

재조합 lysozyme-HJP34 단백질의 다양한 병원성 세균에 대한 항균 효능 및 자돈 사료첨가제의 가능성 평가

유정희 · 유영주 · 김선민 · 허진*

전북대학교 수의과대학 수의공중보건학실

Antibacterial evaluation of recombinant lysozyme-HJP24 proteins against various bacterial pathogens, and of its possibility test as a feed additive in piglets

Jeong-Hee Yu, Yeong-Ju Yu, Seon-Min Kim, Jin Hur*

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea

The recombinant lysozyme-HJL34 proteins were expressed and purified using commercial *Escherichia (E.) coli* expression system. Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus (S.) suis*, and *Clostridium (C.) perfringens* strains were isolated from pigs. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the recombinant lysozyme-HJP34 proteins were examined by means of the microtiter plate method, according to the NCCLS recommendations. The possibility of its as the alternatives to antibiotics was tested in piglets. The MICs were determined as 75 µg/mL, 300 µg/mL, 75 µg/mL, 35.5 µg/m against Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis*, *C. perfringens*, respectively. A total of 25 piglets were divided 5 groups. The piglets in group A~C were fed with commercial feed and those in groups D, E were fed with commercial feedstuff. All piglets in groups B~E were challenged with virulent Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* strains. Groups C and D were treated with antimicrobial from 24 h after challenge. All piglets in group B died within 3 days after challenge. Among 5 piglets in groups C and D piglets, 80% survived after challenge. Among group E piglets, 60% were alive until the end of this study. Therefore, this study indicates that recombinant lysozyme-HJP34 proteins is a suitable possibility as a feed additive for reduction of diseases by bacterial pathogens in piglet feed.

Received December 12, 2021

Accepted December 28, 2021

Corresponding author:

Jin Hur

E-mail: hurjin@jbnu.ac.kr

https://orcid.org/0000-0003-2658-0747

Key Words: Feed additive, Recombinant lysozyme-HJL34 proteins, Piglets, Stx2e⁺ F18⁺ *Escherichia coli*, Alternatives to antibiotics

서론

항생제를 축산사료에 첨가함으로써 유해 병원성 세균의 증식을 억제하여 질병 예방 효과뿐만 아니라 함께 성장률과 사료 효율을 개선시키는 이점이 있는 것으로 알려져 왔다(Hays와 Muir, 1979). 양돈 산업에서도 사료에 항생제 첨가는 질병의 예방과 더불어 성장촉진을 위해 즉, 돼지의 건강과 생산성을 향상

시키기 위해 사용되어 왔다(Oliver와 Wells, 2015). 특히 자돈의 경우 출생 후부터 다양한 원인에 의한 소화기계 질병은 자돈 성장을 저해하여 왔고(Salmon 등, 1995; Cooper 등, 1997), 심하면 대량 폐사를 유발함으로써 막대한 경제적 손실을 초래하여 왔다(Cooper 등, 1997). 따라서 자돈에서 오랜 시간 사료에 항생제를 생산성 향상을 위해 널리 사용되어 왔다(Thepangna 등, 2007). 하지만 장기적인 항생제 사용으로 인해 많

은 문제점 대두되게 되었으며, 특히 항생제 오남용에 따른 식육에서의 항생제 잔류와 내성균 출현은 국제적인 문제로 대두되게 이르렀다(Han 등, 2014). 더불어 항생제 내성균으로 인한 질병 치료를 위해 항생제의 과다 사용, 장기간의 치료에 따라 항생제 잔류 등 안전한 먹거리에 대한 사회적인 관심과 그 중요성이 점차 증가하게 되었다(Kim 등, 1997; Han 등, 2015). 이러한 문제 등을 해결하기 위해 항균효능이 우수한 천연물질 및 대체제 발굴에 많은 연구가 진행되고 있다(Jeong 등, 2009; Lee 등, 2011; Oliver와 Wells, 2015; Han 등, 2016; Jung 등, 2021).

라이소자임은 1,4- β -N-acetylmuramidase로 세균 세포벽 성분인 펩티도글리칸의 glycosidic 결합부위를 절단하여 결국에는 세포를 사멸케 한다(Ellison과 Giehl, 1991). 더불어 라이소자임에 의해 가수분해된 산물들은 IgA 분비, 대식세포 활성화, 병원성 세균의 빠른 제거를 향상시키는 것으로 보고되고 있다(Kawano 등, 1981; Clarke 등, 2010). 숙주 방어 펩타이드(Host defense peptide; HDPs) 또는 항균펩타이드(Anti-microbial peptides; AMPs)라고 불리는 펩타이드들은 식물, 곤충, 양서류, 포유동물 등에서 선천면역계의 일부(Boman, 1995; 2003)으로, 그람 음성, 그람 양성 세균(Vila-Farres 등, 2012), 기생충(Haines 등, 2009), 외막형 바이러스(enveloped viruses) (Carballar 등, 2008) 등을 사멸시켜 이들의 감염으로부터 숙주를 보호하는데 중요한 역할을 수행한다(Kuhn-Nentwig, 2003; Bulet 등, 2004; Wang 등, 2016; Fratini 등, 2017; Koehbach와 Craik, 2019). 이러한 항균펩타이드(antimicrobial peptides [AMPs])의 작용기전은 세포막 성분을 크게 변화시키지 않고 단지 세균 세포막에 구멍을 만들거나 세균 세포막의 투과성에 변화를 주어 세균 세포막의 고유 기능인 장벽으로서의 기능을 파괴하여 세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다(Henzler-Wildman 등, 2004; Yeung 등, 2011; Wilmes와 Sahl, 2014; Kwon 등, 2016). 하지만 펩타이드는 현 기술로는 동물용 사료 첨가제나 질병 저감을 위해 다량을 사용하기에는 경제적으로 고가라는 점이 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 이 문제를 해결하기 위하여 본 연구에서 라이소자임과 양전하 및 알파헤릭스를 보유한 인공 항균펩타이드를 대장균 발현 시스템을 이용하여 대량 생산하여 이유 후 자돈에서 주로 문제가 되고 있는 주요 세균인 Stx2e⁺ F18⁺ *Escherichia* (*E.*) *coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus* (*S.*) *suis*, 그리고 *Clostridium* (*C.*) *perfringens* strains에 대한 항균력을 검사한 후 이들 병원성 세균에 대한 질병 저감 효과용 사료 첨가제로서의 유효성을 이유 자돈을 이용하여 평가하여 보았다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주와 펩타이드 및 프라이머 그리고 배양조건

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS 균주는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현을 위한 과발현 host 균주로 사용되었다. BL21-lysozyme-HJP34 균주는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현 및 정제를 위한 유전자가 삽입된 형질전환된 균주로 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현 및 정제를 위해 사용되었다. 이유 후 자돈에서 전형적인 부종병 증상을 보인 자돈으로부터 분리한 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli* 균주인 HJL624, 636, 712 균주, 돼지 흉막폐렴 증상을 보인 돼지로부터 분리한 APP 균주인 HJL9, 11, 33, 34, 38, 42 균주, *S. suis* 균주인 HJL1221, 1305, 1307 균주, *C. perfringens* 균주인 HJL916, 989, 987 균주는 실험실적으로 항균력 시험을 위해 사용되었다. 더불어 이들 15 균주 중에서 *C. perfringens*의 세균주를 제외한 나머지 12균주는 이유자돈에서 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 혼합하여 급여 후 이들 균주에 의한 질병 저감 효과를 위한 도전감염 균주로 사용되었다(Table 1).

단백질 발현용 균주 및 대장균 균주들은 LB broth와 LB agar에서 배양되었다. *A. pleuropneumoniae* 균주들은 Chocolate agar에서, *S. suis* 균주는 6% sheep blood가 함유된 Columbia agar에서, *C. perfringens*의 세균주들은 Blood agar에서 각각 배양되었다.

pET28a 플라스미드는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 과발현을 위해 사용되었다(Table 1).

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 코딩하는 유전자 클로닝

재조합 lysozyme-HJP34 단백질에 대한 수정된 융합 유전자는 화학적으로(Biod, Gwangmyeong-si, South Korea) 합성되어 pET28a 플라스미드에 삽입되었다(Fig. 1). 재조합 단백질은 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 유전자가 삽입된 pET28a 벡터로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)pLysS에서 발현되어 니켈-니트릴 로트리 아세트산-아가로스 친화도 정제 공정을 사용하여 정제되었다. 정제된 단백질은 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다. 모든 정제된 항원을 50% 글리세롤에 혼합하여 사용할 때까지 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used for this study

| Strain/plasmid | Description | Source of reference |
|----------------------------|--|---------------------|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> | | |
| BL21(DE3)pLysS | F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cm ^r | Lab stock |
| BL21-lysozyme-HJP34 | BL21(DE3)pLysS with pET28a-lysozyme-HJP34 | This study |
| HJL624 | LT ⁺ Stx2e ⁺ F18 ⁺ <i>E. coli</i> isolate from piglets with edema disease | Lab stock |
| HJL636 | LT ⁺ Sta ⁺ Stx2e ⁺ F18 ⁺ <i>E. coli</i> isolate from piglets with edema disease | Lab stock |
| HJL712 | LT ⁺ Sta ⁺ Stx2e ⁺ F18 ⁺ <i>E. coli</i> isolate from piglets with edema disease | Lab stock |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | | |
| HJL9 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL11 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL33 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 7 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL34 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL67 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL263 | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5 isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| <i>S. suis</i> | | |
| HJL1221 | <i>Streptococcus suis</i> serotype 12 isolate from piglets | Lab stock |
| HJL1305 | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 1/2 isolate from piglets | Lab stock |
| HJL1307 | <i>Streptococcus suis</i> serotype 8 isolate from piglets | Lab stock |
| <i>C. perfringens</i> | | |
| HJL916 | <i>Clostridium perfringens</i> A type isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL986 | <i>Clostridium perfringens</i> A type isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| HJL987 | <i>Clostridium perfringens</i> A type isolate from piglet with pleuropneumonia | Lab stock |
| Plasmids | | |
| pET28a | IPTG-inducible expression vector; Km ^r | Novagen |
| pET28a-lysozyme-HJP34 | pET28a containing the gene for lysozyme-thrombin-HJP34 | This study |

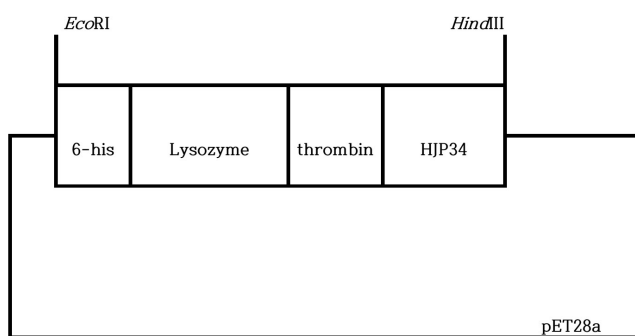


Fig. 1. The construct of recombinant plasmid encoded lysozyme-HJP34 protein.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현 및 정제

pET28a-lysozyme-HJP34 벡터를 발현시키기 위해 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 형질전환하였다. 이렇게 형질전환된 대장균으로부터 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 과발현시키기 위해 한 콜로니를 50 µg/mL 카나마이신(kanamycin)이 함유된 100 mL의 루리아-베르타니(Luria-Bertani, LB) broth에 접

종하여 37°C에서 하룻밤동안 배양하였다. 이 배양액 10 mL를 새로 제조된 50 µg/mL kanamycin이 함유된 1,000 mL의 LB broth로 옮겨 OD₆₀₀가 0.6이 될 때까지 재 배양하였다. 이 배양액에 이소프로필-β-D-티오가락토피라노시드(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)가 0.5 mM이 되도록 첨가하고, 25°C에서 20시간 배양하여 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현을 유도하였다. 이 배양된 셀들을 4°C, 5,000 rpm에서 15분간 원심하여 농축한 다음 20 mL 용균 버퍼(lysis buffer) (10 mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0)로 재부유 한 다음, French press 방법으로 셀을 파쇄하였다. 4°C, 12,000 rpm으로 25분간 원심하여 이 용출액 중에서 수용성 단백질을 농축하였고, AKTA prime FPLC system (GE healthcare, USA) 안에 연결되어 있는 Ni-NTi column을 이용하여 정제를 시작하였다. 반응된 column은 lysis buffer (buffer A)로 세척되었고, 수용성 단백질은 buffer B (10 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 300 mM Imidazole, pH 8.0)의 농도 기울기(gradient concentration)에 따라 분리되었다. 각 분리된 일부(fraction)는 15% SDS-PAGE로 분석되었으며, 정제된 타겟(target) 단백질은 buffer

C (PBS buffer, GE healthcare, USA)를 이용하여 투석한 다음 centrcon (cut-off 30 kDa, Amicon, Millipore, Germany)을 이용하여 농축되었다. 마지막으로 재조합 lysozyme-HJP34 단백질은 단백질 정량법(Bradford protein assay)에 의해 농도가 측정되었다.

웨스턴 블로팅(Western blotting)

정제되고 농축된 재조합 lysozyme-HJP34 단백질은 15% SDS-PAGE에 의해 로딩(loading)된 후 PVDF 멤브레인(Millipore, Germany)으로 이 용합재조합 단백질을 이동시킨 후 anti 6-his polyclonal antibody (안티 6-히스 다중클론항체) (BD, France)를 1:6,000으로 희석하여 일차 항체로 반응시켰다. 세척 후 HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Enzo, USA)를 1:12,000으로 희석하여 이차 항체로 반응시키고 ECL 용액(SurModics, USA)으로 이 용합 단백질 밴드를 확인하였다.

최소 성장억제농도(minimum inhibitory concentrations; MICs)

NCCLS에서 추천하는 미량액체 배지 희석법을 약간 변형하여 사용하여 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli* 균주인 HJL624, 636, 712 균주, APP 균주인 HJL9, 11, 33, 34, 38, 42 균주, *S. suis* 균주인 HJL1221, 1305, 1307 균주, *C. perfringens*의 세균주인 HJL916, 989, 987 균주에 대한 최소 성장억제농도를 측정하였다(CLSI, 2008). 즉, 재조합 lysozyme-HJP34 단백질의 희석농도는 1,200 µg/mL부터 18.75 µg/mL까지 두배씩 단계 희석하였다.

실험 동물

3주령의 국내 사육 돼지 중 25두를 구입하여 실험에 사용하였다. 구입된 모든 자돈은 그룹별로 구획된 공간에서 사육되었으며, 구입 농장의 백신 프로그램에 의해 백신 되었다. 하지만 돼지 부종병, 돼지 흉막 폐렴, *Streptococcus* 백신은 접종하지 않았다. 상업용 사료로 사육되었고 음료는 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 사육되었다.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질 급여

25마리의 국내 사육종 자돈을 5개 그룹으로 나누어 따로 격리하여 사육하면서 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 총 함량이 0.1%가 되도록 혼합하여 급여하였다. 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 급여 시기는 생후 3주령부터 4주간 매일 사료와 혼합하여 급여하였고 다른 그룹은 재조합 lysozyme-HJP34 단백질과의 혼합 없이 사료만 급여하였다. 그룹 A와 B 그리고 C의 경우에는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 비 급여군으로 현재 돼지 사료로 시판되고 있는 자돈용 사료를 급여하였고, 그룹 D와 E 그룹은 재조합 lysozyme-HJP34 단백질 급여 그룹으로 동일 사료에 재조합 lysozyme-HJP34 단백질이 0.1%가 되도록 혼합하여 매일 하루에 두 번씩 일정량을 급여하였다.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 혼합 급여에 따른 안전성 평가

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 혼합하여 급여하는 4주 동안 매일 하루에 두 번씩 사료 섭취량, 설사, 발열, 이상 행동, 폐사 등과 같은 부작용 여부를 관찰하였다.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 혼합하여 급여 후 도전감염에 따른 유효성 평가

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 혼합하여 4주간 급여 한 후에 *E. coli* HJL624 균주를 $1 \times 10^{8.0}$ colony-forming unit (cfu)/1 mL 농도로 희석하여 2 mL를 경구로, 그리고 APP HJL67, HJL263 균주와 *S. suis* 균주 HJL1305 균주를 각각 $1 \times 10^{8.0}$ cfu/1 mL 농도로 희석하여 각각의 비강에 1.5 mL씩 비강 접종하였다. 대조군인 그룹 A의 모든 자돈은 동량의 멸균 PBS로 같은 방식으로 접종하였다. 공격접종 만 24시간 후부터 그룹 C와 D 그룹의 생존한 모든 자돈에 대해 광범위 항생제(Vetrimoxin[®] L.A. [아목시실린삼수화물], 세바코리아)를 10 kg당 1 mL씩 근육접종하였고 48시간 뒤에 10 kg당 1 mL씩 추가 접종하였다. 도전감염 96시간 후에 경구용 광범위 항생제인 유한키목신 파워(유한양행)를 체중 10 kg당 1g씩을 사료에 혼합하여 그룹 C와 D에 삼일 동안 매일 급여하였다. 공격접종 후 모든 자돈은 발열, 설사, 이상 반응 또는 이상행동, 폐사 여부를 14일간 매일 하루에 두 번씩 관찰하였다. 도전감염 후 14일째 생존한 모든 자돈을 안락사시킨 후 부검을 통해 육안적 소견 검사 및 공격 접종균을 분리하였다. 즉, 회장 및 직장 swab

가검물은 EMB agar에, 이상 소견이 관찰된 폐 swab 가검물은 Chocolate agar 및 6% sheep blood가 함유된 Columbia agar에 각각 도말 접종 되었으며, 헤파린 처리된 혈액 100 µL씩은 Chocolate agar 및 6% sheep blood가 함유된 Columbia agar에 각각 도말 접종하여 도전감염 균주를 분리를 시도하였다.

각 plate에서 분리된 균주들은 도전감염 균주인지 확인하기 위해 Table 2에서 제시한 각 균주 확인용 프라이머로 각 도전감염 균주 여부를 최종 확인하였다.

결 과

재조합 lysozyme-HJP34 단백질 발현

15% SDS-PAGE로 발현 재조합 단백질을 확인하여 본 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 재조합 lysozyme-HJP34 단백질이 발현되었음이 확인되었다. 또한 lysozyme activity를 측정하여 50,000 unit/g이 되도록 희석하여 동결건조하여 사료첨가제로 사용하였다.

웨스턴 블로팅(Western blotting)

정제되고 농축된 재조합 lysozyme-HJP34 단백질은 15% SDS-PAGE에 의해 loading 된 후 PVDF membrane (Millipore, Germany)으로 이 재조합 단백질을 이동시킨 후 anti 6-his polyclonal antibody (BD, France)를 이용하여 발현 여부를 확인하여 본 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 재조합 단백질 밴드가 확인되었다.

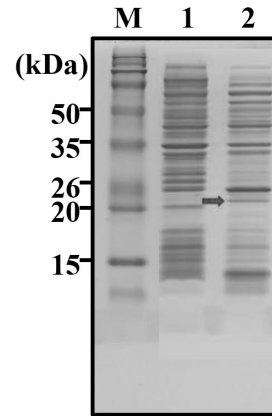


Fig. 2. Expression of recombinant lysozyme-HJP34 protein. The expression of the recombinant protein was detected using 15% SDS-PAGE. The recombinant protein overexpression was induced by 0.5 mM IPTG at 25°C for 20 h in *E. coli* BL21(DE3) pLysS. M, size marker; lane 1, whole lysate before induction; lane 2, whole lysate after induction. Arrow indicates the recombinant lysozyme-HJP34 proteins.

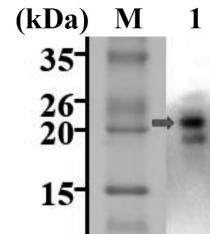


Fig. 3. Expression confirmation of recombinant lysozyme-HJP34 protein. The purified and concentrated recombinant protein was confirmed by Western blot. M, size marker. Arrow indicates the recombinant lysozyme-HJP34 proteins.

Table 2. PCR primers used in this study and their product sizes.

| Target gene | Primer name | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Size | Reference |
|----------------|-------------|------------------------------------|--------|-----------------------|
| F18 | F18-L | TGG CAC TGT AGG AGA TAC CAT TCA GC | 334 bp | Zhang et al, 2007 |
| | F18-R | GGT TTG ACC ACC TTT CAG TTG AGC AG | | |
| Stx2e | Stx2e-L | CGGTATCCTATTCCCAGGAGTTTACG | 599 bp | Zhang et al, 2007 |
| | Stx2e-R | GTCTTCCGGCGTCATCGTATAAACAG | | |
| <i>S. suis</i> | JP4 | GCA GCG TAT TCT GTC AAA CG | 688 bp | Okwumabua et al, 2003 |
| | JP5 | CCA TGG ACA GAT AAA GAT GG | | |
| <i>apxIV</i> | apxIVA1 | TTA TCC GAA CTT TGG TTT AGC C | 418 bp | Zhou et al, 2008 |
| | apxIVA3 | CAT ATT TGA TAA AAC CAT CCG TC | | |
| APP 2 | AP2F | GAG TGT GAT GAT GAT GCT CTG GTT C | 247 bp | Bossé et al, 2014 |
| | AP2R | TAC CAA TAA CTG TTG CAA CTA ACG C | | |
| APP 5 | AP5F | AGC CAC AAG ACC CGA ATG GTA TAA TG | 825 bp | Jessing et al, 2003 |
| | AP5R | CCA TCA AAT GCA GCT TCA AGG AGC | | |

MICs

Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis*, *C. perfringens*에 대한 재조합 lysozyme-HJP34 단백질의 MICs는 각각 75 µg/mL, 300 µg/mL, 75 µg/mL, 35.5 µg/mL으로 관찰되었다.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질 사료 첨가제 급여 후 안전성

재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 혼합하여 4주 동안 급여하는 동안 대조군에 비해 사료 섭취량은 동일하였으며, 설사, 발열, 이상 행동, 폐사 등과 같은 부작용이 관찰되지 않았다.

재조합 lysozyme-HJP34 단백질의 도전감염 후 질병 저감 효과

모든 이유 자돈은 급여 후 4주 째에 경구 및 비강으로 도전 감염되었다. 그룹 B에 속하는 자돈 5두는 도전감염 하루 후부터 폐사하여 3일 째에 모든 자돈이 폐사하였고, 그룹 C (재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 급여하지 않고 상업용 사료만 급여 군)에서는 도전감염 24시간 후부터 항생제를 접종하고 급여한 그룹 그리고 그룹 D (재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합하여 급여 후 항생제 접종 및 경구 투여 군)에서는 도전감염 후 24시간 내에 1두에서만 폐사하였다. 그리고 그룹 E

(재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합 급여 군)에서는 도전감염 하루 후에 1두에서 그리고 도전감염 후 4일 째에 1두가 폐사한 후 실험이 끝나는 도전감염 14일째까지 모두 생존하였다(Fig. 4). 도전감염 후 생존한 자돈의 증체율을 살펴보면 도전감염 후 7일 째에는 각 그룹별(그룹 B는 제외 도전감염 3일 만에 모든 자돈 폐사) 증체율은 각각 6.6 kg±1.95, 2.5 kg±1.0, 4.75 kg±0.96, 2.67 kg±1.53이었고, 도전감염 후 14일 째에는 각 그룹별(그룹 B는 제외 도전감염 3일 만에 모든 자돈 폐사) 증체율은 각각 4.4 kg±1.81, 4.5 kg±1.0, 4.25 kg±0.96, 3.67 kg±2.08이었다(Fig. 5). 또한 실험이 끝나는 도전감염 후 14일 째에 생존한 모든 자돈을 부검하여 육안적인 소견을 살펴본 결과, 그룹 E의 생존한 자돈 3두 모두에서 폐에 경미한 이상 소견이 관찰되었고, 한 자돈에서 APP type 5형이 그리고 자돈 2두에서 *S. suis*가 각각 분리 동정되었다. 하지만 그룹 C~E의 모든 자돈의 소장 및 대장 그리고 장간막 림프절 등에서는 아무런 이상소견이 관찰되지 않았다.

고 찰

항생제는 지난 60년 이상 양돈산업에서 성장촉진용으로 사료에 첨가되어 사용되어 왔다. 사료에 항생제를 첨가하면서 세균 감염 및 질병을 감소시키면서 사료의 효율성을 증가시켜 양돈산업에 경제적인 이익을 주었다(Verstegen과 Williams, 2002). 하지만 항생제의 오남용으로 인해 식육에서의 항생제 잔류와 내성균 출현은 사회적인 관심과 그 중요성이 점차 증가하

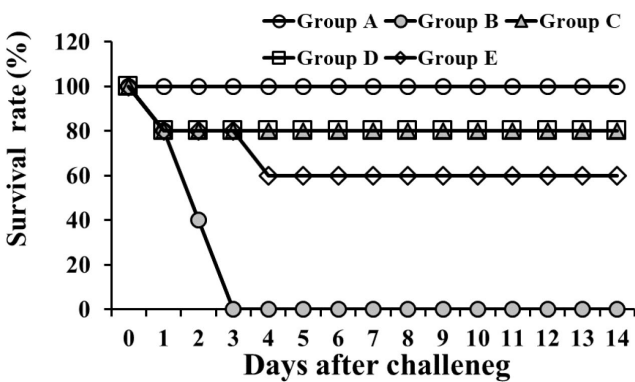


Fig. 4. Survival rates of piglets challenged with virulent Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* (except chickens in group A only). Groups A (○), B (●), and C (▲) piglets were fed with commercial feed; groups D (□), and E (◇) piglets were fed with the commercial feedstuff containing 0.1% of 50,000 unit/g the recombinant lysozyme-HJP34. All piglets in groups B~E were challenged with virulent Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* strains. Groups C and D were treated with antimicrobial from 24 h after challenge.

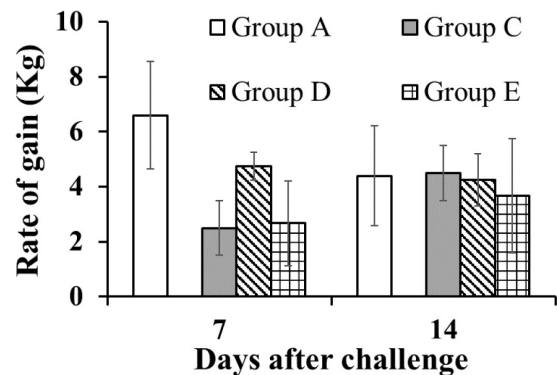


Fig. 5. Rate of gain of piglets after challenge with virulent Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* (except chickens in group A only). Groups A (□), B, and C (▲) piglets were fed with commercial feed; groups D (□), and E (◇) piglets were fed with the commercial feedstuff containing 0.1% of 50,000 unit/g the recombinant lysozyme-HJP34. All piglets in groups B~E were challenged with virulent Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* strains. Groups C and D were treated with antimicrobial from 24 h after challenge.

고 있다(Kim 등, 1997; Han 등, 2015). 따라서 최근에는 항균력이 우수한 대체제 발굴에 많은 연구가 진행 중에 있다(Jeong 등, 2009; Lee 등, 2011; Oliver와 Wells, 2015; Han 등, 2016; Jung 등, 2021).

라이소자임 또한 항균력을 가지고 있으며, 돼지의 성장 및 건강 증진을 위해 사용될 수 있음이 이미 알려져 있다. 하지만 라이소자임은 주로 그람 양성균을 사멸시켜 위장관 내 생태계를 변화시켜 위장관 내 세균총을 변화시킬 수 있다(Oliver와 Wells, 2015). 더불어 Wells 등(2015)은 돼지에서 라이소자임이 장관독소형대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)으로 도전감염한 경우 감소되었음이 보고하였지만, 시가독소 생산 대장균(Shiga toxinw producing *E. coli*, STEC)은 라이소자임이나 항생제투여에도 균수를 감소시킬 수 없었다고 보고하였다(Oliver와 Wells, 2015). 따라서 이유 자돈에서 문제가 되고 있는 시가독신 대장균 등에 대한 항균력을 높이기 위해 그람 음성균 및 그람 양성균 등에 항균력을 가지고 있는 천연 항균 펩타이드의 단점을 보완한 유전자 재조합 항균 펩타이드를 라이소자임과 융합시켜 재조합 단백질로 대량 발현할 수 있는 시스템을 개발하였다. 이렇게 발현된 재조합 단백질의 항균력은 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis*, *C. perfringens*에 대한 실험실적 항균 효능이 조사되었으며, 그 결과 재조합 lysozyme-HJP34 단백질은 그람 양성균뿐만 아니라 그람 음성균, 특히 시가독소 생산 대장균인 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*에 대해서도 탁월한 항균력이 확인되었다.

자돈에서 문제가 되는 병원성 세균에 대한 실험실적 항균력을 바탕으로 이유자돈의 성장 촉진용 사료 첨가제로서의 가능성을 확인하기 위해 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료 첨가제로 제작하여 사용화 되어 있는 이유 자돈용 사료에 0.1%가 되도록 혼합하여 이유자돈에 4주간 급여한 후 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli* 균주는 경구로, APP 균주와 *S. suis* 균주는 혼합하여 비강으로 도전감염하여 본 결과, 재조합 단백질 투여 없이 사료만 급여한 그룹은 도전감염 3일 만에 모든 자돈이 폐사한 반면, 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 혼합하여 접종한 그룹에서는 도전감염 후 14일까지 단지 5두 중 2마리만 폐사하였다. 그리고 도전감염 후 24시간째부터 광범위 항생제를 투여한 그룹과 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 혼합하여 급여하고 도전감염 후 24시간째부터 광범위항생제를 접종한 그룹에서는 한 두씩만 폐사하였다. Oliver와 Wells (2015)의 보고에 따르면 라이소자임은 시가독소 생산 대장균의 수는 감소시키지 않았으며, *Streptococcaceae*는 균을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료에 혼합하여 급

여한 결과 분변, 회장 등에서 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli* 균주는 분리되지 않았다. 하지만 *S. suis*의 경우에는 항생제를 투여한 그룹에서는 균이 분리되지 않은 반면, 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 섞어 급여한 그룹의 자돈 3두 중 2두의 폐 부위에서만 적은 수의 *S. suis*가 분리되었으며, 단지 1두의 폐에서 APP 5형 균주가 분리되었다. 하지만 대조군에서는 모든 폐에서 APP 5형 균주와 *S. suis*의 균이 분리되었고 2두에서는 혈액에서도 APP 및 *S. suis* 균주가 각각 분리되어 재조합 lysozyme-HJP34 단백질에 의해서 APP 및 *S. suis* 또한 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

더불어 도전감염 후 각 그룹별 증체율을 살펴보면 사료만 급여한 그룹은 도전감염 후 3일 만에 모든 자돈이 폐사하여 증체율을 비교할 수는 없었지만, 각 그룹을 도전감염 후 7일째와 14일째에 각 그룹별 증체율을 비교하여 보면, 도전감염 후 7일째에는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합하여 급여 후 항생제를 접종하고 급여한 그룹에서 증체율이 가장 높았으며, 도전감염 후 14일째에는 항생제만을 투여한 그룹에서 증체율이 가장 높았다. 하지만 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합하여 급여 후 항생제를 접종하고 급여한 그룹에서도 높은 증체율을 보였고, 더불어 도점감염 후 실험이 끝나는 시점에서는 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합하여 급여 후 항생제를 접종하고 급여한 그룹의 자돈이 다른 그룹의 자돈에 비해 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 항생제를 접종한 그룹과 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 투여한 그룹에서의 증체율이 거의 비슷하게 증가하였다. 이상의 결과로 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 같이 혼합하여 급여할 경우 이유자돈에 있어 세균성 질병 저감 효과뿐만 아니라 유해성 세균의 사멸 효과 내지는 질병 저감 효과로 인해 사료 효율이 높아져 자돈 증체율에 도움을 줄 수 있어 양돈 산업에 경제적인 도움이 될 것으로 생각된다.

결론

결론적으로 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis*, *C. perfringens*에 대한 재조합 lysozyme-HJP34 단백질의 항균 효능을 미량액체배지 희석법으로 관찰하여 본 결과, 각 세균에 대한 MICs는 각각 75 µg/mL, 300 µg/mL, 75 µg/mL, 35.5 µg/mL으로 관찰되어 그람 음성 양성 세균에 상관없이 항균효과가 있음이 확인되었다. 더불어 재조합 lysozyme-HJP34 단백질이 이유 자돈에서 주요 세균성 감염에 대한 질병 저감용 사료 첨가제로서의 가능성 여부를 알아보기 위해 시판용 이유자돈용 사료

에 1%가 되도록 혼합하여 급여 후 이유 자돈에 Stx2e⁺ F18⁺ *E. coli*, APP, *S. suis* 균주를 혼합하여 도전감염하여 질병 저감 효능을 확인하여 본 결과, 일반 사료만을 급여한 후 도전감염을 수행한 그룹의 자돈은 모두 폐사한 반면 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 혼합하여 급여한 자돈에서는 5두 중 2두만이 폐사하였다. 또한 도전감염 후 만 24시간째부터 항생제를 투여한 그룹보다도 재조합 lysozyme-HJP34 단백질을 사료와 함께 급여한 그룹에 항생제를 접종한 그룹의 자돈에서 증체률이 가장 높았다.

이러한 결과를 종합하여 보면 재조합 lysozyme-HJP34 단백질은 그람 양성뿐만 아니라 그람 음성 세균 특히 시거독소 생산 대장균에 대해서도 항균효과가 확인되었으며 이유자돈에서 세균성 질병 저감을 위한 사료 첨가제로 가능성이 있음이 확인되었다. 하지만 보다 효과적인 질병 저감을 위해서는 다른 세균들에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 정부의 재원으로 농림식품기술기획평가원(Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry, IPET)의 지원을 받아 연구되었습니다(No. 320070-2).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Jeong-Hee Yu, <https://orcid.org/0000-0003-3232-132X>

Yeong-Ju Yu, <https://orcid.org/0000-0002-2860-5023>

Seon-Min Kim, <https://orcid.org/0000-0002-6977-9820>

Jin Hur, <https://orcid.org/0000-0003-2658-0747>

REFERENCES

- Boman HG. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 61-92.
- Boman HG. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254(3): 197-215.
- Bossé JT, Lia Y, Angenb Ø, Weinertc LA, Chaudhuric RR, Holdend MT, Williamsone SM, Maskelld DJ, Tuckerd AW, Wrenf BW, Rycroftg AN, Langforda PR, BRaDP1T consortium. 2014. Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12. *Clin Microbiol* 52(7): 2380-2385.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198: 169-184.
- Carballar-Lejarazú R, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F, Ramos-Castañeda J, Possani LD, Zurita-Ortega M, Reynaud-Garza E, Hernández-Rivas R, Loukeris T, Lycett G, Lanz-Mendoza H. 2008. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell Mol Life Sci* 65(19): 3081-3092.
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. 2010. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 16:228-231.
- Cooper DM, Swanson DL, Gebhart CJ. 1997. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet Microbiol* 54(1): 47-62.
- Ellison III RT, Giehl TJ. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 88: 1080-1091.
- Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. 2017. Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicol* 130: 91-103.
- Haines LR, Thomas JM, Jackson AM, Eyford BA, Razavi M, Watson CN, Gowen B, Hancock RE, Pearson TW. 2009. Killing of trypanosomatid parasites by a modified bovine host defense peptide, BMAP-18. *PLoS Negl Trop Dis* 3(2): e373.

- 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(1): 25-30.
- Han SM, Kim JM, Yeo JH, Hong IP, Woo SO, Lee KG, Kweon HY. 2014. Origin and effective ingredient standards of honeybee venom as natural antibiotic ingredients. *Korean J Vet Serv* 37(2): 123-129.
- Han SM, Kim SG, Hong IP, WooSO, Jang HR, Lee KW. 2016. Antibacterial effects of purified bee venom against some pathogenic bacteria isolated from dead chickens. *Korean J Vet Serv* 39(3): 159-166.
- Hays VW, Muir WM. 1979. Efficiency and safety of feed additive use of antibacterial drugs in animal production. *Can J Anim Sci* 59: 447-456.
- Henzler-Wildman KA, Martinez GV, Brown MF, Ramamoorthy A. 2004. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43(26): 8459-8469.
- Jeong JW, Jeong CW, Kim JT, Yang WJ, Ahn MJ, Kim BH, Kim JA, Shin T. 2009. Antibacterial activity of *Callophyllis japonica*-methanol extracts against the pathogenic bacteria from swine. *Korean J Vet Serv* 32(4): 353-359.
- Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ. 2003. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 and 6. *J Clin Microbiol* 41(9): 4095-4100.
- Jung S, Oh SI, Lee HG, Jung YH, Hur TY, Han S, Baek KJ, Cho A. 2021. Antibacterial effect of bee venom against Gram-positive and negative bacteria isolated from mastitis in dairy cattle. *Korean J Vet Serv* 44(3): 169-174.
- Kawano M, Namba Y, Hanaoka M. 1981. Regulatory factors of lymphocyte-lymphocyte interaction. I. Con A-induced mitogenic factor acts on the late G1 stage of T-cell proliferation. *Microbiol Immunol* 25: 505-515.
- Kim ST, Kim S, Kim SY, Son JK. 1997. Comparison of fatty acid composition of *Staphylococcus* sp. isolated from bovine mastitis milk. *Korean J Vet Serv* 20(1): 37-45.
- Koehbach J, Craik DJ. 2019. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends Pharmacol Sci* 40(7): 517-528.
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 60: 2651-2668.
- Kwon AJ, Moon JY, Kim WK, Kim S, Hur J. 2016. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *J Vet Med Sci* 78(10): 1541-1548.
- Lee WW, Son SK, Lee GR, Kim GH, Kim YH. 2011. Antimicrobial effects of garlic extract against pathogenic bacteria. *Korean J Vet Serv* 34(2): 167-178.
- Oliver WT, Wells JE. 2015. Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *J Anim Sci Biotechnol* 6(1): 35.
- Salmon SA, Watts JL, Case CA, Horrman LJ, Wegener HC, Yancey RJ Jr. 1995. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the united states, canada, and denmark. *J Clin Microbiol* 33(9): 2435-2444.
- Theppangna W, Murase T, Tokumaru N, Chikumi K, Shimizu E, Otsuki K. 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J Vet Med Sci* 69(12): 1235-1239.
- Verstegen MW, Williams BA. 2002. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim Biotechnol* 13(1): 113-127.
- Vila-Farres X, Garcia de la Maria C, López-Rojas R, Pachón J, Giralt E, Vila J. 2012. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 18(4): 383-387.

- Wang K, Li Y, Xia Y, Liu C. 2016. Research on peptide toxins with antimicrobial activities. *Ann Pharmacol Pharm* 1: 1006.
- Wells JE, Berry ED, Kalchayanand N, Rempel LA, Kim M, Oliver WT. 2015. Effect of lysozyme or antibiotics on faecal zoonotic pathogens in nursery pigs. *J Appl Microbiol* 118(6): 1489-1497.
- Wilmes M, Sahl HG. 2014. Defensin-based anti-infective strategies. *Int J Med Microbiol* 304(1): 93-99.
- Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci* 68: 2161-2176.