKercher P, Gailunas P, Burrows R, Capstick P. 1971. Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes. *Archives of Virology* 35:364-377.
- Meyer EK. 2001. Vaccine-associated adverse events. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 31:493-514.
- Onken JE, Greer PK, Calingaert B, Hale LP. 2008. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clinical Immunology* 126:345-352.
- Pirota F, de Giuli-Morghen C. 1978. Bromelain—a deeper pharmacological study. Note I. Antiinflammatory and serum fibrinolytic activity after oral administration in the rat. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 4:1-20.
- Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S, Ramesh R. 2016. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications (Review). *Biomedical Reports* 5:283-288.

- Rose B, Herder C, Löffler H, Meierhoff G, Schloot N, Walz M, Martin S. 2006. Dose-dependent induction of IL - 6 by plant-derived proteases *in vitro*. *Clinical & Experimental Immunology* 143:85-92.
- Sarmiento D, Moura D, Lopes S, Silva S. 2010. Bromelain monograph. *Alternative Medicine Review* 15:361-368.
- Valtulini S, Macchi C, Ballanti P, Cherel Y, Laval A, Theaker J, Bak M, Ferretti E, Morvan H. 2005. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine* 23:3999-4004.
- Van den Broeke A, Leen F, Aluwé M, Ampe B, Van Meensel J, Millet S. 2016. The effect of GnRH vaccination on performance, carcass, and meat quality and hormonal regulation in boars, barrows, and gilts. *Journal of Animal Science* 94:2811-2820.
- Woodward K, Toon L. 2009. Adverse reactions to vaccines. In *Veterinary Pharmacovigilance: Adverse reaction to veterinary medicinal products* edited by Woodward K. pp. 453-473. Wiley-Blackwell, United Kingdom.