

< Original Article >

## 정제봉독의 MAC-T 세포에서 유단백 합성 촉진효과

한상미\* · 우순옥 · 김세건 · 장혜리  
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

### Stimulation of the milk protein production in MAC-T cells by purified bee venom

Sang-Mi Han\*, Soon-Ok Woo, Se-Gun Kim, Hye-Ri Jang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development  
Administration, Wanju 55365, Korea

(Received 19 July 2018; revised 19 September 2018; accepted 21 September 2018)

#### Abstract

Purified bee venom was collected from colonies of honeybees (*Apis mellifera* L.) using a bee venom collector under sterile conditions and then purified under strict laboratory conditions. Purified bee venom contained 63.9±5.4% melittin, 10.9±1.6% phospholipase A2, and 2.3±0.3% apamin. Purified bee venom has various anti-bacterial, anti-inflammatory and immunostimulating effects. In this study, we evaluated purified bee venom which are mammary gland cells, MAC-T cells are used to increase the synthesis of milk protein. Purified bee venom promoted the proliferation of MAC-T cells at concentrations below 1 µg/mL, but cytotoxicity at 10 µg/mL and above. As a result of the increase in the synthesis of β-casein, a milk protein after treatment with MAC-T cells at a concentration of the bee venom without cytotoxicity, the β-casein content in the cell culture was increased when treated at a concentration of 1 ng/mL or more. In addition, it was confirmed that purified bee venom significantly increased the expression of bovine β-casein (bCSNB) mRNA, a β-casein synthesis gene, at a concentration of 1 ng/mL or more. These results suggest that purified bee venom can be used to increase the production of live-stock by ultimately increasing the expression of milk protein

**Key words :** *Apis mellifera* L., Purified bee venom, MAC-T cells, Casein, bCSNB

## 서 론

서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려져 있다(Habermann과 Reiz, 1965; Fennelle 등, 1967; Piek, 1986). 예로부터 민간과 한방에서는 살아있는 꿀벌을 직접 환부에 놓거나 혈 자리를 찾아 사람과 가축의 질병 예방과 치료에 이용해 왔다.

본 연구팀에서는 2005년 봉독채집장치와 채집된 봉독으로부터 이물질을 제거할 수 있는 봉독정제법을 개발하였다(한 등, 2007). 이로써 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 화장품과 의약품의 원료와 동물용의약품 세정제로 정제봉독이 상용화되었다. 봉독은 자돈 및 양계에 처리했을 때 체중 및 생존율 증가와 같은 생산성 향상과 질병 감소에 효과를 나타낸다고 보고되었다(Han 등, 2009a; Han 등, 2010a). 또한, 봉독을 분만 전 교소혈(交巢穴)에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산 정체를 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정재귀일수와 분만간격의 단축과 봉독을 투여한 어미 소로부터 출생한 신생송아지의

\*Corresponding author: Sang-Mi Han, Tel. +82-63-238-2896,  
Fax. +82-63-238-3832, E-mail. sangmih@korea.kr

체중 증가와 질병이 감소하는 것으로 보고되었다(Han 등, 2010b). 뿐만 아니라 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 등 유방염 원인균에 의해 유발된 젖소 유방염의 경우 봉독투여로 체세포수가 크게 감소하는 것으로 확인되었고, 유방염에 걸린 젖소로부터 채취한 원유에서 분리한 균에 대한 항균력이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Han 등, 2007). 또한 소유래 유선세포인 MAC-T 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 이용 염증을 유발한 후 봉독 처리했을 경우 염증 유발 사이토카인인 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현을 크게 억제하는 것으로 확인되었다(Jeong 등, 2017). 젖소에 봉독을 투여한 후 3일째는 물론 투여 후 1일째에도 우유에서 봉독 성분이 검출되지 않아 천연물질인 봉독은 축산물 내에 잔류하지 않는 것으로 확인되었다(Han 등, 2015). 봉독은 그람양성세균인 *S. aureus*, *S. intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*는 물론 그람음성세균인 *Salmonella newport*, *S. typhimurium* 등에 강한 항균력을 갖고 있다(Neena 등, 1992; Han 등, 2009b; Han 등, 2013). 뿐만 아니라 항생제 내성균인 MRSA(Methicillin-resistant *S. aureus*)에 대해서도 우수한 항

균력을 지는 것으로 확인하였다(Han 등, 2016).

따라서 본 연구에서는 낙농산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 젖소 유방염 원인균에 대해 강력한 항균효과와 염증억제 효과를 갖는 봉독이 MAC-T 세포에서 유단백 합성을 촉진하는 효과를 측정하여 젖소 유방염 예방 및 치료제로 개발 가능성뿐만 아니라 생산성 향상에도 도움이 되는지를 검증하고자 하였다.

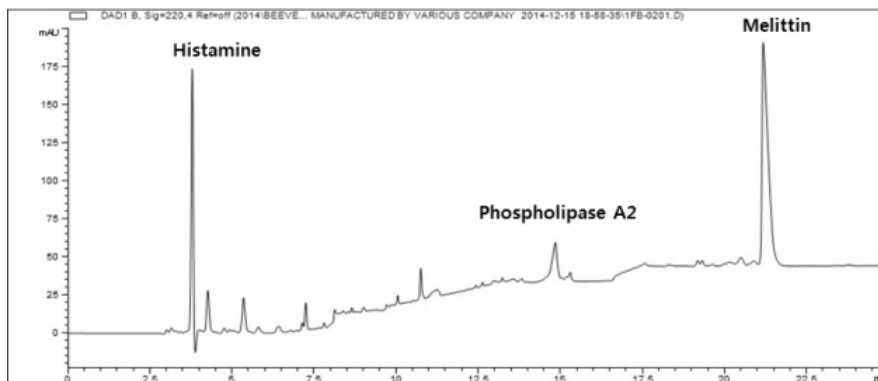
## 재료 및 방법

### 공시 시료 및 성분 분석

시험물질인 정제봉독은 봉독채집장치를 사용하여 서양종꿀벌로부터 채취한 봉독을 ‘봉독의 간이정제 방법’으로(Han 등, 2007) 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였다(한국정제봉독협동조합, 한국). 구입한 정제봉독의 성분 확인을 위하여 4 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 녹여 PTFE 0.2 µm 필터(Sigma-Aldrich, USA)로 여과하여 UPLC(Ultra performance liquid chromatography, Waters, USA)를 사용하여 분석하였다. 표준품인 apamin, mellitin, 그리고 phospholipase A2는 시그마사(Sigma-Aldrich)로부터 구입하여 2 mg/mL로 만들어 시험봉독과 동일한 필터를 사용하여 여과하였다. 분석기기는 PDA(photo diode array, Waters)검출기가 장착된 Acquity UPLC I-Class(Waters)를 사용하여, Table 1과 같은 컬럼 및 분석 조건으로 220 nm의 검출파장에서 분석하였다(Han 등, 2017). 정제봉독 내의 멜리틴, 아파민 그리고 포스포리파아제 A<sub>2</sub>의 함량은 각각의 표준품 수용액 시료에 나타나는 피크와 비교하여 63.9%, 2.3% 그리고 10.9%로 확인되었다(Fig. 1).

**Table 1.** Conditions for Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) analysis of purified bee venom

|                    | UPLC condition  |
|--------------------|---|
| Column             | Halo ES-18 (2.1×100 mm, 2.7 µm)   |
| Flow rate          | 0.8 mL/min  |
| Injection volume   | 2 µL  |
| Column temperature | 50°C  |
| Sample temperature | 5°C   |
| Mobil phase        | (A) 20 mM TFA/MeCN*, (B) 20 mM TFA/H <sub>2</sub> O<br>(A) 0~3 min, 10~31%; 3~5 min, 31~40%; 5~10 min, 40~45% |



**Fig. 1.** UPLC spectrum of the purified bee venom.

### MAC-T 세포 배양 및 생존율 측정

본 실험에 사용한 MAC-T 세포는 고려대학교 식품생명공학과로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C로 배양하였다. 정제봉독 하에서 MAC-T 세포의 생존율을 측정하기 위하여 WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 환원 방법을 이용하였다. 24 시간 동안 배양 후 50 µL CCK-8 용액(Dojindo, Japan)을 첨가하여 3시간 배양하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포의 형태에도 변화를 주는 지를 확인하고자 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.

### β-casein 단백질 발현 측정

MAC-T 세포는 6 well에 2×10<sup>5</sup> cell/well가 되도록 하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C 조건으로 24시간 배양한 것을 사용하였다. 봉독을 함유하지 않은 배지와 1, 10, 50, 100 ng/mL 농도로 봉독이 함유된 DMEM 배지로 배양액을 교체하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 24시간 반응시킨 뒤 그 상청액을 실험에 적용하였다. 유단백인 β-casein (CSN2)의 발현은 Cow Casein β ELISA Kit (Abbexa, UK)를 사용하여 측정하였다. CSN2 항체가 코팅된 plate에 배양액을 100 µL/well 씩 분주하고 1시간 반응시킨 뒤 biotin이 연결된 CSN2 항체 100 µL/well을 1시간, HRP를 가진 2차 항체 100 µL/well을 30분간 반응시킨다. 그 후 TMB substrate 90 µL/well를 첨가하여 15분간 발색 반응시킨 뒤 stop solution을 50 µL/well 첨가하여 반응을 중지시켜 450 nm에서 흡광도를 확인하였으며, 모든 반응은 37°C에서 이루어졌다.

### β-casein 단백질 발현 지속시간 측정

MAC-T 세포에서 봉독의 β-casein 단백질 발현 지속시간을 측정하고자 단백질 발현 최적 농도로 처리한 후 12시간 간격으로 상청액을 취하여 발현량을 측정하였다. MAC-T 세포는 24시간 동안 전 배양한 다음 β-casein 단백질 발현 최적 농도의 봉독을 처리한 후 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다. 봉독을 처리한 후 24시간 간격으로 상청액을 취하고

새로운 DMEM 배지로 배양액을 교체하였다. 수거한 상청액은 Cow Casein β ELISA Kit (Abbexa, UK)를 사용하여 단백질 함량을 측정하였다.

### bCSNB (bovine β-casein) mRNA 발현 측정

β-casein 단백질 발현 측정과 동일한 방법으로 배양하여 1, 10, 50, 100 ng/mL 농도의 봉독을 처리한 MAC-T 세포는 Trizol (Ambion, USA)을 첨가하여 상온에 20분, chloroform과 상온에서 10분간 반응시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하였다. 상청액과 동량의 isopropanol을 10분간 반응시킨 뒤 분리된 RNA를 80% 에탄올로 세척한 후 사용하였다. amfiRivert platinum cDNA synthesis master mix (GenDEPOT, USA)를 이용하여 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 PCR을 수행하여 cDNA를 합성하였으며, β-casein 합성 유전자인 bCSNB gene의 증폭을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 사용한 primer는 bCSNB forward (5'-GTGAGGAACAGCAGCAAACA-3'), bCSNB reverse (5'-TTTTGTGGGAGGCTGTTAGG-3'), house-keeping gene으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward (5'-GGGTCATCATCTCTGCAC C T-3'), GAPDH reverse (5'-GGTCATAAGTCCCTCC ACGA-3')로 PCR 조건은 다음과 같다(Zhou 등, 2008). 94°C에서 3분 반응 후, 94°C에서 60초, 60°C에서 60초, 72°C에서 60초 반응 사이클을 35회 반복하여 증폭한 후 마지막 72°C에서 10분간 반응시켰다. 그 후 1% agarose gel에서 전기영동하였고 UV를 조사하여 증폭 산물을 확인하였다.

### 통계처리

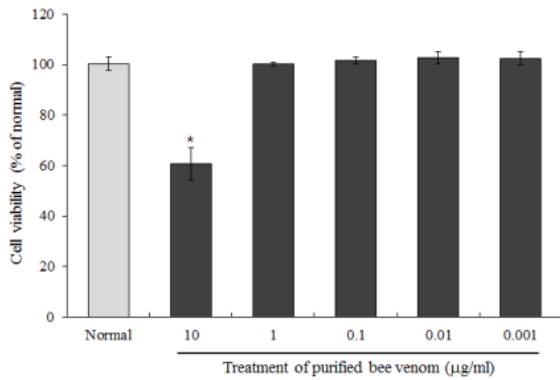
실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 R 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균±표준오차(mean±SEM)로 표시하였다.

## 결 과

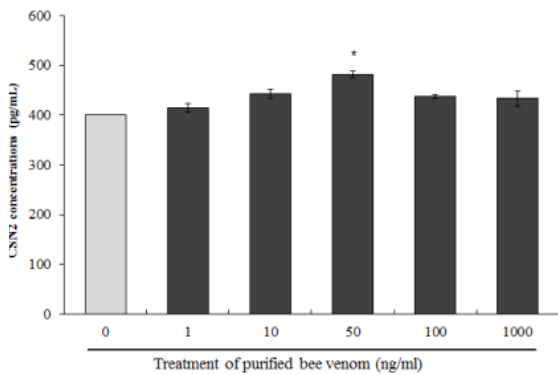
### 세포의 생존율

본 실험에서는 정제된 봉독을 MAC-T 세포에 다양한 농도로 처리한 후 WST-8 환원 방법을 이용하여 세포독성을 확인하였다. MAC-T 세포에 다양한 농도

의 봉독을 처리하였으며, 그 결과 정제봉독 10 µg/mL에서는 세포의 생존율이 57%로 현저히 낮게 나타났으며 1 µg/mL 부터 0.01 µg/mL의 농도는 각각 99.9%, 102.2% 그리고 103.5%로 세포의 증식이 미세하게 증가하는 것을 나타냈다(Fig. 2). 1 µg/mL 이하의 정제봉독은 MAC-T의 생존에 영향을 미치지 않으며 세포의 증식에 도우며 되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서는 MAC-T 세포에 1 µg/mL 이하의 봉독을 처리한 후 β-casein의 단백질 및 bCSNB mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다.



**Fig. 2.** Cell viability of purified bee venom on MAC-T cells by WST-8 assay. The cells were treated with various concentrations of purified bee venom for 24 hr. Data are presented as mean±SEM of three independent experiments. Normal is cell only. The asterisk indicates a significant difference with  $P < 0.05$ .



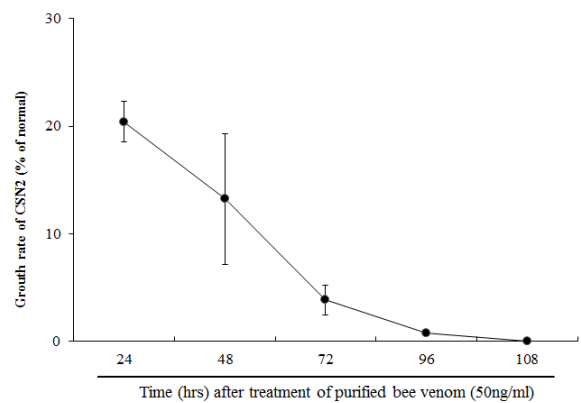
**Fig. 3.** Effect of purified bee venom on major milk protein, β-casein stimulation in MAC-T cells. The MAC-T cells were treated with various concentrations of purified bee venom for 24 hr before the ELISA assays. The β-casein was done by measuring the accumulation of CSN2. Data are presented as mean±SEM of three independent experiments. The asterisk indicates a significant difference with  $P < 0.01$ .

**β-casein 단백질 발현**

정제봉독이 젖소 유선세포인 MAC-T 세포에서 주요 유단백질인 casein의 합성을 촉진하는지를 확인하기 위하여 Cow Casein β ELISA kit를 이용하였다(Chen 등, 2013). 세포 독성을 일으키지 않는 정제봉독의 농도인 1 µg/mL의 이하의 농도로 정제봉독을 MAC-T 세포에 처리하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 1 ng/mL 이상의 농도로 처리했을 경우 세포 배양액 내 β-casein 함량이 증가하는 것으로 확인되었다. β-casein의 함량은 정제봉독의 처리 농도 의존적으로 증가하여 50 ng/mL의 농도에서 증가율이 가장 높았으며 이후 정제봉독의 농도가 증가함에 따라 오히려 단백질 합성이 감소하는 것으로 확인되었다.

**β-casein 단백질 발현 지속시간**

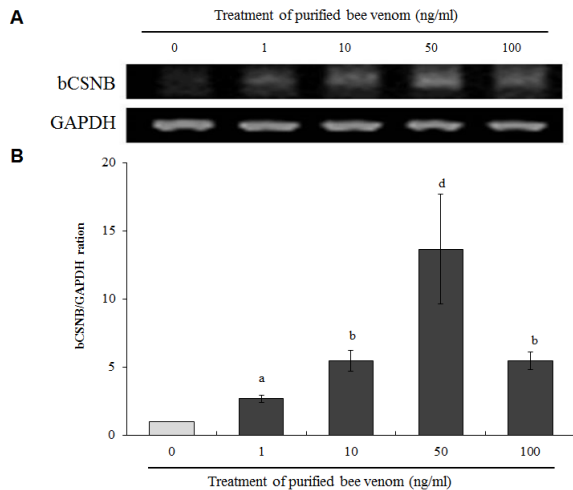
MAC-T 세포에서 50 ng/mL의 농도에서 β-casein 단백질 발현이 가장 높은 것으로 확인되어 50 ng/mL의 농도로 봉독을 처리 한 후 단백질 발현 지속시간을 측정하였다. 그 결과 봉독 처리 후 36시간째 발현량이 가장 높았으며 이후에도 단백질 발현은 증가하여 96시간 동안 지속되었다(Fig. 4). 그러나 단백질 발현량 증가율은 35시간 이후 급격히 감소하여 120시간 이후에는 단백질 발현 증가가 확인되지 않았다.



**Fig. 4.** The efficacy of the major milk protein, β-casein stimulation in MAC-T cells lasted for 96 hrs after treatment with purified bee venom. The MAC-T cells were treated with 50 ng/ml concentrations of purified bee venom and incubated for 24 hrs. After 24 hrs, Supernatant media was harvested every 24 hrs and changed with new media. The harvested media was measured the accumulation of CSN2 by the ELISA assays. Data are presented as mean±SEM of three independent experiments.

## 유단백질 유전자의 발현

정제봉독의 유단백합성 관련 유전자 발현 확인은  $\beta$ -casein 합성 유전자인 bCSNB mRNA 발현 수준을 확인하였다(Zhou 등, 2008). 세포독성을 유발하지 않는 농도의 정제봉독을 MAC-T 세포에 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 수거하여 bCSNB의 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 정제봉독을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 봉독 농도가 증가함에 따라 bCSNB의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 50 ng/mL의 봉독을 적용하였을 경우 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 5). 정제봉독에 의한 bCSNB 유전자 발현 수준은 1 ng/mL의 처리 농도에서도 대조군에 비하여 통계적으로 유의성을 나타내었다( $P < 0.05$ ). bCSNB 유전자 발현은 농도 의존적으로 증가하였으나  $\beta$ -casein 단백질 합성에서와 같이 50 ng/mL을 기점으로 농도가 증가하더라도 더 이상 증가폭은 크지 않은 것으로 확인되었다.



**Fig. 5.** Effect of purified bee venom on major milk protein mRNA, bCSNB expression in MAC-T cells. The MAC-T cells were treated with various concentrations of purified bee venom for 24 hr before total RNA was extracted from them. The abundances for bCSNB as well as GAPDH (internal control) were measured by reverse transcription coupled with real-time PCR. (A) ethidium bromide-stained gel images of DNA products. (B) relative mRNA levels calculated from real-time PCR data. Values bearing different superscripts in the same column are significantly different at  $P < 0.05$  by Turkey's test.

## 고찰

오래 전부터 봉독은 젖소 유방염 예방과 치료에 활용되어 왔으며, 젖소 유방염의 유발 원인균인 에 대한 강력한 항균효과 뿐 만 아니라 염증을 유발을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다(Han 등, 2007). 또한 봉독을 사용하는 농가에서 젖소의 유량이 증가하는 효과가 있다고 알려져 있었다. 따라서 본 연구를 통해 봉독이 젖소의 유량을 증가시키는 효과가 있는지를 확인하고자 하였다. 유생산량은 유선의 발달과 분화 정도에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 유선세포의 발달과 분화는 호르몬에 예민한 시기인 분만전의 영양 상태에 의해 좌우되기 때문에 유생산량을 증가시키거나 높은 유생산 능력을 오래도록 지속할 수 있는 연구가 많이 이루어지고 있다(Boutinaud 등, 2004; Lee 등, 2005; Nam 등, 2017). Casein은 우유 내 대부분을 차지하는 유단백질로 분화된 유선세포에 의해 합성 분비된다. 젖소 우유의 경우 casein은 전체 유단백질의 80% 이상이며 20%는 유청단백질이다. Casein은  $\alpha$ -casein이 45~55%,  $\beta$ -casein은 25~35%, 그리고  $\gamma$ -casein과 K casein으로 구성된다. 이러한 유단백질의 발현과 유도는 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 호르몬과 효소, RNA 전사, mRNA 안정성, 단백질 전이 수준, 핵과 세포질내의 이동 등을 들 수 있다(Rosen 등, 1985). 유단백질 유전자 발현의 증가는 호르몬의 작용 외에도 유단백질 유전자의 methylation 정도에 따라 영향을 받는 것으로 알려지고 있으나 아직 구체적인 작용기작에 대해서는 알려진 것이 없다(Qasba 등, 1982; Thompson과 Nakhasi, 1985; Choi 등, 1998). 생리적 단계별로 연구 조사하였을 경우 임신전과 임신기간 동안에는 casein 유전자들의 조절 부위가 비유기에 비해 상대적으로 hypermethylation 되어있다는 연구 결과가 있다. 유선세포의 활성화에 의해 증가된 유단백질 유전자의 발현으로 유생산량이 증가되더라도 어미젖의 유 성분 변화 특히 유단백질의 분비량은 감소하지 않는 것으로 알려져 있다(Park 등, 1998).

본 연구에서는 유선세포인 MAC-T 세포에서 주요 유단백질인  $\beta$ -casein의 발현을 활성화시키는지 확인하였다. 그 결과 봉독은 매우 낮은 농도인 1 ng/mL에서도 유단백질 합성이 활성화 되었으며 봉독의 농도가 증가 할수록 casein 합성량도 증가하였으나 50 ng/mL의 농도에서 가장 효과적으로 casein 합성량이 증가하는 것으로 확인되었다. MAC-T 세포에서 봉독

처리 후 36시간 후 유단백 합성량이 가장 증가되었으며 단백질 발현 증가는 96시간 동안 유지되는 것으로 확인되었다.

정제봉독은 유선세포에서  $\beta$ -casein 합성 유전자인 bCSNB mRNA 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다. 유선세포내의 유단백질 유전자의 발현 증가는 유선조직의 기능 활성화 정도를 나타내는 것으로 유선세포의 활성화는 다음번 포유기에도 지속적으로 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Kim, 2000). 본 연구 결과 정제봉독은 유단백질 유전자인 bCSNB mRNA 발현을 증가시켜 유단백질의 합성을 촉진하는 것으로 확인되었다. 앞으로 기존 항생제 대체 젖소 유방염 예방과 치료에 봉독을 처리 현장적용 시험을 통해 유량 증대 효과 검증과 더불어 봉독 처리 용량 및 투여 방법 등에 대한 추가 연구가 필요하다.

## 결 론

서양종꿀벌의 일벌로부터 분리한 봉독은 멜리틴을 주성분으로 다양한 항균, 항염, 면역증강 효과 등을 갖고 있다. 본 연구에서는 봉독채집장치로 대량으로 채취한 봉독을 이물질을 제거하고 멜리틴 함량 정제 봉독 내의 멜리틴, 아파민 그리고 포스포리파아제 A<sub>2</sub>의 함량이 63.9%, 2.3% 그리고 10.9%인 정제봉독을 젖소 유선세포인 MAC-T 세포를 사용하여 유단백질의 합성을 증가시키는지 확인하였다. 정제봉독은 1  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서는 MAC-T 세포의 증식을 촉진하였으나 10  $\mu$ g/mL 이상에서는 세포독성을 갖고 있었다. 세포독성을 갖지 않는 정제봉독의 농도로 MAC-T 세포에 처리 후 유단백질인  $\beta$ -casein의 합성이 증가되는 확인한 결과 1 ng/mL 이상의 농도로 처리했을 경우 세포 배양액 내  $\beta$ -casein 함량이 증가하는 것으로 확인되었으며 유단백질 합성은 96시간 동안 지속되는 것으로 확인되었다. 또한 정제봉독은 1 ng/mL 이상의 농도에서  $\beta$ -casein 합성 유전자인 bCSNB mRNA 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 봉독은 유단백질과 유단백질 유전자 발현을 증가시켜 궁극적으로 가축의 생산량을 증대시키기 위해 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업 농생명바이오식의약소재개발 (과제번호: PJ01316602)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## REFERENCES

- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 봉독 간이정제법. 특허 제 10-0758814호.
- Boutinaud M, Guinard-Flamenta J, Jammes H. 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev* 44: 499-508.
- Chen LM, Li ZT, Wang MZ, Wang HR. 2013. Preliminary report of arginine on synthesis and gene expression of casein in bovine mammary epithelial cell. *Int Res J Agric Sci Soil Sci* 3: 17-23.
- Choi YJ, Jang K, Yim DS, Baik MG, Myung KH, Kim YS, Lee HJ, Kim JS, Han IK. 1998. Effects of compensatory growth on the expression of milk protein gene and biochemical charges of the mammary gland in Holstern cows. *J Nutr Biochem* 9: 380-387.
- Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ. 1967. Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant *Staphylococcus* and other microorganisms. *Res Dev Tech Rep* 5: 1-13.
- Habermann E, Reiz KG. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. *Biochem Z* 343: 192-203.
- Han SM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jang HR. 2015. Analysis of bee venom residues in milks of dairy cattle using UHPLC with newly developed pre-processing method. *Korean J Vet Serv* 38: 25-30.
- Han SM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jang HR. 2017. ADH and ALDH activation of purified bee venom (*Apis mellifera* L.). *J Apic* 32: 269-273.
- Han SM, Kim JM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jang HR, Pak SC. 2016. Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 21: 79.
- Han SM, Lee KG, Park KK, Pak SC. 2013. Antimicrobial activity of honey bee venom against select infectious fish pathogens. *N Am J Aquacult* 75: 445-448.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009a. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *Am J Chin Med* 37: 833-842.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim BS, Kim JY, Baek HJ, Kim ST. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. *Int J Indust Entomol* 14: 137-142.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim BS, Lee W, Baek HJ, Kim ST, Hwang SJ, Pak SC. 2010a. Effects of honeybee

- venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. *Poult Sci* 89: 2396-2400.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim ST. 2010b. Effects of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the reproductive efficiency of dams and the growth performance, disease occurrence of Hanwoo calves. *Korean J Vet Serv* 33: 287-292.
- Han SM, Yeo JH, Baek HJ, Lin SM, Meyer S, Molan P. 2009b. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Asian Nat Prod Res* 11: 796-804.
- Jeong CH, Cheng WN, Bae HJ, Lee KW, Han SM, Petriello MC, Lee HG, Seo HG, Han SG. 2017. Bee venom decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 27: 1827-1836.
- Kim SH. 2000. Compensatory nutrition-mediated lactation potential and milk protein gene expression in rats. *Korean J Nutr* 33: 697-702.
- Lee HG, Hong ZS, Li ZH, Xu CX, Jin X, Jin MG, Lee HJ, Choi NJ, Koh TS, Choi YJ. 2005. Effect of brown seaweed waste supplementation on lactational performance and endocrine physiology in Holstein lactating cows. *Korean Society of Animal Sciences and Technology* 47: 573-582.
- Nam IS, Lim YC, Nam KT. 2017. Effects of feeding organic diets with different fatty acid composition ratio on CLA and fatty acid contents in raw milk of Holstein-Friesian dairy cows. *Korean J Organic Agric* 25: 219-231.
- Neena S, Asnani PJ, Bhandari S, Vohra R. 1992. Purification and kinetics of extracellular phospholipase A of *Salmonella newport*. *Folia Microbiol* 37: 205-209.
- Park CS, Danielson RB, Creft BS, Kim SH, Moon YS, Keller WL. 1998. Nutritionally directed compensatory growth and effects on lactation potential of developing heifers. *J Dairy Sci* 81: 243-249.
- Piek T. 1986. Venoms of the hymenoptera. Academic press, London. United Kingdom.
- Qasba PK, Dandeka AM, Horn TM, Losonczy I, Siegel M, Sobiech KA, Nakhasi HL, Devinoy E. 1982. Milk protein gene expression in the rat mammary gland. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 16: 165-186.
- Rosen JM, Jones WK, Campbell SM, Bisbee CA, Yu-Lee LY. 1985. Structure and regulation of peptide hormone-responsive genes. pp. 383-396. In: Czech MP, Kahn CR. Membrane receptors and cellular regulation. Utah.
- Thompson MD, Nakhasi HL. 1985. Methylation and expression of rat kappa-casein gene in normal and neoplastic rat mammary gland. *Cancer Res* 45: 1291-1295.
- Zhou Y, Akers RM, Jiang H. 2008. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. *J Dairy Sci* 91: 100-108.
- Zhou Y, Capuco AV, Jiang H. 2008. Involvement of connective tissue growth factor (CTGF) in insulin-like growth factor-I (IGF1) stimulation of proliferation of a bovine mammary epithelial cell line. *Domest Anim Endocrinol* 35: 180-189.