

Inactivation of Pathogenic *Escherichia coli* Using Crude Extract of Immunized Silkworm

Jong Woo Park^{†*}, Chan Young Jeong[†], Chang Hoon Lee, Sang Kuk Kang, Wan-Taek Ju, Seong-Wan Kim, Nam-Suk Kim and Kee Young Kim

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeollabuk-do 55365, Korea

Received July 14, 2021 / Revised August 18, 2021 / Accepted August 18, 2021

Swine diarrhea is a livestock disease that causes huge economic losses to pig farms. In general, diarrhea occurs because of the proliferation of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*). The toxins produced by the proliferated *E. coli* cause edema in pigs. Although the proliferation of these coliforms can be prevented by using a vaccine, the vaccines containing chemically produced dead bacteria are not very effective, making it difficult to control the proliferation of *E. coli*. Therefore, there is a need to develop new, more effective vaccines. In this study, we prepared killed F4+ and F18ab+ *E. coli*, which induce diarrhea and edema in pigs, using the extracts of immune-induced silkworms containing antimicrobial peptides and examined their availability as a killed-bacteria vaccine. First, the antimicrobial activity analysis of the prepared immune-induced silkworm extract was conducted using the radial diffusion assay. The results showed high activity against both F4+ and F18ab+ *E. coli*. The production efficiency of *E. coli* dead cells was determined using the colony-counting method. The concentration of the *E. coli* dead cells was the highest (50 mg/ml) when treated at 4°C. In addition, the analysis of the prepared dead cells using a transmission electron microscope confirmed that *E. coli* leaked out of the cytoplasm and the cell membrane remained intact. Therefore, F4+ and F18ab+ *E. coli* produced using immune-induced silkworms extract are considered to be highly available as bacterial ghost vaccines that can help prevent swine diarrhea and the resulting edema.

Key words : Antimicrobial peptides, killed bacteria, silkworm, swine edema

서 론

장내독소형 대장균(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)은 사람을 포함한 다양한 동물에서 설사 및 장출혈 등을 동반한 세균성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 이와 같은 세균 감염 시 사람의 경우 항생제 처방을 통한 치료 및 증상 완화가 가능하지만, 동물에서는 안전성 및 경제성 문제로 인하여 치료가 어려운 실정이다. 이로 인해 세균성 질환은 축산업계에서 생산성 저하의 주요 원인으로 지목되고 있으며, 특히 양돈업계에서는 장내독소형 대장균에 의한 신생자돈 및 이유자돈의 설사에 따른 성장 지연 및 폐사로 인하여 매년 심각한 경제적 손실이 발생하고 있는 실정이다[2].

장내독소형 대장균은 일반적으로 K88 (F4), K99 (F5), F6 (Fas), 및 F41 등의 선모(fimbria)를 가지고, 이를 이용하여 장상피세포 표면에 부착한 후 증식하며 내열성 장독소(heat-sta-

ble enterotoxin; ST) 및 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin; LT)를 분비하여 심각한 설사를 유발한다[13, 14, 19]. 이와 같은 장내독소형 대장균에 의한 포유 자돈에서 대부분 감염은 임신 모돈에 대한 백신 예방접종을 통해 예방할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 백신은 포르말린을 이용하여 K88, K99, F4, 및 F41 장내독소형 대장균을 불활성화하고 균체 또는 선모의 일부 소단위체를 항원으로 이용한다[3]. 하지만 이처럼 배양된 대장균에 화학적 처리를 통해 생산하는 전통적인 불활성화 사균백신은 박테리아 표면 항원들의 이화학적, 구조적 특성에 영향을 미치기 때문에 면역 획득에 한계가 존재하는 것으로 알려져 있다[21]. 또한, Szostak 등[18]은 화학적인 방법을 통해 불활성화된 대부분 백신이 낮고 짧은 기간의 면역 반응을 유도한다고 보고하였으며, 전통적인 사균백신은 효과적인 면역유도를 위하여 강력한 면역 보강제(adjuvant)와 더불어 다회 접종이 필요하기 때문에 이에 따른 알레르기 반응 및 접종 부위에서의 종양 발생이 빈번하게 관찰되는 등 위험성이 노출되고 있어 새로운 형태의 사균백신이 필요한 실정이다[1].

대부분의 동식물 및 곤충 등에서 발견되는 항균펩타이드(Antimicrobial peptides)는 체액성면역반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으며, 이 항균펩타이드는 세균에 대해 폭넓은 효과(broad-spectrum)를 가지고 있다고 알려져 있다[9]. 곤충에서는 약 150여종 이상의 항균펩타이드가 발견되고 있으며, 그중 누에에서는 Cecropin, Depensin, Moricin, Gloverin,

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-62-238-2913, Fax : +82-63-238-3832

E-mail : jwpark0824@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Attacin, Leboicin, 및 Lysozyme 등의 항균펩타이드가 발견되고 있다[20]. 이와 같은 대부분 항균펩타이드는 양전하를 띠는 아미노산으로 구성되어 있어 음전하를 띠는 세포벽과 정전기적 상호작용을 통해 결합할 수 있으며, 세포막에 구멍을 만들어 물질 수송을 저해하고 세포 내 세포질 성분을 유출시켜 결국 세포가 죽음에 이르게 한다[9]. 그뿐만 아니라 이와 같은 항균펩타이드는 곤충 면역체계에 대한 인위적 자극으로 발현 촉진이 가능하여 이를 이용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[9, 10].

본 연구에서는 식품 첨가제 및 건강기능식품으로 이용되는 N-acetyl-D-glucosamine을 면역유도제로 이용하여 누에 항균펩타이드의 발현량을 증가시키고, 항균펩타이드가 포함된 누에 추출물을 제작하여 돼지에서 부종병을 유발하는 병원성 대장균의 불활성화 및 사균백신으로서 이용가능성에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

누에 사육 및 면역유도

실험에 사용한 누에는 휴면계통 보급 품종인 백옥잠(잠 123×124)을 이용하였으며, 누에 사육은 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육기준(온도, 24~27℃, 습도, 70~90%) 준하여 신선한 뽕잎을 급여하고 25℃, 16L8D 조건에서 사육하였다. 사육된 누에의 면역을 유도하기 위하여, 5령 5일째의 누에 1 kg 당 100 ml의 10% acetone을 누에 표피에 분무 후 25℃에서 30분간 건조 후 누에 1 kg당 100 ml 0.01% N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc; Sigma, USA), 1% citric acid (Sigma, USA)를 균일하게 분무하고 누에 표피의 면역유도제가 건조될 때까지 방치하였다. 표피의 수분이 건조된 누에에 신선한 뽕잎을 급여하면서 20시간 동안 추가 사육 후 수확 및 열풍건조하여 면역유도누에를 생산하였다.

RT-PCR을 이용한 면역 유도 검증

누에의 면역을 유도한 후 항균펩타이드 유전자 발현의 변화를 관찰하기 위하여, 일반 누에와 면역이 유도된 누에로부터 RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA는 500 ng의 RNA와 PrimeScript 1st strand cDNA 합성 키트(TaKaRa, Japan)를 이용하여 합성 후

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 및 quantitative real time-PCR (qPCR)에 이용하였다. 항균펩타이드 유전자의 발현 분석을 위한 프라이머(Table 1)와 TB Green Premix EX Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 qTOWER3 (Analytik Jena, Germany)를 통해 각 유전자를 증폭하고, *BmGAPDH* 유전자를 이용하여 각 시료의 표적 유전자 발현을 표준화하고 일반 누에를 기준으로 ddCt 방법을 이용하여 유전자의 발현을 비교하였다.

면역유도누에 추출물 제작

면역유도누에 추출물을 제작하기 위하여, 건조된 면역유도 누에 30 g을 믹서기(Hanil, Korea)를 이용하여 분쇄하고 300 ml의 0.3% acetic acid (Duksan, Korea)를 첨가하여 25℃에서 1시간 동안 교반 후 95℃에서 10분간 열처리를 하였다. 이후 원심분리기(Tomy, Japan)를 이용하여 4℃에서 10,000 ×g로 40분간 원심분리한 후 상등액을 수거하고, ammonium sulfate (Sigma, USA)를 60%까지 첨가하여 2시간 동안 교반하였다. 추출액 내에 존재하는 항균펩타이드 및 단백질은 10,000 ×g에서 40분간 원심분리하여 회수하고 30 ml의 0.3% acetic acid에 용해시켜, PD-10 column (Cytiva, Sweden)을 이용한 탈염 후 동결건조시켰다.

면역유도누에 추출물의 항균활성 검증 및 사균체 제작

면역유도누에 추출물의 항균활성을 검증하기 위하여 동결 건조된 추출물을 PBS를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 용해한 후 희석하여 F4+ (HJL651) 및 F18ab+ (HJL573) 대장균에 대해서 Steinberg & Lehrer [11]에 따른 방사선 확산 분석법(radial diffusion assay)을 수행하였다. 멸균된 RDA용 underlay gel (10 mM sodium phosphate, 1 mM sodium citrate, pH 7.4, 1% agarose, 0.03% TSB)에 배양된 대장균(4×10⁶ cfu/ml)을 혼합하고, 100 mm 플레이트에 굳혔다. 이후 3 mm의 구멍을 내어 농도별 시료 10 µl을 주입하고, 37℃에서 3시간 배양 후 overlay gel (6% TSB, 1% agarose)을 부어 굳힌 후 37℃에서 18시간 배양하고 생육억제환의 크기로 항균활성을 비교 분석하였다.

또한 추출물 최적 처리 농도 구멍 및 사균체 제작을 위하여, 배양된 균을 원심분리(4,000 ×g, 10분)하여 수집하고 PBS를 이용하여 3회 세척 후 OD₆₀₀=0.3이 되도록 희석한 후, 추출물

Table 1. Primers used in RT-PCR

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Gene Acc. No.
GAPDH ^a	GCTGGAATTTCTTTGAATGAC	CAATGACTCTGCTGGAATAACC	NM_001043921
Moricin	ATGCTCTGGTGCATGTAGTA	TTGAAAACATCGTTGGCTGTAC	AB006915
CecA ^b	CTTCGTCTTCGCGTTGGT	AAGGATTTTCGCTTGCCCTAT	NM_001043997
AttA1 ^c	TCACAGTGAACCTCGGATGGA	CGTGCCCGTTTACATTGTCC	NM_001043541
Glv2 ^d	GCACCTTTGGGACAAAACGAT	TGGCTTGTGCATTCTTGTC	NM_001044218

^aGlyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase; ^bCecropin A; ^cAttacin A1; ^dGloverin 2

을 처리하여 4℃에서 12시간 또는 24시간 동안 배양 후, 식품 공전에 제시된 방법에 따른 평균계수법을 이용하여 생균수를 분석하였다. 시료를 무작위 10배 단계 희석하여 준비된 100 mm 표준천배지에 도말하고, 37℃에서 12시간 이상 배양 후 평판 당 30~300개의 집락이 형성된 평판을 선정하여 계수 하였다.

면역유도누에 추출물을 이용한 사균체 제작 후 Chlorhexidine digluconate (CHX)에 의한 잔존 생균의 불활성화를 관찰하기 위하여 1%의 CHX (Sigma, USA)를 25℃에서 1시간 처리하고 원심분리(4,000 ×g, 30분)를 통하여 균체를 회수하고 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 또한 세포의 불활성화 여부를 확인하기 위하여 사균체 원액과 10배 단계 희석액 각각 100 µl를 고체 배지 도말 후 배양하고 생균수를 분석하였다.

전자현미경을 이용한 사균체 검증

면역유도누에 추출물 처리를 통해 제작된 사균체의 세포벽 유무 및 형태적 변화를 판단하기 위하여, 면역유도누에 추출물 처리 전후의 F4+ 및 F18ab+ 대장균 형태를 Lv 등[11]의 방법에 따라 투과전자현미경(Hitachi, Japam)을 이용하여 분석하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균값(mean value) ± 표준편차(SD)로 나타내었으며, IBM SPSS Statistics 23 (IBM, USA)를 이용한 일원배치 분산분석(Oneway Analysis of Variance; ANOVA)을 실시하고, 각 평균값의 유의성(p<0.05)은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였다.

결과 및 고찰

항균펩타이드 유전자 발현

누에의 면역유도에 따른 항균펩타이드 유전자의 발현 변화를 분석하기 위하여 면역유도 후 RNA를 추출하고, RT-PCR을 통해 유전자 발현을 분석하여 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 GlcNAc에 의해 면역이 유도된 누에에서 Cecropin, Moricin, Attacin, 및 Gloverin 유전자의 발현이 6~10배 이상 증가하였다. 이는 균류의 세포벽 주성분과 유사한 β-1,4 결합을 가지는 가수분해 산물인 GlcNAc가 누에에서 세균감염에 의한 체액성면역반응 활성화와 유사한 효과를 나타내어 항균펩타이드의 발현을 증가시킨 것으로 판단된다[6, 20]. 일반적으로 누에에서는 그람양성균에 의해서는 Lysozyme, Cecropin, Moricin, Defensin 등의 항균펩타이드의 발현이 증가하며, 그람음성균에 의해서는 Attacin, Gloverin, Lebocin, Moricin, Cecropin 등의 항균펩타이드 발현이 증가한다고 알려져 있다[12]. 따라서 이는 GlcNAc가 그람음성균에 의한 면역유도효과를 모방함으로써 항균펩타이드의 발현을 증가 시킨 것으로 예상할

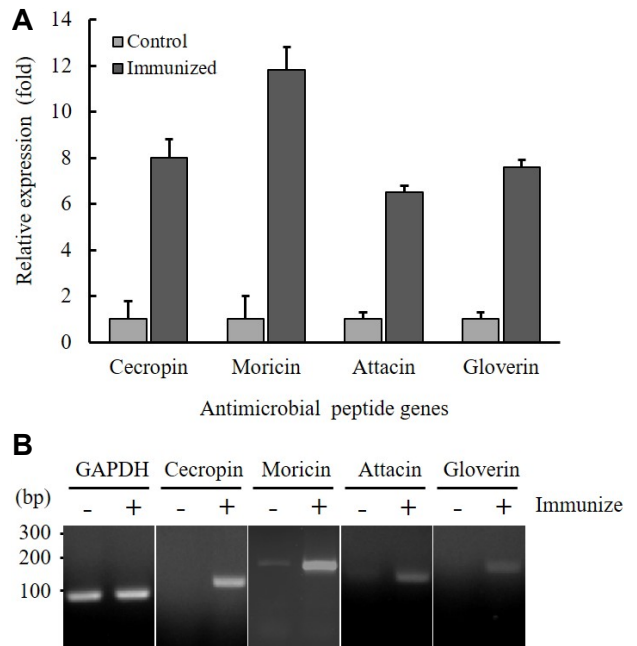


Fig. 1. Relative gene expression of antimicrobial peptide genes in immune-induced silkworm. RNA was extracted from the silkworms, followed by (A) quantitative real time PCR and (B) reverse transcriptase PCR to check the expression of antimicrobial peptide genes. GAPDH was used as a control for normalization. Data is shown as mean ± SD, n = 3.

수 있다. 그뿐만 아니라 일반적으로 곤충의 면역유도를 위해서 세균의 세포벽 추출물 또는 펩티도글리칸을 체강 내에 주사를 필요로 했던 기존의 방법들과 다르게[5, 8], GlcNAc의 표피 감염을 통한 누에의 면역유도 및 항균펩타이드 생산은 새로운 면역유도 기술로서 노동력 절감을 통한 경제성 확보 및 식품 원료인 면역유도제의 이용에 따른 안전성 확보를 통해 산업화 가능성이 높을 것으로 기대된다.

면역이 유도된 누에 추출물의 항균활성

면역이 유도된 누에 30 g으로부터 약 0.6 g의 추출물을 획득하고, F4+ 및 F18ab+ 대장균에 대한 항균활성을 환확산법을 통해 분석하고 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 면역유도누에 추출물은 125 µg부터 1,000 µg까지 농도 의존적인 생육억제환의 크기 확장이 나타났다. 누에 유래의 항균펩타이드가 대장균에 대한 항균 및 생육 저해 활성을 가진다는 사실은 오래전부터 보고 되어왔으며[16], 본 결과에서도 병원성 여부와 상관없이 F4+ 및 F18ab+ 대장균에 대하여 항균활성을 나타냈다. 하지만 항균활성 분석에서 F4+ 대장균에 대한 생육억제환의 크기가 F18ab+ 대장균에 대한 생육억제환의 크기보다 2배 이상 크게 나타나 F4+ 대장균이 면역유도누에 추출물에 더 민감한 것을 확인하였다. 이처럼 항균활성을 나타내는 항균펩타이드를 특정하고 소재로 이용하기 위해서는 정제 및 분석을 위한 추가

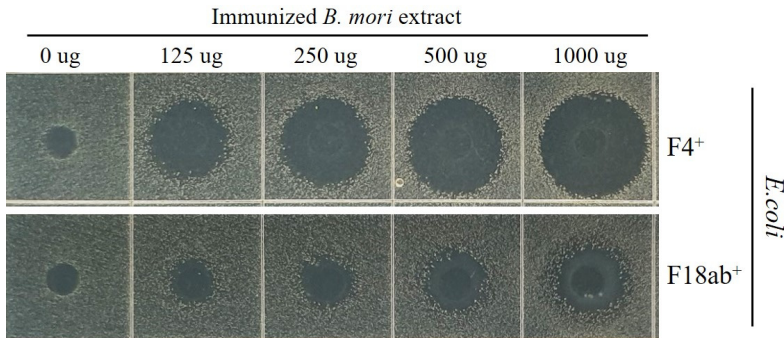


Fig. 2. Antimicrobial activity of immune-induced silkworm extract against F4+ and F18ab+ *E. coli*.

적인 연구가 필요할 것으로 판단된다[15]. 하지만 정제 과정을 거치지 않은 면역유도누에 추출물을 이용하여 사균체 제작이 가능하다면 면역증강용 사료첨가제로서 면역유도누에가 이용되고 있는 만큼 추출물을 이용하여 사균체 제작 후 경구용 사균백신 또는 대장균증 저감 기능성 사료첨가제로서 이용 가능성이 클 것으로 기대된다.

장내 독소형 F4+ 및 F18ab+ 대장균 사균체 제작

항균활성이 검증된 면역유도누에 추출물을 사균체 제작에 이용하기 위하여, PBS에 희석된 F4+ 및 F18ab+ 대장균에 면역유도누에 추출물을 12시간 처리한 후 평판계수법을 통해 생균수를 분석하여 Table 2에 나타내었다. 그 결과 F4+ 및 F18ab+ 대장균 모두 처리 온도에 따라 전혀 다른 결과가 나타났다. 즉 37°C의 반응 조건에서는 면역유도누에 추출물의 농도가 증가함에 따라 생균수가 증가하는 경향을 나타내었으나, 4°C에서는 면역유도누에 추출물의 농도가 증가함에 따라 생균수가 감소하여 50 mg/ml의 농도에서 가장 낮은 생균수가 확인됐다. 하지만 이보다 높은 100 mg/ml의 추출물을 처리했을 때는 37°C에서 반응과 유사하게 오히려 생균수가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Ji 등[7]이 밝힌 바와 같이 누에 추출물에 탄수화물 및 아미노산 등 균의 성장에 필요한 다양한 영양소가 포함되어 있어 면역유도누에 추출물을 대장균 희석액에 첨가하였을 때 미생물 성장을 위한 영양원 역할을 하였으며, 37°C에서 배양 시 균의 증식이 활발하게 일어나 면역유도누에 추출물에 의한 사멸 효과가 관찰되지 않은 반

면, 4°C에서는 낮은 온도로 인하여 균의 증식이 둔화하여 사멸 효과에 따른 생균수의 감소가 나타난 것으로 판단된다.

면역유도누에 추출물 처리 후 생균수가 감소하였으나 모든 균이 사멸되지는 않아 이를 백신 또는 사료첨가제 형태로 사용하기 위해서는 생균에 의한 감염예방을 위하여 잔존 생균에 대한 불활성화 절차가 필요하다고 판단하고, 면역유도누에 추출물을 24시간 처리한 F4+ 대장균 희석액에 CHX를 처리하여 배양 검사 및 생균수를 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, 면역유도누에 추출물 처리 후 남아있던 생균은 CHX 처리에 의하여 완전히 사멸하여 생균이 관찰되지 않았다. 하지만 축산 시설에 대한 소독제로 이용되는 CHX 이용 시 제거 과정이 필요한 만큼 경구용 백신이나 사료첨가제에 이용하기에 적합하지 않은 만큼 추가적인 연구를 통해 열처리를 통한 잔존 생균의 불활성화 방법에 대해 논의해볼 필요가 있다고 판단된다.

사균화에 따른 형태적 변화

면역유도누에 추출물 처리에 따라 불활성화된 대장균을 사균백신으로서 이용가능성을 판단하기 위하여 투사전자현미경을 이용하여 세포의 형태 변화를 분석하였다(Fig. 4). 그 결과, 면역유도누에 추출물을 처리하지 않은 균주는 온전한 세포막과 세포질이 가득 찬 형태로 관찰되었으나, 면역유도누에 추출물을 처리하여 불활성화 시킨 사균체는 세포막에 구멍이 발생되어 있으며, 세포 질 또한 외부로 유출되어 세포의 부피가 줄어든 상태로 확인되었다. 이러한 결과는 Hankok & Sahl가[4] 밝힌 항균펩타이드에 의한 직접 숙주 방어기작 및 LV

Table 2. Changes in viable bacteria following treatment with immune-induced silkworm extract for 12 hr

Extract concentration (mg/ml)	Colony forming unit (log cfu/ml)			
	<i>E. coli</i> F4+		<i>E. coli</i> F18ab+	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	6.58±0.028 ^b	6.52±0.030 ^a	6.63±0.023 ^b	6.58±0.027 ^a
12.5	6.59±0.025 ^{ab}	6.51±0.028 ^a	6.63±0.027 ^{ab}	6.56±0.027 ^a
25	6.62±0.027 ^a	6.50±0.027 ^a	6.67±0.028 ^{ab}	6.54±0.028 ^{ba}
50	6.65±0.027 ^a	6.37±0.027 ^b	6.68±0.027 ^a	6.49±0.027 ^b
100	6.70±0.028 ^a	6.53±0.027 ^a	6.70±0.028 ^a	6.59±0.025 ^a

The data are expressed as log means of three trials (mean ± SD, n=3).

Values in the same column with same superscript letter are not statistically significant (p<0.05) that each other.

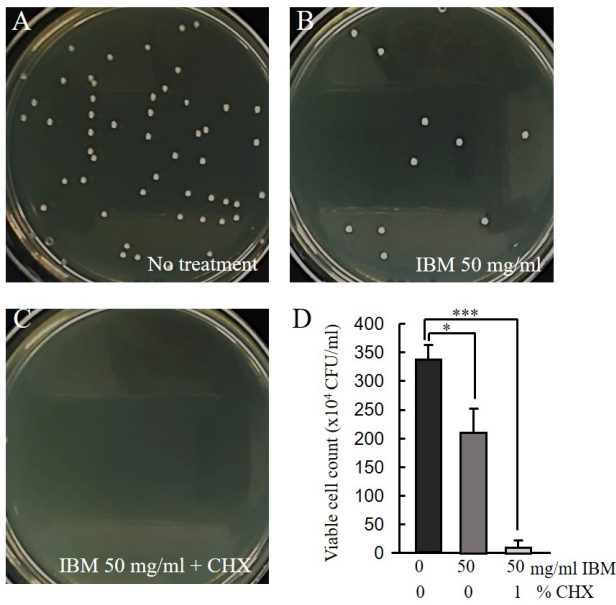


Fig. 3. Antimicrobial activity analysis of IBM. (A-C) A Colony forming of live F4+ *E. coli* were counted in no treated control, 50 mg/ml IBM, and 50 mg/ml IBM with 1% CHX were treated for 24 hr, respectively. (D) The number of *E. coli* colonies was counted according to (A-C). Data are shown as mean ± SD of three experiments and were analyzed by one-way ANOVA, **p*<0.05 relative to the no treated control. IBM, immune-induced *Bombyx mori* extract; CHX, Chlorhexidine digluconate.

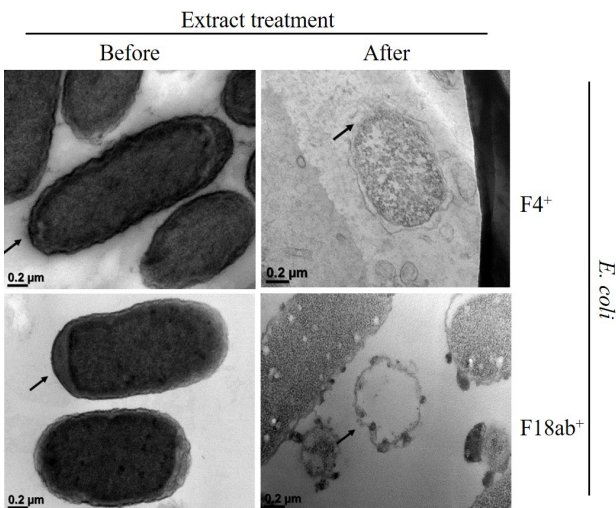


Fig. 4. Transmission electron microscopy image of F4+ and F18ab+ *E. coli* cells after incubation with or without immune-induced silkworm extract. Scale bar 0.2 μm.

등[11]이 발견한 항균펩타이드 처리에 의한 대장균의 형태적 변화와도 일치하는 결과이다.

본 연구 결과와 같이 항균펩타이드가 포함된 조추출물의 처리를 통해 병원성 대장균의 세포막과 표면의 항원을 보유한

불활성화 사균체 제작이 이루어 진다면, 돼지 부종병을 포함한 대장균성 가축 질병 예방을 위한 경구용 사균백신 또는 사료첨가제 제작 기술로서 이용가치가 매우 높을 것으로 판단되며, 향후 추가적인 동물 적용 실험을 통해 세균성 질환의 예방 효과가 검증 된다면 경제적 가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01622501) 및 국립농업과학원 전문연구원 지원사업에 의해 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Brisse, M., Vrba, S. M., Kirk, N., Liang, Y. and Ly, H. 2020. Emerging concepts and technologies in vaccine development. *Front. Immunol.* **11**, 2578.
2. Buzby, J. C. and Roberts, T. 2009. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology* **136**, 1851-1862.
3. Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Belanger, L., Tremblay, C. L., Tremblay, D., Brunelle, M., Wolf, R., Hellmann, K. and Hidalgo, A. 2017. Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic *Escherichia coli* oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in pigs. *Vaccine* **35**, 353-360.
4. Hancock, R. E. and Sahl, H. G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551-1557.
5. Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M. and Sekimizu, K. 2008. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components vis a reactive oxygen species-triggered mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**, 2185-2191.
6. Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B. J., Preston, J. F. and Romeo, T. 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 382-387.
7. Ji, S. D., Kim, N. S., Kweon, H. Y., Choi, B. H., Kim, K. Y. and Koh, Y. H. 2016. Nutrition composition differences among steamed and freeze-dried mature silkworm larval powders made from 3 *Bombyx mori* varieties weaving different colored cocoons. *Int. J. Indust. Entomol.* **33**, 6-14.
8. Kim, S. R., Goo, T. W., Choi, K. H., Park, S. W., Kim, S. W., Hwang, J. S. and Kang, S. W. 2012. Isolation and purification of a cecropin-like antimicrobial peptide from the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamanai*. *J. Seric. Entomol.*

- Sci.* **50**, 145-149.
9. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H. and He, Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 3919-3931.
 10. Li, Z., Ma, Y., Liu, X., Li, Y. and Dai, F. 2019. Antimicrobial peptides in silkworm. *Animal Biol.* **69**, 391-410.
 11. Lv, Y., Wang, J., Gao, H., Wang, Z., Dong, N., Ma, Q. and Shan, A. 2014. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential alpha-helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One* **9**, e86364.
 12. Montesinos, E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**, 1-11.
 13. Nadeau, E., Fairbrother, J. M., Zentek, J., Belanger, L., Tremblay, D., Tremblay, C. L., Rohe, I., Vahjen, W., Brunelle, M. and Hellmann, K. 2017. Efficacy of a single oral dose of a live bivalent *E. coli* vaccine against post-weaning diarrhea due to F4 and F18-positive enterotoxigenic *E. coli*. *Vet. J.* **226**, 32-39.
 14. Nguyen, U. V., Coddens, A., Melkebeek, V., Devriendt, B., Goetstouwers, T., Poucke, M. V., Peelman, L. and Cox, E. 2017. High susceptibility prevalence for F4(+) and F18(+) *Escherichia coli* in Flemish pigs. *Vet. Microbiol.* **202**, 52-57.
 15. Oh, R. K., Lee, M. J., Kong, H. J., Kim, J. W. and An, C. M. 2016. Isolation and purification of antimicrobial peptide from hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*. *J. Life Sci.* **26**, 1259-1268.
 16. Raheem, N. and Straus, S. K. 2019. Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions. *Front. Microbiol.* **10**, 2866.
 17. Steinberg, D. A. and Lehrer, R. I. 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.* **78**, 169-186.
 18. Szostak, M. P., Hensel, A., Eko, F. O., Klein, R., Auer, T., Mader, H., Haslberger, A., Bunka, S., Wanner, G. and Lubitz, W. 1996. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *J. Biotechnol.* **44**, 161-170.
 19. Xu, G., An, W., Wang, H. and Zhang, X. 2015. Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Front. Microbiol.* **6**, 1103.
 20. Yamakawa, M. and Tanaka, H. 1999. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Com. Immunol.* **23**, 281-289.
 21. Zhu, C., Setty, P. and Boedeker, E. C. 2017. Development of live attenuated bacterial vaccines targeting *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Vet. Microbiol.* **202**, 72-78.

초록 : 면역유도누에 추출물을 이용한 병원성 대장균의 불활성화

박종우* · 정찬영† · 이창훈 · 강상국 · 주완택 · 김성완 · 김남숙 · 김기영
(국립농업과학원 농업생물부)

돼지 설사병은 부종병과 함께 양돈 농가에 막대한 경제적 손실을 입히는 가축질병으로 알려져 있으며, 병원성 대장균의 증식에 의하여 설사 및 대장균 생성 독소에 의한 부종병이 동반된다. 본 연구에서는 항균펩타이드를 포함하는 면역유도누에의 조추출물을 이용하여 돼지 설사 및 부종을 유발하는 F4+ 및 F18ab+ 대장균의 사균체를 제작하고 사균백신으로서 이용가능성을 검토하였다. 면역유도누에 추출물의 항균활성을 환확산법을 통해 분석한 결과 F4+ 및 F18ab+ 대장균에 대하여 높은 활성을 나타내었으며, 평판계수법을 이용하여 대장균의 사균체 생산 효율을 분석한 결과 50 mg/ml의 농도를 4℃에서 처리했을 때 가장 높게 나타났다. 또한 제작된 사균체에 대해서 투과전자현미경을 이용하여 분석한 결과 세포질은 유출되고 세포막만이 남아있는 대장균이 확인되었다. 따라서 면역유도누에 추출물을 이용하여 제작된 F4+ 및 F18ab+ 대장균은 부종병 예방을 위한 사균백신으로서 이용가능성이 매우 높을 것으로 판단된다.