

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0138433 2012년12월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23K 1/17 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0057908 (22) 출원일자 2011년06월15일 심사청구일자 2011년06월15일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 강원대학교산학협력단 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동) (뒷면에 계속) (72) 발명자 박윤경 전라남도 장성군 남면 마흥길 45 채병조 강원도 춘천시 영서로 2169, 이안A 106동 702호 (퇴계동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 이원희		

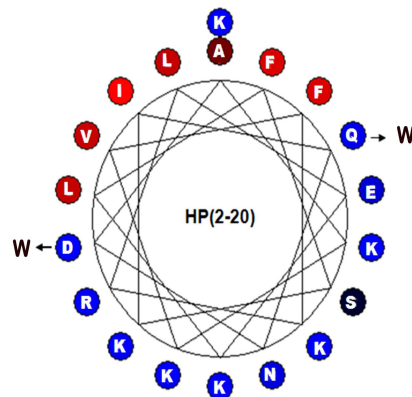
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **항생제 대체용 A3 펩타이드를 함유하는 사료첨가제 및 그의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 항생제 대체용 A3 펩타이드를 함유하는 사료첨가제 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 사료에 관한 것으로, 보다 구체적으로 A3 펩타이드를 이유자돈 또는 육계의 사료에 첨가하여 사육한 결과, 이유자돈에서 항균 펩타이드 A3 급여군이 대조군에 비하여 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시켰다. 또한, 육계의 사료에 항균 펩타이드 A3의 첨가 수준이 높을수록 대조군에 비하여 장내 유해미생물을 성장을 억제하여 영양소 소화율 및 증체량을 개선하는 것으로 나타났으므로, 항균 펩타이드 A3를 이유자돈 또는 육계 사료 내에 항생제를 대체하여 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(71) 출원인

주식회사 바이오리더스

대전광역시 유성구 테크노8로 13 (용산동)

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동,
국민대학교)

(72) 발명자

홍승표

대전광역시 유성구 배울2로 3, 대덕테크노벨리 8단지 801동 102호 (관평동)

성문희

대전광역시 유성구 유성대로736번길 62, 902호 (장대동, 갤러리빌2)

함정수

서울특별시 서대문구 연희로41길 114, 미성아파트 3동 305호 (홍은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K205753001

부처명 농림부

연구사업명 자유공모과제

연구과제명 사료 첨가제로서 항균 펩타이드를 지닌 생균제 개발

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2007.05.30 ~ 2010.05.29

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 사료첨가제는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 3

제 2항에 있어서, 사료첨가제는 이유자돈 급여용인 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 사료첨가제는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.0 ~ 22.0 중량부, 및 라이신 0.5 ~ 1.5 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 5

제 4항에 있어서, 사료첨가제는 육계 급여용인 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 6

제 1항에 따른 사료첨가제를 사료 전체 중량을 기준으로, 0.30 ~ 0.50 중량부의 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 함유하는 사료.

청구항 7

서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하도록 제조하는 단계를 포함하는 제 1항의 사료첨가제의 제조 방법.

청구항 8

제 6항의 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법.

청구항 9

제 6항의 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 영양소 소화율 및 성장 증진 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 사균화된 유산균의 표면발현 펩타이드인 항균 펩타이드 A3의 이유자돈과 육계에 사용되는 사료첨가제의 항생제 대체효과에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생체는 생명활동의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여 매우 정교한 많은 조절제어기구가 있으며, 이 기구는 생체내를 중형으로 연결하는 신호에 의하여 조절되고 있다. 그리고 펩타이드가 생체내에서의 조절제어 및 정보전달에 중요한 역할을 담당하는 인자로서 작용하고 있다. 이와 같은 내인성의 펩타이드를 생체기능조절 펩타이드(regulatory peptide)라고 부른다. 현재까지 많은 생체내에서의 기능이 밝혀져 오고 있으며, 이들의 생체기능조절 펩타이드는 호르몬, 세포증식, 혈압조절, 신경전달, 혹은 항균들의 다양한 생물활성을 가진다. 생체기능조절 펩타이드 중에서 곤충, 양서류, 및 포유동물에서 분리된 항균 펩타이드는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 종양세포 및 원생생물에 항생 활성을 나타낸다는 것이 보고되고 있다. 항균 펩타이드는 분자내에 소수성 잔기 및 염기성의 친수성 잔기가 포함된 양쪽 친매성(amphipathicity)의 공통의 구조적 성질이 있다. 이들 항균 펩타이드와 세균 지질과의 상호작용 및 구조-항생활성 상관관계 연구로부터 기존의 항균 펩타이드의 항생 활성을 증진시키며, 세포독성을 없애는 연구로부터 세포독성이 없으며, 강한 항생 활성을 갖는 약물을 제조하려고 하고 있다. 이를 위해서는 고도의 펩타이드 공학 기술이 필요하다. 펩타이드 공학의 이용기술은 펩타이드 약물 뿐만 아니라 펩티도미메틱(peptidomimetic) 약물의 개발에 이용할 수 있는 핵심기술이다. 따라서 항균 펩타이드의 항생 활성이 증진된 새로운 항균 펩타이드의 개발연구 및 대량생산 연구는 펩타이드 공학을 위한 핵심 기술이다.

[0003] 또한 항균 펩타이드의 생물종 표적의 선택성 즉 세균 및 진균에 대한 항생 활성을 유지하고 천연형의 펩타이드보다 강한 항생 활성을 갖는 항생물질의 개발은 임상적 치료용 특히, 항생제 내성 세균 및 진균에 대한 항생제 대체제, 펩타이드성 농약 및 화장품 첨가제로도 적용 가능하다.

[0004] 그 중 항생제의 중요성을 강조하자면, 항생제는 세계적으로 대단히 넓은 시장을 가지고 있다. 현재 기존의 항생제에 대하여 내성을 가지는 강한 균주의 발생 및 기존 항생제의 인체 부작용 등으로 인하여 새로운 항생제의 개발이 요구된다. 펩타이드 항생제는 다른 항생제보다 비교적 인체 부작용이 없으므로 항생제로 개발 필요성이 큰 물질이며, 국내뿐 아니라 세계적으로도 넓은 시장성을 가질 것이다.

[0005] 양친화성의 펩타이드들 중 그람음성의 혐기성세균인 헬리코박터 파일로리균 유래의 RPL1이라는 단백질 내 아미노말단 부위는 완벽한 양친화성 나선모양 구조를 가지는데(Putsep, K. et al., Nature, 398, 671-672, 1999), 이러한 양친화성 펩타이드는 세포막의 지질 성분과 유사한 구조를 지니므로 미생물의 세포막 지질과 결합함으로써 미생물의 세포막을 파괴하거나, 세포막의 전위에 영향을 주어 이를 변화시킴으로써 미생물을 파괴한다는 작용 기작이 보고되어 있다. 이에 발명자들은 양친화성을 갖는 헬리코박터 파일로리균의 RPL1 단백질의 아미노말단 부위 중 특정부위 서열과 상기 서열 중 일부를 다른 아미노산으로 치환시킴으로써 소수성 부위를 증가시키는 양친화성 구조로 펩타이드 유도체를 설계하고 합성하여 Anal3라는 합성 펩타이드를 제조하였으며, Anal3가 항균, 항진균 및 항암활성을 확인하여 상기 펩타이드 유도체가 항생제 및 항암제로 이용될 수 있는 항생 펩타이드임을 밝힌바 있다(출원번호 10-2000-0078615, 출원인 함경수).

[0006] 이러한 새로운 항생제는 종래의 항생제들과는 다른 활성 기작에 의해 항균활성을 나타내므로, 내성을 유발할 가능성이 적다는 장점이 있으나, 이러한 펩타이드를 값싸게 대량으로 제공할 수 없다는 단점으로 인하여 산업적으로 이용하는데 문제가 있다. 예를 들면, 화학합성으로 펩타이드 항생물질을 생산하는 경우에는 경제성이 낮다는 문제가 있으며, 미생물을 이용한 유전공학적인 기법으로 펩타이드 항생물질을 생산하고자 하는 시도가 있으나, 펩타이드 항생물질의 발현율이 매우 낮아 정제가 어렵다는 문제점과 펩타이드를 발현하는 숙주가 발현되는 펩타이드에 의해 죽는다는 문제점이 있으며, 이러한 문제점을 해결하고자 펩타이드의 숙주내 독성을 중화시키는 유전자를 이용한 펩타이드 발현, 정제 및 생산 시도가 있었으나, 이 또한 정제 및 경제적 어려움을 갖고 있다.

[0007] 펩타이드성 물질을 산업적으로 이용할 수 있는 방법을 제고하기 위하여, 미생물 표면에 외래 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있도록 표면 발현 모체로서 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA)의 전부 또는 일부를 이용하여 항균, 항진균, 항암활성을 나타내는 양친화성 구조의 펩타이드 항생물질 Ana13를 세포표면에 발현할 수 있는 표면 발현용 벡터를 개발한바 있다(출원번호 10-2004-0034780, 출원인 성문희).

[0008] 이에, 본 발명자들은 대량 생산된 A3 펩타이드(Ana13)를 항생제를 대체제로써 사료에 첨가제로 제조하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 육계 또는 이유자돈 사료에 A3 펩타이드를 첨가하여 제조하였을 때, 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시킴을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 사균화된 유산균의 표면발현 펩타이드인 항균 펩타이드 A3가 이유자돈과 육계에 사용되는 사료첨가제의 항생제 대체효과 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하도록 제조하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 사료첨가제의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 사료첨가제를 사료 전체 중량을 기준으로, 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 0.30 ~ 0.50 중량부의 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드 A3를 함유하는 사료를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 영양소 소화율 및 성장 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 항균 펩타이드 A3를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 이유자돈 또는 육계의 사료첨가제로 사용하였을 때, 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시키는 효과를 보였다.므로, 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법으로 사용할 수 있으며, 아울러 영양소 소화율 및 성장을 증진시키는 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 모체인 헬리코박터 파이오리 유래의 에이치피(2-20) 펩타이드의 소수성 부분을 증가시킨 유사체인 A3 펩타이드의 알파-헬리컬 휠 다이어그램 (α -helical wheel diagram)을 나타낸다.

도 2는 표면 발현용 전환벡터 pHCE1LB:pgsA-Ana13의 유전자 지도를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 사료첨가제를 사료 전체 중량을 기준으로, 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3를 0.30 ~ 0.50 중량부의 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드 A3를 함유하는 사료를 제공한다.
- [0019] 본 발명에 따른 사료첨가제는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하는 것이 바람직하며, 이유자돈 급여용인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 사료첨가제는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.0 ~ 22.0 중량부, 및 라이신 0.5 ~ 1.5 중량부를 포함하는 것이 바람직하며, 육계 급여용인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명에 따른 사료첨가제에 포함되는 펩타이드 A3 펩타이드는 헬리코박터 파이오리 유래의 HP(2-20)(에이치 피(2-20)) 펩타이드의 소수성 부분을 증가시킨 유사체로, 항균, 항진균 활성을 측정한 결과 에이치피 (2-20)보다 그람-양성, 그람-음성 박테리아에서 10배 이상의 항균활성이 증가되었으나, 곰팡이에서는 4배 정도 항진균 활성이 증가되었다. 또한 A3 펩타이드가 세포독성을 갖는지 측정하기 위하여 사람의 적혈구 세포만을 분리하여 펩타이드를 농도별로 처리한 결과 고농도에서도 전혀 세포 독성을 나타내지 않아 적합한 펩타이드임을 확인하였다.
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 사료첨가제에 포함되는 펩타이드 A3 펩타이드를 표면 발현하는 유산균은 항진균 활성을 가지고 있으며, 본 발명에 따른 항균 펩타이드의 항진균 활성은 병원성 진균인 시. 알비칸스를 대상으로 항진균 활성의 가시화실험 (플레이트 생육억제 실험)을 결과 시. 알비칸스에 대하여 높은 항진균 활성을 갖는 것이 관찰되었으며, 항균 펩타이드 A3를 표면 발현하는 락토바실러스를 사균화시킨 후의 항진균 활성을 측정한 결과에서도 사균화된 락토바실러스의 시. 알비칸스에 대한 항진균 활성을 갖는 것이 관찰되었다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 실시예에서, A3 펩타이드를 표면에 발현시키는 벡터를 제조하여 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*)에 형질전환시킨 후, A3 락토바실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양한 후, A3 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토바실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸시켰다. 이후, 원심 분리기를 이용하여 세포를 분획시키고, 상층액을 분리하여 필터를 통과시켰다. 마지막으로 필터를 통과한 상층액을 동결건조기를 이용하여 분말화시켰다.
- [0023] 본 발명의 사료첨가제에 함유되는 항균 펩타이드 A3는 락토바실러스 균주 세포외막 단백질을 이용하여 대량생산한 산물을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, A3 펩타이드를 함유하는 사료첨가제를 이유자돈 또는 육계에 급여되는 사료로 제조하여 급여한 후, 이유자돈 또는 육계의 사양성적, 영양소 소화율, 장 또는 분종의 미생물의 변화, 혈중 면역글로불린의 농도, 장기 발달의 정도 및 소장 형태를 측정하였다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 사료첨가제, 항생제 및 생균제를 포함하는 사료첨가제를 이유자돈에 4주간 급여한 후 사양성적을 측정한 결과, A3 펩타이드가 함유된 사료첨가제를 급여한 군이 항생제 급여군과 유사한 사양성적의 증가를 나타냄을 확인할 수 있었으며(표 1 참조), 이유자돈의 영양소 소화율을 확인한 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, A3 펩타이드 급여군은 항생제 급여군과 유사하게 건물 및 조단백질의 소화율을 개선시키는 효과를 나타냈다(표 2 참조). 또한, 본 발명에 따른 사료첨가제를 5주간 육계에 급여한 후, 사양성적을 측정한 결과, A3 펩타이드 급여군이 대조군에 비하여, 중체량 및 사료요구율이 개선되었으며(표 7 참조), 대조군에 비하여 A3 펩타이드 급여군이 건물의 소화율을 개선하는 것을 확인할 수 있었다(표 8 참조).
- [0026] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 사료첨가제를 급여한 후, 이유자돈과 육계의 장 또는 분종의 미생물 군총이 변화되는지를 확인하고자 사료급여 후, 장 미 분 샘플을 이용하여 분석한 결과, 표 3 및 표 9에 나타난 바와 같이 A3 펩타이드 군에서 콜리폼 수치가 대조군에 비해서 낮게 나타남으로써 장 또는 분종의 유해 미생물의 성장을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다(표 3 및 표 9 참조).

- [0027] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 이유자돈과 육계의 혈중 면역글로불린의 농도를 측정한 결과, A3 펩타이드 첨가량이 증가할수록 면역글로불린G, A 및 M의 농도가 증가하는 결과는 나타났다(표 4 및 표 10 참조). 또한, 심장, 간, 폐, 신장, 위, 소장, 대장과 같은 장기의 발달 정도와 소장의 형태를 측정한 결과, 항생제, 생균제 또는 A3 항균 펩타이드를 포함하는 사료첨가제를 급여한 군간의 유의적인 차이가 이유자돈과 육계에서 모두 관찰되지 않았다(표 5, 표 6, 표 11 및 표 12 참조).
- [0028] 따라서, 본 발명에 따른 사료첨가제를 급여한 이유자돈과 육계에서 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시키므로, 본 발명의 항균 펩타이드 A3를 함유하는 사료첨가제 및 사료로 사용할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하도록 제조하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 사료첨가제의 제조 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 따른 사료첨가제의 제조 방법에 있어서, 이유자돈 급여용 사료는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하는 것이 바람직하며, 육계 급여용 사료는 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.0 ~ 22.0 중량부, 및 라이신 0.5 ~ 1.5 중량부를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하는 사료를 이유자돈에 급여하였을 때, 장내 유해 미생물의 수치가 대조군에 비하여 감소하였다. 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.0 ~ 22.0 중량부, 및 라이신 0.5 ~ 1.5 중량부를 포함하는 사료를 육계에 급여하였을 때, 이유자돈에 급여하였을 때와 동일하게 장내 유해 미생물의 수치가 대조군에 비하여 감소하였으므로, 본 발명에 따른 사료를 장내 유해 미생물을 억제용으로 사용할 수 있다.
- [0033] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 영양소 소화율 및 성장 증진 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 중량부, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 중량부를 포함하는 사료를 이유자돈에 급여하였을 때, 혈중 면역글로불린의 수치가 증가하였다. 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 중량부, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.0 ~ 22.0 중량부, 및 라이신 0.5 ~ 1.5 중량부를 포함하는 사료를 육계에 급여하였을 때, 이유자돈에 급여하였을 때와 동일하게 혈중 면역글로불린의 수치가 증가하였으므로, 본 발명에 따른 사료를 면역 증진용으로 사용할 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0036] <1-1> 항균 펩타이드 A3 표면 발현용 벡터의 제조
- [0037] 바실러스 속 균주(바실러스 서브틸리스 청국장; *Bacillus subtilis* var. *chungkookjang*, KCTC 0697BP)에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를, 그람음성 미생물 및 그람양성 미생물을 숙주로 하는, pHCE1LB에 삽입하여 중간벡터 pHCE1LB:pgsA를 제작하였다.
- [0038] 상기 중간 벡터에 펩타이드에 펩타이드 항생물질 A3를 코딩하는 유전자를 도입하기 위하여, 항생물질 A3를 표면발현 할 수 있는 전환벡터 pHCE1LB:A-Ana13를 제조하였다. 펩타이드 A3를 코딩하는 하기의 정방향 및 역방

향 프라이머(서열번호 1, 서열번호 2)를 이용하여 변성(denature)으로 95℃에서 5분 동안 반응시킨 후, 37℃에서 1시간 동안 어닐링(annealing)하여 65 bp크기의 이중나선 염기를 얻었다:

[0039] A3 정방향 프라이머: 5'- ga tcc gcg aag aag gtg ttc aaa cgc ctg gag aag ctg ttt agc aaa atc tgg aac tgg aag ta - 3'(서열번호 1); 및

[0040] A3 역방향 프라이머: 5'- aag cta ctt cca gtt cca gat ttt gct aaa cag ctt ctc cag gcg ttt gaa cac ctt ctt cgc g - 3'(서열번호 2).

[0041] 상기 서열번호 1 및 서열번호 2에 의해 형성된 이중나선 염기서열의 양단은, 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA에 존재하는 제한효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었다. 상기 어닐링(annealing)된 A3 유전자를 미리 BamH I과 Hind III로 처리한 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA의 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하였다. 이렇게 제조한 전환 벡터 pHCE1LB:pgsA-Ana13를 도 2에 나타내었으며, 본 발명의 항체 펩타이드 A3의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0042] A3: AKKVFKRLEKLFSKIWNWK-NH₂(서열번호 3)

[0043] <1-2> 항균 펩타이드 A3의 제조

[0044] 상기 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA-A3를 락토바실러스 카제이에 형질전환시키고 배양하여 pgsA와 융합된 펩타이드 A3가 표면발현되는 지를 확인하였다. 형질전환된 상기 락토바실러스 균주를 항생제인 클로람페니콜 50 mg/L가 첨가된 200 ml의 MRS 배지(Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA)를 포함하는 500 ml 플라스크에서 37℃ 에서 정제 배양 증식시키고 락토바실러스 내 pHCE1LB:pgsA-A3 플라스미드의 존재를 확인하였다.

[0045] 락토바실러스 내 pHCE1LB:pgsA-A3 플라스미드가 항균 펩타이드 A3를 발현시킨다는 것을 확인한 후, 본 발명자들은 항균 펩타이드 A3를 대량생산하기 위하여 바이오리액터를 이용하여 항균 펩타이드 A3를 대량 배양한 후, A3 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토바실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸시켰다. 이후, 원심분리기를 이용하여 세포를 분획시키고, 상층액을 분리하여 필터를 통과시켰다. 마지막으로 필터를 통과한 상층액을 동결건조하여 분말화시켜, 항균 펩타이드 A3를 제조하였다.

실시예 2

[0046] A3 펩타이드를 포함한 사료의 제조

[0047] <2-1> A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료의 제조

[0048] 상기 <실시예 1>에서 대량 생산된 A3 펩타이드를 사료첨가제로 이용하게 위하여, 이유자돈 사료에 A3 펩타이드를 첨가하고자 하였다.

[0049] A3 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 %, 에너지 3,300 ~ 3,500 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 %, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 %를 포함하는 사료를 제조하였다.

[0050] 구체적으로 이유자돈 사료에 첨가한 A3 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서는, I기(사육기간 0 ~ 2주)에서는 에너지 3,410 kcal/kg, 조단백질 22.84 %, 라이신 1.55 %의 사료에 A3 펩타이드를 0.37 % 이상 첨가하였다. II기(사육기간 3 ~ 4주)에서는 에너지 3,370 kcal/kg, 조단백질 21.70 %, 라이신 1.55 %의 사료에 A3 펩타이드 0.37 % 이상 첨가하여, A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료를 제작하였다.

[0051] <2-2> A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 제조

[0052] 상기 <실시예 1>에서 대량 생산된 A3 펩타이드를 사료첨가제로 이용하게 위하여, 육계 사료에 A3 펩타이드를 첨가하고자 하였다.

[0053] A3 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서 항균 펩타이드 A3 0.30 ~ 0.50 %, 에너지 3,100 ~ 3,200 kcal/kg, 조단백질 21.0 ~ 23.0 %, 및 라이신 1.0 ~ 1.6 %를 포함하는 사료를 제조하였다.

[0054] 구체적으로, 육계 사료 내에서 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서는 전기(0 ~ 3주 동안)은 에너지 3,200 kcal/kg, 조단백질 22.00 %, 라이신 1.10 %의 사료에 펩타이드 0.37% 이상 첨가해야 한다. 후기(4 ~ 5주)에는 3,200 kcal/kg, 조단백질 20.00%, 라이신 0.90%의 사료에 펩타이드 0.37 %이상 첨가하여, A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료를 급여하였다.

실시예 3

[0055] 동물의 사육

[0056] <3-1> 이유자돈의 사육

[0057] 이유자돈 300두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복(반복 당 15두)에 완전임의 배치하였다. 시험기간은 I 기(0 ~ 2주)와 II 기(3 ~ 4주)로 나누어 총 4주(28일)간 실시하였으며, I 기와 II 기의 <실시예 2>에서 제조된 사료는 옥수수-대두박을 위주로 배합하였다. 실험군은 대조군(무처리 사료 급여군, NC), 대조군 I (항생제-아프라마이신 0.15% 포함 사료 급여군), 대조군 II(생균제-락토바실러스 0.2% 포함 사료 급여군), A3 펩타이드 급여군 I (항균 펩타이드 A3 펩타이드 60 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군) 그리고 A3 펩타이드 급여군 II (항균 펩타이드 A3 펩타이드 90 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군)로 나누었다.

[0058] <3-2> 육계의 사육

[0059] 로스(Ross)종 육계 400수를 공시하여(5 처리, 4회 반복, 반복당 20수) 전기(0 ~ 3주)와 후기(4 ~ 5주)로 총 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 영양소 요구량에 근거하여 전기와 후기로 구분하여 급여하였고, 처리 내용은 항생제 비교를 위하여 대조군(무처리 사료 급여군, NC), 대조군 I (항생제-아빌라마이신 0.05% 포함 사료 급여군), 대조군 II(생균제-락토바실러스 0.2% 포함 사료 급여군), A3 펩타이드 급여군 I (항균 펩타이드 A3 펩타이드 60 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군) 그리고 A3 펩타이드 급여군 II(항균 펩타이드 A3 펩타이드 90 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군)로 나누었다.

실시예 4

[0060] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료의 사양성적 측정

[0061] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 각 단계의 (I기, II기) 개시와 종료에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 체중 측정시 급이통으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량, 일일사료섭취량, 그리고 사료요구율을 산출하였다.

[0062] 그 결과, I기에서 항균 펩타이드 A3 펩타이드 90 ppm+급여군은 대조군(NC)에 비하여 일당증체량이 개선되는 결과가 나타났으며($p<0.05$), 항생제(PC I) 및 생균제(PC II)와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 펩타이드 급여군은 생균제 급여군과 항생제 급여군과의 비교시에는 항생제 급여군이 A3 펩타이드 급여군에 비해 일당증체량 및 일일사료섭취량이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). 또한, A3 펩타이드 급여군과 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

[0063] 또한, II기에서는 항생제 급여군이 일당증체량 및 일일사료섭취량을 개선하였다($p<0.05$). A3 90 ppm은 대조군에 비하여 일당증체량이 개선되는 것으로 나타났으며($p<0.05$), 항생제 및 생균제와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 항생제 급여군이 일당증체량을 개선하는 것으로 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 즉, 전체기간으로 볼 때 항생제 급여군이 다른 처리군에 비해 일당증체량 및 사료요구율을 가장 효과적으로 개선하는 것으로 나타났다($p>0.05$)(표 1).

표 1

[0064]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 사양성적 변화 측정결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
I 기 (0?14일)								
일당증체량(g)	220 ^c	242 ^a	228 ^{bc}	225 ^{bc}	232 ^{ab}	9.94	0.018	0.865
일일사료섭취량(g)	337 ^b	360 ^a	347 ^{ab}	344 ^{ab}	349 ^{ab}	12.14	0.031	0.958
사료 요구율	1.54	1.49	1.52	1.53	1.51	0.05	0.428	0.869
II 기 (14?28일)								
일당증체량,g	342 ^c	368 ^a	350 ^{bc}	345 ^{bc}	358 ^{ab}	2.83	0.027	0.860
일일사료섭취량(g)	556 ^b	579 ^a	564 ^{ab}	561 ^b	568 ^{ab}	2.87	0.069	0.896
사료 요구율	1.63	1.57	1.62	1.63	1.59	0.01	0.329	0.593
전체 (0?28일)								
일당증체량(g)	281 ^c	305 ^a	289 ^{bc}	285 ^c	295 ^b	2.18	0.003	0.817
일일사료섭취량(g)	447	457	455	453	459	1.80	0.790	0.942
사료 요구율	1.59 ^b	1.50 ^a	1.58 ^b	1.59 ^b	1.56 ^b	0.01	0.008	0.884

[0065]

a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 (p<0.05).

[0066]

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드,

[0067]

SEM: 표준 오차

실시예 5

[0068]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여를 통한 영양소 소화율 측정

[0069]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료를 급여받은 이유자돈의 영양소소화율을 측정하기 위하여 불소화 지 시제인 산화크롬(Cr₂O₃, 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며, 변화된 환경에 적응시키기 위하여 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 두었다. 각 단계별(I기, II기)로 분을 채취하여 65℃의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 하기 <수학식1>에 의하여 구하였다.

수학식 1

$$\text{영양소 소화율}(\%) = \frac{(1 - (\text{사료중의 Cr 함량} \% \times \text{분중의 영양소 함량} \%))}{(\text{분중의 Cr 함량} \% \times \text{사료중의 영양소 함량} \%)} \times 100$$

[0070]

회장내용물은 실험종료 시 처리별로 4두씩(총 20두) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N 염산 용액으로 가수분해시킨 후, 초고속-역상 크로마토그래피를 사용하여 분석하였으며, 함유 황아미노산은 24시간 동안 가수분해시킨 후 차가운 페포르믹산 용액으로 산화 처리하여 분석하였다.

[0072]

그 결과, I기에서 건물 및 조단백질 소화율에서 A3 펩타이드 90 ppm+급여군이 대조군에 비해 높은 것으로 나타났다(p<0.05), 항생제 및 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군간의 비교에서는 항생제 급여군이 건물 및 조단백질 소화율이 개선되는 것으로 나타났다(p<0.05).

[0073] 또한, II기에서는 항생제 급여군이 다른 처리군에 비하여 건물소화율이 높은 것으로 나타났다($p<0.05$) (표 2).

표 2

[0074] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 영양소 소화율 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
14일								
건물	80.20 ^c	82.26 ^a	81.34 ^b	80.47 ^c	81.82 ^{ab}	0.21	0.028	0.725
조단백질	78.23 ^c	80.52 ^a	79.61 ^{ab}	78.94 ^{bc}	79.94 ^{ab}	0.23	0.020	0.529
총에너지	81.71	82.84	82.23	81.92	82.09	0.34	0.466	0.855
조회분	43.26	46.62	45.95	45.80	45.67	0.97	0.743	0.888
칼슘	43.64	47.56	45.06	45.12	46.20	1.01	0.560	0.858
인	37.36	38.81	37.77	37.82	38.21	0.94	0.689	0.924
28일								
건물	78.17 ^c	81.33 ^a	79.18 ^{bc}	78.97 ^{bc}	79.74 ^b	0.29	0.004	0.772
조단백질	77.90	78.85	77.83	77.56	77.57	0.34	0.226	0.779
총에너지	78.39	80.54	79.09	78.76	79.62	0.64	0.301	0.943
조회분	42.79	48.47	43.50	43.97	45.48	0.85	0.057	0.539
칼슘	41.49	41.54	41.81	40.63	39.72	0.75	0.495	0.446
인	35.46	37.88	36.33	36.70	36.58	0.85	0.571	0.900

[0075] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 ($p<0.05$).

[0076] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드,

[0077] SEM: 표준 오차

실시예 6

[0078] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 장 및 분 중 미생물 측정

[0079] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 장 및 분 샘플을 5g씩 채취하여 45 ml 희석액[0.5% 펩톤, 0.05% L-시스테인염산 첨가한 용액]에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어, 상기 현탁액 1 ml를 다시 9 ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고, 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml을 페트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 클로스트리디움 종은 가스 팩 시스템을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, 콜리포름스는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 플레이트의 콜로니-형성 단위(CFU)로 계산 후 $\log_{10}$ 으로 환산하였다. 배양조건은 37℃, 48시간이었다.

[0080] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 14일째에는 항생제 급여군이 총 균수 및 콜리폼 수치가 가장 낮게 나타났다($p<0.05$). A3 펩타이드 90 ppm+급여군은 대조군에 비해 콜리폼 수치가 유의적으로 낮게 나타났으나($p<0.05$), 항생제 급여군보다는 콜리폼 수치가 높게 나타났다($p<0.05$). 28일째에는 A3 펩타이드 90 ppm+급여군이 대조군에 비하여 총 균수 및 콜리폼 수치가 낮게 나타났으나($p<0.05$), 항생제 급여군에 비해 높은 수치를 나타내었다($p<0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군간의 비교에서도 콜리폼은 항생제 급여군에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

표 3

[0081] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 분 중 미생물 균총 변화 측정 (Log₁₀ CFU/g) 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
14일								
총 혐기성 박테리아	8.87 ^a	8.42 ^b	8.73 ^{ab}	8.70 ^{ab}	8.63 ^{ab}	0.06	0.144	0.579
클로스트리디움 종	7.56	7.39	7.45	7.49	7.42	0.03	0.188	0.814
콜리폼	6.56 ^a	6.12 ^c	6.43 ^{ab}	6.41 ^{ab}	6.28 ^b	0.04	0.001	0.271
28일								
총 혐기성 박테리아	8.78 ^a	8.29 ^c	8.62 ^{ab}	8.57 ^{ab}	8.37 ^{bc}	0.05	0.092	0.221
클로스트리디움 종	7.51 ^a	7.26 ^b	7.37 ^{ab}	7.41 ^{ab}	7.32 ^b	0.03	0.110	0.902
콜리폼	6.53 ^a	6.04 ^c	6.39 ^{ab}	6.37 ^{ab}	6.27 ^b	0.04	0.010	0.384

[0082] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 (p<0.05).

[0083] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드,

[0084] SEM: 표준 오차

실시예 7

[0085] A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 혈중 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린 M(IgM) 농도 측정

[0086] 이유자돈의 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)의 량을 측정하기 위해 자돈의 경정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다. 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였으며, 실험에는 돼지 면역글로불린G 효소 결합 면역 흡착 정량 키트, 돼지 면역글로불린A 효소결합 면역흡착 정량 키트와 돼지 면역글로불린M 효소결합 면역흡착 정량 키트를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

[0087] 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)의 측정은 96-웰 플레이트에 코팅 버퍼[0.05 M 카보네이트-바이카보네이트, pH 9.6]와 염소 항-돼지 면역글로불린G 항체, 염소 항-돼지 면역글로불린A 항체, 염소 항-돼지 면역글로불린M 항체를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 위상 용액[50 nM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 0.05% 트윈 20, pH 8.0]을 이용하여 3회 세척하였다. 억제 용액[50 nM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 1% 비에스에이, pH 8.0]을 각 웰당 200 μl씩 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 자돈의 혈청을 웰에 각각 100μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. 염소 항-돼지 면역글로불린M-에이치알피 결합 항체, 염소 항-돼지 면역글로불린A-에이치알피 결합 항체와 염소 항-돼지 면역글로불린M-에이치알피 결합 항체를 결합 희석액[50 nM 트리스, 0.14M 염화나트륨, 1% 비에스에이, 0.05% 트윈 20, pH 8.0]에 각각 1:100,000과 1:50,000, 1:100,000로 희석한 후 웰에 각각 100 μl씩 넣은 후, 37℃에서 1시간 배양하였다. 5회 세척한 후 발색제를 100 μl씩 넣고 37℃에서 15분간 반응시킨 후 2 M 황산을 각각 100 μl씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 플레이트를 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

[0088] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 각 처리에 따른 통계적 유의적인 차이는 나타나지 않았지만(p>0.05), 항균 펩타이드 A3의 첨가수준이 높을수록 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린M(IgM)의 농도가 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다(표 4).

표 4

[0089] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 이유자돈의 혈중 면역글로불린(mg/ml) 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
14일								
면역글로불린G	6.21	6.78	6.40	6.32	6.43	0.18	0.274	0.945
면역글로불린A	0.32	0.41	0.37	0.35	0.37	0.03	0.592	0.988
면역글로불린M	0.71	0.89	0.75	0.73	0.79	0.05	0.253	0.920
28일								
면역글로불린G	6.31	6.87	6.48	6.39	6.53	0.17	0.654	0.921
면역글로불린A	0.36	0.43	0.38	0.39	0.42	0.03	0.752	0.742
면역글로불린M	0.73	0.92	0.77	0.79	0.81	0.04	0.281	0.768

[0090] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

[0091] SEM: 표준 오차

실시예 8

[0092] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 장기발달 정도 측정

[0093] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여가 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 실험종료 시 각 처리별로 4두씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고, 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 제거한 뒤 빈 소화관 무게를 측정하였다.

[0094] 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이, 각 처리군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($p>0.05$).

표 5

[0095] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 장기와 소장의 길이변화 측정 (28일) 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
생체중 대비 장기 무게, %								
심장	0.46	0.51	0.48	0.49	0.48	0.01	0.238	0.965
간	3.14	3.16	3.11	3.06	3.15	0.05	0.703	0.987
폐	1.07	1.19	1.13	1.12	1.15	0.03	0.164	0.973
신장	0.24	0.26	0.23	0.22	0.27	0.01	0.584	0.402
위	0.57	0.61	0.59	0.60	0.60	0.01	0.635	0.841
소장	4.52	5.11	4.41	4.60	4.88	0.14	0.365	0.373
대장	1.91	2.11	2.10	2.05	2.13	0.05	0.861	0.899
길이, cm								
소장	1420.35	1496.70	1433.38	1440.88	1456.00	11.94	0.068	0.525
대장	338.88	361.38	349.50	339.00	359.50	8.05	0.549	0.988

[0096] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

[0097] SEM: 표준 오차

실시예 9

[0098] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 소장 형태 측정

[0099] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 실험 종료 시 처리별로 4두(총 20두)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15 cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음

10% 포르말린 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다. 용모 높이와 융와 깊이를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 파라핀으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 아조르 A와 에오신으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다. 용모높이와 융와 깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

[0100] 그 결과, 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 형태(villus height, crypt depth 및 villus height: crypt)에서 처리군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$)(표 6)).

표 6

[0101] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여후, 이유자돈의 소장 형태변화 측정 결과 (28일)

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
용모 길이, μm								
십이지장	495	547	551	533	553	9.53	0.863	0.714
공장	544	601	508	576	595	14.13	0.524	0.226
회장	433	446	428	491	427	10.73	0.706	0.391
융와 높이, μm								
십이지장	346	309	341	328	313	10.69	0.582	0.464
공장	353	312	361	349	337	7.72	0.103	0.285
회장	288	248	267	252	231	8.42	0.781	0.264
용모길이와 융와높이의 비례								
십이지장	1.49	1.78	1.66	1.65	1.78	0.06	0.606	0.781
공장	1.55	1.96	1.42	1.66	1.77	0.08	0.288	0.116
회장	1.52	1.84	1.61	1.98	1.91	0.08	0.679	0.187

[0102] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

[0103] SEM: 표준 오차

실시예 10

[0104] A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 사양성적 측정

[0105] 본 발명에 따른 항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 시험개시, 전기와 후기의 종료시에 측정하였으며 사료섭취량은 체중 측정시 사료 급여통에서 사료잔량의 무게를 측정하였다. 본 시험은 전기와 후기로 나누어 진행하였으며 사양성적의 결과는 표 7과 같다.

[0106] 표 7에 나타난 바와 같이, 전기 기간에는 항생제 급여군이 다른 처리군에 비하여 증체량, 사료섭취량, 및 사료 요구율이 개선되는 것으로 나타났다. A3 펩타이드 90 ppm+급여군과의 비교에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 항생제 급여군이 증체량 및 사료섭취량에서 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). 후기 기간에는 A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군과의 비교시 항생제 급여군이 증체량 개선에 더 효과적인 것으로 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 전체기간으로 볼 때 A3 펩타이드 90 ppm+급여군은 대조군에 비하여 증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 항생제 급여군에서 증체량이 개선되는 결과를 나타내었다($p<0.05$). A3와 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

표 7

[0107]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 사양성적 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs P C I	A3 vs PC II
전기 (0?3주)								
증체량(g)	693 ^d	732 ^a	714 ^{bc}	704 ^{cd}	722 ^{ab}	3.59	0.021	0.881
사료섭취량(g)	1114 ^b	1143 ^a	1130 ^{ab}	1123 ^{ab}	1136 ^{ab}	4.05	0.029	0.955
사료요구율	1.61 ^a	1.56 ^b	1.58 ^{ab}	1.60 ^{ab}	1.57 ^{ab}	0.01	0.074	0.874
후기 (3?5주)								
증체량(g)	1077 ^b	1153 ^a	1107 ^{ab}	1088 ^b	1121 ^{ab}	8.49	0.040	0.875
사료섭취량(g)	2013	2075	2063	2010	2048	12.82	0.293	0.259
사료요구율	1.87 ^a	1.80 ^b	1.86 ^{ab}	1.85 ^a	1.83 ^{ab}	0.01	0.189	0.232
전체 (0?5주)								
증체량(g)	1855 ^d	1973 ^a	1909 ^{bc}	1878 ^{cd}	1931 ^{ab}	11.05	0.015	0.851
사료섭취량(g)	3136	3232	3208	3145	3195	14.82	0.174	0.237
사료요구율	1.69 ^a	1.64 ^c	1.68 ^{ab}	1.67 ^{ab}	1.66 ^{bc}	0.01	0.067	0.260

[0108]

a, b, c, d: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 ($p < 0.05$).

[0109]

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드,

[0110]

SEM: 표준 오차

실시예 11

[0111]

A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 영양소 소화율 측정

[0112]

영양소 소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 <실시예 2>의 사료(NC, PC I, PC II, A3)에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 예비기간을 3일간 두었다. 각 단계별(I기, II기)로 분을 채취하여 65℃의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 상기 <수학식 1>의 계산식에 의하여 구하였다.

[0113]

회장내용물은 각 단계 종료 시 처리별로 8수씩(총 40수) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기에서 냉동건조하였다. 건조된 시료는 1mm로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6 N HCl 용액으로 가수분해시킨 후 초고속 역상 크로마토그래피를 사용하여 분석하였으며, 함유 황아미노산은 24시간 동안 가수분해시킨 후 차가운 페포르믹산 용액으로 산화처리하여 분석하였다.

[0114]

그 결과, 하기 표 8에 나타난 바와 같이, 시작 기간에는 사료 내 항생제의 첨가는 다른 처리군에 비하여 건물, 조단백질 및 에너지 소화율을 개선하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). A3 펩타이드 90 ppm+급여군은 대조군에 비하여 건물의 소화율을 개선하며($p < 0.05$), 항생제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군을 비교할 때 항생제 급여군이 A3 펩타이드 급여군에 비하여 건물 및 조단백질의 소화율을 개선하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

[0115]

후기에는 A3 펩타이드 90 ppm+급여군이 대조군에 비하여 조단백질 소화율에서 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군의 비교시 항생제 급여군이 A3 펩타이드 급여군에 비하여 건물 및 조단백질 소화율이 높게 나타났다($p < 0.05$).

표 8

[0116]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 영양소 소화율에 미치는 영향

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
전기(0?3주)								
건물	74.49 ^c	78.81 ^a	76.09 ^{bc}	75.38 ^{bc}	77.10 ^{ab}	0.43	0.022	0.867
조단백질	65.95 ^b	71.20 ^a	67.77 ^b	66.35 ^b	68.18 ^{ab}	0.58	0.021	0.679
총에너지	75.41 ^b	78.49 ^a	77.37 ^{ab}	76.73 ^{ab}	77.65 ^{ab}	0.41	0.234	0.872
조회분	40.25	43.49	41.19	41.54	41.45	0.48	0.115	0.804
칼슘	38.21	42.28	40.79	39.78	40.18	0.60	0.191	0.622
인	37.69	40.58	38.59	39.80	40.91	0.64	0.903	0.298
후기(3?5주)								
건물	71.87 ^b	74.14 ^a	72.32 ^{ab}	72.51 ^{ab}	72.81 ^{ab}	0.30	0.030	0.606
조단백질	64.81 ^c	70.31 ^a	65.33 ^{bc}	65.58 ^{bc}	68.10 ^{ab}	0.60	0.021	0.269
총에너지	73.55	75.11	74.41	74.15	74.37	0.31	0.345	0.846
조회분	39.78	41.67	41.09	39.97	40.91	0.83	0.547	0.783
칼슘	36.16	38.99	37.32	36.26	38.15	0.48	0.149	0.939
인	34.77	37.04	35.52	36.17	36.94	0.54	0.760	0.455

[0117]

a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 (p<0.05).

[0118]

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드,

[0119]

SEM: 표준 오차

실시예 12

[0120]

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 장 및 분 중 미생물 측정

[0121]

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5 g씩 채취하여 45 ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1 ml를 9 ml 희석액[0.5% 펩톤, 0.05% L-시스테인염산 첨가한 용액]에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액 1 ml를 펠트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 클로스트리디움(clostridium) 종은 가스 팩 시스템을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, 콜리폼(coliform)은 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 플레이트의 콜로니-형성 단위(CFU)로 계산 후 log₁₀으로 환산하였다. 배양조건은 37℃, 48시간이었다.

[0122]

항균 펩타이드 A3 급여에 따른 분 중 미생물 수치는 표 9와 같다. 21일째의 총 균수에서는 각 처리군간의 차이가 나타나지 않았으나(p>0.05), 클로스트리디움 종 및 콜리폼 수치는 항생제 급여군에서 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05). A3 펩타이드 90 ppm+급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 클로스트리디움 종 수치에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나(p>0.05), 콜리폼 억제는 항생제 급여군이 더욱 효과적인 것으로 나타났다(p<0.05). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 이. 콜라이 수치가 항생제 급여군에서 유의적으로 낮게 나타났으며(p<0.05), 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05).

[0123]

35일째에는 A3 펩타이드 90 ppm+급여군이 대조군에 비하여 총 균수, 클로스트리디움 종 및 콜리폼 수치가 낮게 나타났으며(p<0.05), 항생제 급여군과의 비교에서도 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). A3 펩타이드 급여군과 항생제 급여군의 비교시 항생제 급여군이 총 균수 및 콜리폼 수치가 낮게 나타났(p<0.05). 생균제 급여군과의 비교에서는 차이가 없었다(p>0.05). 즉, 이를 통하여 본 발명에 따른 A3 펩타이드를 함유한 사료 제 공시, 항생제보다 뛰어나며, 생균제와 유사할 정도로 미생물 균을 억제하는 것을 확인하였다(표 9).

표 9

[0124] 향균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 분 중 미생물 군총 변화 측정 결과 (Log₁₀ CFU/g)

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
21일								
총 혐기성 박테리아	8.36	8.17	8.27	8.31	8.24	0.04	0.291	0.960
클로스트리디움 종	7.34 ^a	7.13 ^c	7.26 ^{ab}	7.24 ^{ab}	7.18 ^{bc}	0.02	0.132	0.214
콜리폼	6.61 ^a	6.33 ^c	6.51 ^{ab}	6.54 ^{ab}	6.45 ^b	0.02	0.001	0.595
35일								
총 혐기성 박테리아	8.42 ^a	8.07 ^c	8.29 ^b	8.27 ^b	8.21 ^b	0.03	0.010	0.285
클로스트리디움 종	7.31 ^a	7.09 ^b	7.21 ^{ab}	7.19 ^{ab}	7.15 ^b	0.02	0.281	0.323
콜리폼	6.51 ^a	6.12 ^c	6.31 ^b	6.36 ^b	6.24 ^{bc}	0.03	0.018	0.984

[0125] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 (p<0.05).

[0126] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 향균 펩타이드,

[0127] SEM: 표준 오차

실시예 13

[0128] 향균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 혈중 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린M(IgM) 농도 변화 측정

[0129] 육계의 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)의 양을 측정하기 위해 육계의 익정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0130] 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 치킨 면역글로불린G 효소결합 면역흡착 정량 키트, 치킨 면역글로불린A 효소결합 면역흡착 정량 키트와 치킨 면역글로불린M 효소결합 면역흡착 정량 키트를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)의 측정은 96-웰 플레이트에 코팅 버퍼[0.05M 카보네이트-바이카보네이트, pH 9.6]와 염소 항-치킨 면역글로불린G 항체, 염소 항-치킨 면역글로불린A 항체, 면역 항-치킨 면역글로불린M 항체를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 워싱 용액[50 mM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 0.05% 트윈 20, pH 8.0]을 이용하여 3회 세척하였다. 억제 용액[50 mM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 1% 비에스에이(BSA), pH 8.0]을 각 웰당 200 μl씩 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 육계의 혈청을 웰에 각각 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. 염소 항-치킨 면역글로불린G-에이치알피 결합 항체, 염소 항-치킨 면역글로불린A-에이치알피 결합 항체와 염소 항-치킨 면역글로불린M-에이치알피 결합 항체를 결합 희석액[50 mM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 1% 비에스에이(BSA), 0.05% 트윈 20(Tween 20), pH 8.0]에 각각 1:40,000과 1:60,000, 1:40,000로 희석한 후 웰에 각각 100 μl씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제를 100 μl씩 넣고 37℃에서 15분간 반응시킨 후 2 M 황산을 각각 100 μl씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 플레이트를 450 nm의 흡광도에서 분석하였다.

[0131] 그 결과, 항생제 및 향균 펩타이드 A3의 급여에 의한 육계의 혈중 면역글로불린G, 면역글로불린A 및 면역글로불린M 농도에 있어서, 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았지만(p>0.05), 향균 펩타이드 A3의 첨가수준이 높아질수록 면역글로불린G, 면역글로불린A 및 면역글로불린 M의 농도가 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(표 10).

표 10

[0132] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 육계의 혈중 면역글로불린(mg/ml) 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
21일								
면역글로불린G	284.94	310.51	302.33	297.73	304.83	15.15	0.750	0.977
면역글로불린A	31.40	38.81	32.48	32.61	33.04	1.84	0.178	0.934
면역글로불린M	67.11	73.32	70.31	69.74	71.80	1.99	0.560	0.946
35일								
면역글로불린G	283.04	314.36	302.60	295.58	308.29	14.33	0.588	0.988
면역글로불린A	30.59	39.58	31.55	31.49	33.23	1.57	0.075	0.846
면역글로불린M	65.01	71.02	68.25	67.80	68.79	1.53	0.488	0.922

[0133] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

[0134] SEM: 표준 오차.

실시예 14

[0135] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 도체성적 및 장기발달 정도도 변화 측정

[0136] 항균 펩타이드 A3의 급여가 도체성적과 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 도체율 및 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 각 단계 종료 시 각 처리별로 8수씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

[0137] 그 결과, 표 11에 나타난 바와 같이, 항생제, 생균제 및 본 발명에 따른 항균 A3 펩타이드가 함유된 사료 급여군에서 장기발달 정도에 유의적인 차이가 나타나지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(표 11).

표 11

[0138] 항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 장기와 소장의 길이변화 측정 결과 (35일)

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
생체중 대비 도체율, %								
도체중	59.12	60.15	59.35	59.39	59.90	0.77	0.781	0.891
가슴 근육	14.24	14.67	14.56	14.54	14.63	0.39	0.892	0.957
복강지방	1.14	1.11	1.10	1.13	1.09	0.06	0.955	0.966
생체중 대비 장기 무게, %								
심장	0.53	0.52	0.52	0.55	0.54	0.01	0.277	0.400
간	2.30	2.53	2.67	2.71	2.66	0.10	0.430	0.960
소낭	0.42	0.41	0.42	0.44	0.43	0.01	.0529	0.652
위	1.63	1.74	1.61	1.66	1.70	0.05	0.710	0.533
소장	3.15	3.19	3.04	3.17	3.16	0.08	0.945	0.582
대장	0.57	0.61	0.51	0.53	0.59	0.02	0.404	0.420
길이(cm)								
소장	169.50	176.75	168.75	168.50	173.50	2.67	0.462	0.802
대장	29.75	29.00	27.25	27.50	29.75	0.45	0.721	0.255

[0139] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

[0140] SEM: 표준 오차

실시예 15

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 소장 형태 변화 측정

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 단계 종료시 처리별로 8수(총 40수)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15 cm 부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% 포르말린 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다. 용모 높이와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 파라핀으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 아조르 A와 에오신으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다. 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

그 결과, 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 용모길이, 용와높이, 용모길이와 용와높이의 비례를 조사한 결과 항생제 및 항균 펩타이드 A3 첨가에 따른 처리군간의 변화는 나타나지 않았다($p>0.05$) (표 12).

표 12

항균 A3 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여후, 소장 형태 변화 측정 결과 (28일)

항목	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	유의성검증	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
용모 길이(μm)								
십이지장	1635	1711	1677	1656	1696	25.63	0.647	0.989
공장	1117	1195	1166	1135	1183	31.66	0.704	0.947
회장	509	616	536	550	594	18.20	0.263	0.456
용와 높이(μm)								
십이지장	448	443	450	462	473	17.71	0.603	0.713
공장	364	354	382	375	350	13.72	0.825	0.608
회장	233	230	236	225	227	7.89	0.864	0.651
용모길이와 용와높이의 비례								
십이지장	3.80	4.03	3.90	3.68	3.59	0.17	0.370	0.662
공장	3.18	3.47	3.23	3.10	3.42	0.16	0.605	0.957
회장	2.18	2.83	2.36	2.46	2.69	0.14	0.556	0.561

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, A3: 항균 펩타이드

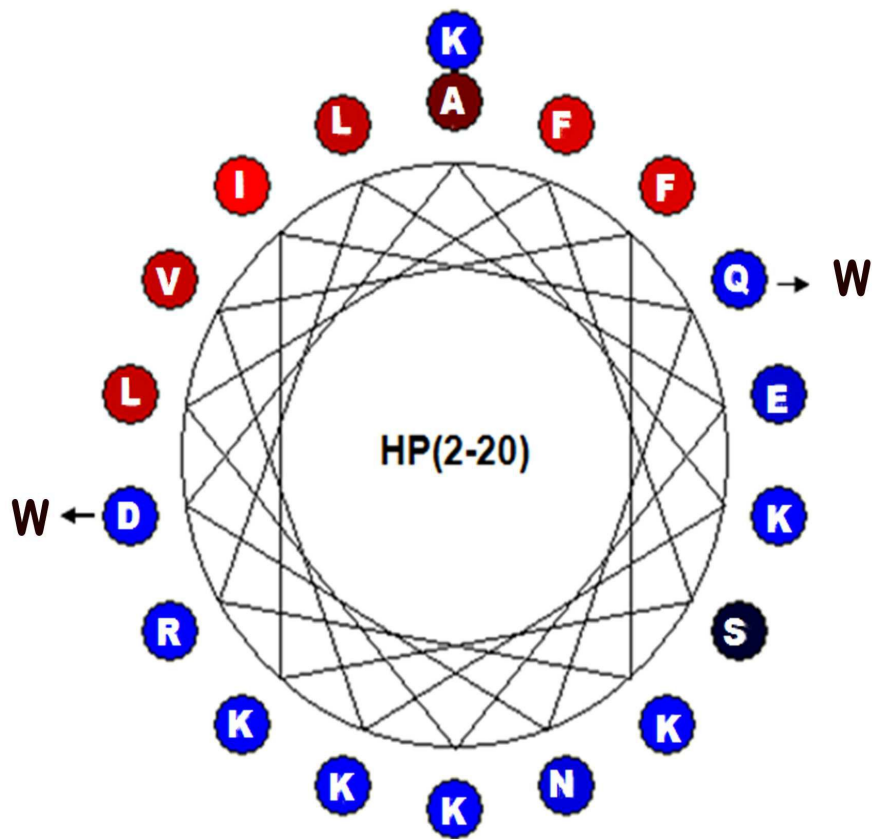
SEM: 표준 오차

산업상 이용가능성

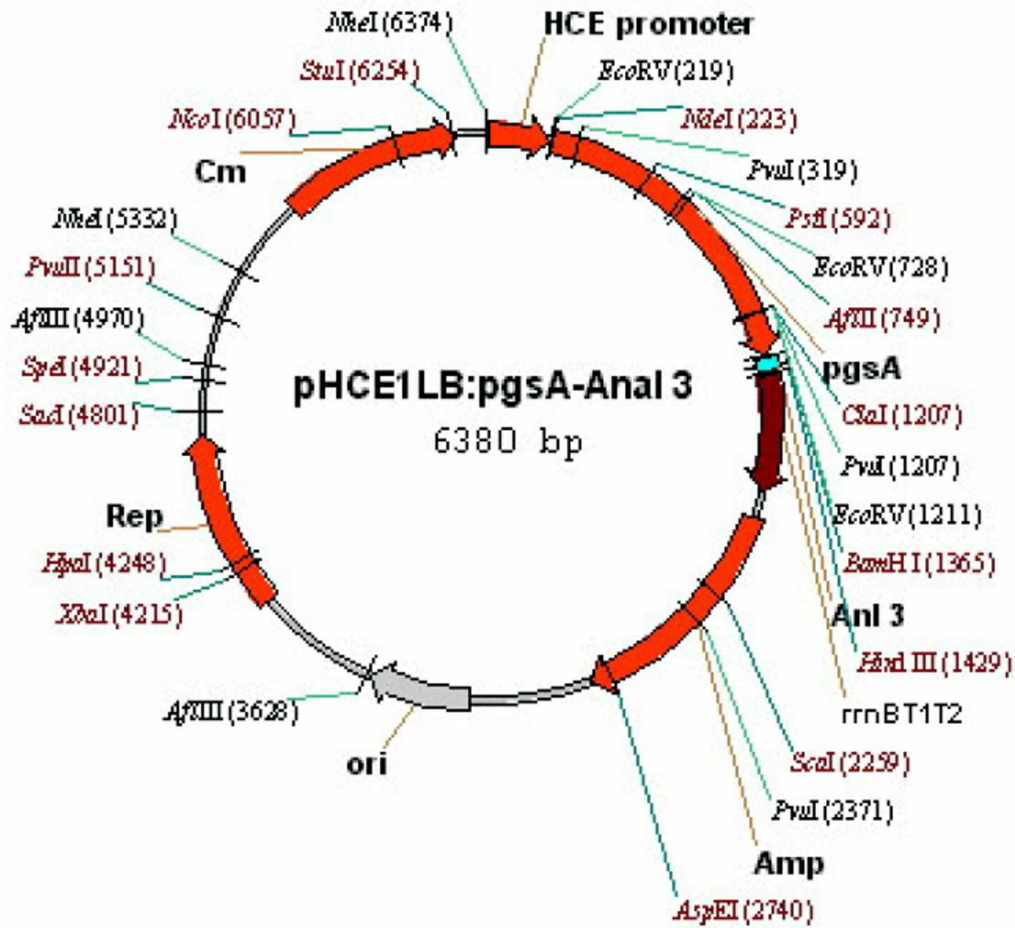
상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 A3 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제는 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시켰으므로, 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법으로 사용할 수 있으며, 아울러 영양소 소화율 및 성장을 증진시키는 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
KNU-Industry Cooperation Foundation
Bioleaders Corporation
Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation
- <120> Feed additive comprising A3 peptide and method for manufacturing thereof
- <130> 10p-06-47
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 64
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> A3 forward primer

<400> 1
gatccgcgaa gaaggtgttc aaacgcctgg agaagctgtt tagcaaaatc tggaactgga 60

agta 64

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A3 reverse primer

<400> 2
aagctacttc cagttccaga ttttgctaaa cagcttctcc aggcgtttga acaccttctt 60

cgcg 64

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A3 peptide amino acid sequence

<400> 3
Ala Lys Lys Val Phe Lys Arg Leu Glu Lys Leu Phe Ser Lys Ile Trp

1 5 10 15
Asn Trp Lys