



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0138432
(43) 공개일자 2012년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 1/17 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0057907

(22) 출원일자 2011년06월15일

심사청구일자 2011년06월15일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

주식회사 바이오리더스

대전광역시 유성구 테크노8로 13 (용산동)

(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 P5 펩타이드를 함유하는 사료첨가제 및 그의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 항생제 대체용 P5 펩타이드를 함유하는 사료첨가제 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 사료에 관한 것으로, 보다 구체적으로 P5 펩타이드를 항생제 대체제로써 이유자돈 또는 육계의 사료에 첨가하여 사육한 결과, 이유자돈에서 항균 펩타이드 P5 급여군이 대조군에 비하여 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시켰다. 또한, 육계의 사료에 항균 펩타이드 P5의 첨가 수준이 높을수록 대조군에 비하여 장내 유해미생물을 성장을 억제하여 영양소 소화율 및 증체량을 개선하는 것으로 나타났으므로, 항균 펩타이드 P5를 이유자돈 또는 육계 사료 내에 항생제를 대체하여 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

펩타이드	아미노산 서열	특징
CA-MA	KKKLPKKIGIGKPLHSKKF-NH ₂	모체 펩타이드
P1	KKKLPKKIGIGKPL-NH ₂	CA-MA : C-말단 제거 (HSKKF)
P2	KKKKKKLPKKIGIGKPL-NH ₂	P1 : N-말단 첨가 (KKK)
P3	KKKLPKKIGIGKPLKKK-NH ₂	P1 : C-말단 첨가 (KKK)
P4	KKKKKKKKPKPL-NH ₂	CA-MA : C-말단 제거와 치환 (HSKKF) GIG→Pro L ₄ →M ₄ , F ₅ →M ₅ , I ₈ →M ₈
P5	KKKKLLKKPLKKLLKKL-NH ₂	CA-MA : 치환, GIG→Pro L ₄ →M ₄ , F ₅ →L ₅ , M ₈ →L ₈ , I ₈ →M ₈ , K ₁₂ →L ₁₂ , F ₁₃ →L ₁₃ , L ₁₄ →M ₁₄ , H ₁₅ →M ₁₅ , S ₁₆ →L ₁₆ , A ₁₇ →L ₁₇ , F ₂₀ →L ₂₀

(71) 출원인

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동,
국민대학교)

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

홍승표

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

성문희

대전광역시 유성구 유성대로736번길 62, 902호 (장
대동, 갤러리빌2)

함경수

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 P5를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 사료첨가제는 항균 펩타이드 P5 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 P5 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 P5를 함유하는 사료.

청구항 7

서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5 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 표면 발현 펩타이드인 항균 펩타이드 P5를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제의 제조 및 이를 포함하는 사료에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 페니실린 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 사용되어왔다. 그러나 요즈음에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 과거와는 달리 빠른 속도로 등장하고 있어 이들 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메카니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 천연에 존재하는 항균 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되고 있다. 자연계에 존재하는 항균 펩타이드들을 그대로 이용하거나 유사체들을 설계하여 이용하고자 하는 시도들이 있었으나 항균활성과 동시에 세포독성의 척도인 적혈구 용혈활성도 동시에 증가하는 경우가 많기에 실제적인 응용에 많은 제약을 받고 있다.

[0003] 생물체에는 생체의 선천성 면역계(innate immunity) 및 숙주방어(host defense)에 중요한 역할을 담당하는 항균 펩타이드가 존재한다는 것이 최근 들어 많이 알려지고 있다. 특히, 곤충, 양서류 및 포유동물을 포함한 각종 생물체는 이들의 진화과정에서 각종 병원성 미생물의 감염에 대응하여 여러 종류의 펩타이드를 이용, 면역 방어계(Immune defence)를 가지고 있다는 것이 알려지고 있다. 이러한 가운데 최근 들어 분석방법 및 구조결정법의 발달에 의하여 수많은 항균 펩타이드가 밝혀지고 있으며, 이 중 몇몇 항균 펩타이드는 각종 미생물에 대한 항생활성의 작용 기작이 표적세포(target cell)의 인지질 이중층막(phospholipid layer membrane)과의 결합에 관련되어 있고, 펩타이드의 양쪽 친매성(amphipathic)에 의한 세포막상의 이온채널(ion channel) 또는 구멍(pore)의 형성이 세포막의 막전위를 변화시키거나, 세포막을 파괴하여 결국에는 세포의 사멸(cell lysis)에 이르게 한다고 밝혀지고 있다.

[0004] 인류는 수 세기동안 개구리를 병원균 감염에 대처하기 위한 치료의 수단으로 이용해왔으며 남미 국가들에서는 오늘날에도 민간요법으로써 이를 사용하고 있다. 1962년에 붐비나 베리가타(Bombina variegata)라는 개구리의 표피분비액에서 항균력 및 용혈력을 지닌 펩타이드의 존재를 처음 확인하였고, 이 후 24개의 아미노산으로 구성된 붐비닌(bombinin)이란 항균 펩타이드가 최초로 분리되었다. 1971년에는 벌의 독소(bee venom)로부터 멜리틴(melittin)이란 펩타이드가 정제되어 항균 펩타이드의 구조와 작용기전에 대한 연구가 본격적으로 수행되는 계기가 되었다. 그러나 멜리틴(melittin)은 우수한 항균활성을 지니고 있음에도 불구하고 강력한 용혈력(적혈구에 대한 파괴력)으로 인해 신규 항생제로의 개발을 위한 더 이상의 연구를 진행시킬 수가 없었다. 따라서 멜리틴(melittin)의 발견 이 후, 용혈력이 없으며 항균활성이 우수한 천연 펩타이드의 발견을 위한 많은 연구들이 뒤따르게 되었다.

[0005] 그리고 이렇게 발견된 항균 펩타이드를 활성이 증진된 펩타이드로 설계하기 위하여 알파-헬릭컬 휠 다이어그램(α -helical wheel diagram)을 기초로 아미노산을 치환한다든지, 펩타이드의 삼차원 구조와 항생 활성의 상관관계를 기초로 하여 세포독성이 없고 기능이 증진된 항생 펩타이드를 설계, 개발하고 있으며, 컴퓨터를 이용하여 펩타이드 구조를 예측하고, 이 구조로부터 고부가가치 유용 펩타이드들을 설계하고 있다. 또한 최근에는 펩티도미메틱스(peptidomimetics) 기술의 도입을 적극적으로 추진함으로써 효과적인 신약 개발을 모색하고 있다.

[0006] 개발된 항균 펩타이드 P5는 종래의 항생제들과는 다른 항생기작에 의하여 매우 높은 항균 및 항진균 활성을 나타내기 때문에, 항생제 내성을 유발할 가능성이 매우 적다는 장점이 있고, 펩타이드를 이용한 제약 및 식품 분야 등에서의 산업적 응용 가능성은 매우 높지만, 항균 펩타이드의 다양한 산업적 이용이 가능함에도 불구하고, 현재까지 개발된 기술의 가장 큰 장애요인의 하나는 이들을 값싸게 대량으로 생산하는데 어려움이 있다. 예를 들면, 화학합성에 의하여 항균 펩타이드를 대량생산하는 경우에는 경제성이 낮다는 문제가 있고, 미생물을 이용한 유전공학적 기법으로 항균 펩타이드를 생산하고자 하는 경우에도 항균 펩타이드의 발현율이 매우 낮아 정제의 어려움과 펩타이드를 발현하는 숙주가 발현되는 펩타이드에 의해 사멸되는 문제점이 있어 이를 해결하기 위하여 펩타이드의 숙주내 독성을 중화시키는 유전자를 이용한 펩타이드 발현, 정제 및 생산 시도가 있으나 이 또한 정제효율의 감소 및 경제적 생산의 어려움이 있었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 선별된 항균 펩타이드 P5를 세포표면에 발현함으로써 간편하고 안전하게 대량생산할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 바실러스 균주 유래의 세포외막 단백질을 새로운 표면발현 모체로 이용한다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 P5를 표면발현한 유산균을 이용하여 대량 생산된 P5 펩타이드를 항생제를 대체제로써 사료에 첨가제로 제조하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 육계 또는 이유자돈 사료에 P5 펩타이드를 첨가하여 제조하였을 때, 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시킴을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항균 펩타이드 P5를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5 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.

[0011] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 사료첨가제를 사료 전체 중량을 기준으로, 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5를 0.30 ~ 0.50 중량부의 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드 P5를 함유하는 사료를 제공한다.

[0012] 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.

[0013] 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

[0014] 본 발명의 항균 펩타이드 P5를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 이유자돈 또는 육계의 사료첨가제로 사용하였을 때, 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시키는 효과를 보였으므로, 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

[0015] 도 1은 모체 펩타이드(CA-MA)로부터 변형된 펩타이드의 서열을 나타내는 표이다.

도 2는 표면 발현용 전환벡터 pHCE1LB:pgsA-P5의 유전자 지도를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5를 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 P5를 0.30 ~ 0.50 중량부의 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드 P5를 함유하는 사료를 제공한다.
- [0019] 본 발명에 따른 사료첨가제는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5 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 P5 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 P5 펩타이드는 세크로핀(Cecropin A, CA)과 마가이닌(Magainin 2, MA) 접합 펩타이드(CA-MA(Cecropin A - Magainin 2))를 모체로 하여 아미노산 잔기를 치환하고 제거하여 만들어진 펩타이드로써 세균과 진균에 대하여 각각 주형보다 4배까지 높은 항균활성을 나타내어 선택되었다. 본 발명의 P5 펩타이드가 활성을 유지하는지 확인하기 위하여 그람 음성균(이. 콜라이), 그람 양성균(에스. 아우레우스) 및 병원성 곰팡이(시. 알비칸스)에서 항생 활성을 측정한 결과, 합성 상태의 P5 펩타이드와 항생제 기능성에서 유사한 항생 활성 결과를 나타냈다. 구체적으로, P5 펩타이드를 표면 발현하는 유산균의 항진균 활성을 측정하기 위해 병원성 진균인 시. 알비칸스를 대상으로 항진균 활성의 가시화실험(플레이트 생육억제 실험)을 수행한 결과, 캔디다 알비칸스에 대하여 높은 항진균 활성을 보였다. 항균 펩타이드 P5를 표면 발현하는 유산균을 사균화시킨 후의 항진균 활성을 측정한 결과에서도 사균화된 유산균의 캔디다 알비칸스에 대한 항진균 활성이 있다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서, P5 펩타이드를 표면에 발현시키는 박터를 제조하여 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)에 형질전환시킨 후, P5 락토바실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양한 후, P5 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토바실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸시켰다. 이후, 원심분리기를 이용하여 세포를 분획시키고, 상층액을 분리하여 필터를 통과시켰다. 마지막으로 필터를 통과한 상층액을 동결건조기를 이용하여 분말화시켰다.
- [0022] 본 발명의 사료첨가제에 함유되는 항균 펩타이드 P5는 락토바실러스 균주 세포외막 단백질을 이용하여 대량생산한 산물을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서 P5 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.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 사료첨가제, 항생제 및 생균제를 포함하는 사료첨가제를 이유자돈에 4주간 급여한 후 사양성적을 측정한 결과, P5 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, P5 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, P5 펩타이드 급여군이 대조군에 비하여, 증체량 및 사료요구율이 개선되었으며(표 7 참조), 대조군에 비하여 P5 펩타이드 급여군이 건물의 소화율을 개선하는 것을 확인할 수 있었다(표 8 참조).
- [0025] 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 P5 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).
- [0026] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 이유자돈과 육계의 혈중 면역글로불린의 농도를 측정한 결과, P5 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 P5 항균 펩타이드를 포함하는 사료첨가제를 급여한 군간의 유의적인 차이가 이유자돈과 육계에서 모두

관찰되지 않았다(표 5, 표 6, 표 11 및 표 12 참조).

- [0027] 따라서, 본 발명에 따른 사료첨가제를 급여한 이유자돈과 육계에서 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시키므로, 본 발명의 항균 펩타이드 P5를 함유하는 사료첨가제 및 사료로 사용할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 P5 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.
- [0029] 본 발명에 따른 사료첨가제의 제조 방법에 있어서, 이유자돈 급여용 사료는 항균 펩타이드 P5 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 P5 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.
- [0030] 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.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 P5 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 P5 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.
- [0032] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 사료를 이유자돈 또는 육계에 급여하는 단계를 포함하는 이유자돈 또는 육계의 영양소 소화율 및 성장 증진 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항균 펩타이드 P5 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 P5 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.
- [0034] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0035] <1-1> 항균 펩타이드 P5 표면 발현용 벡터의 제조
- [0036] 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.
- [0037] 상기 중간 벡터에 펩타이드에 펩타이드 항생물질 P5를 코딩하는 유전자를 도입하기 위하여, 항생물질 P5를 표면발현 할 수 있는 전환벡터 pHCE1LB:A-Ana13를 제조하였다. 펩타이드 P5를 코딩하는 하기의 정방향 및 역방향 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:

- [0038] P5 프라이머 1: 5'- ga tcc aag tgg aag aaa ctg ctc aag aaa ccg ctg ctc aag aag ctg ctc aag aaa ctg ta - 3'(서열번호 1); 및
- [0039] P5 프라이머 2: 5'- aag cta cag ttt ctt gag cag ctt ctt gag cag ccgg ttt ctt gag cag ttt ctt cca ctt g - 3' (서열번호 2).
- [0040] 상기 서열번호 1, 2의 프라이머가 어닐링(annealing)된 이중나선 염기서열의 양 말단은 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA에 존재하는 제한효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었다. 상기 어닐링된 P5 유전자를, 미리 제한효소 BamH I과 Hind III로 처리된 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA와 혼합하고 연결하여 상기 P5 유전자가 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈이 맞추어지도록(즉, ORF가 이루어지도록) 결합하였다. 이렇게 제조한 전환 벡터 pHCE1LB:pgsA-P5를 도 2에 나타내었으며, 본 발명의 항체 펩타이드 P5의 아미노산 서열은 하기와 같다:
- [0041] P5: KWKLLKKPLLLKKLLKKL-NH₂(서열번호 3)

[0042] <1-2> 항균 펩타이드 P5의 제조

- [0043] 상기 표면 발현용 벡터 pHCE1LB:pgsA-P5를 락토바실러스 카제이에 형질전환시키고 배양하여 pgsA와 융합된 펩타이드 P5가 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 정체 배양 증식시키고 락토바실러스 내 pHCE1LB:pgsA-P5 플라스미드의 존재를 확인하였다.
- [0044] 락토바실러스 내 pHCE1LB:pgsA-P5 플라스미드가 항균 펩타이드 P5를 발현시킨다는 것을 확인한 후, 본 발명자들은 항균 펩타이드 P5를 대량생산하기 위하여 바이오리액터를 이용하여 항균 펩타이드 P5를 대량 배양한 후, P5 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 P5를 제조하였다.

실시예 2

[0045] P5 펩타이드를 포함한 사료의 제조

[0046] <2-1> P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료의 제조

- [0047] 상기 <실시에 1>에서 대량 생산된 P5 펩타이드를 사료첨가제로 이용하게 위하여, 이유자돈 사료에 P5 펩타이드를 첨가하고자 하였다.
- [0048] P5 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서 항균 펩타이드 P5 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.
- [0049] 구체적으로 이유자돈 사료에 첨가한 P5 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서는, I기(사육기간 0 ~ 2주)에서는 에너지 3,410 kcal/kg, 조단백질 22.84 %, 라이신 1.55 %의 사료에 P5 펩타이드를 0.37 % 이상 첨가하였다. II기(사육기간 3 ~ 4주)에서는 에너지 3,370 kcal/kg, 조단백질 21.70 %, 라이신 1.55 %의 사료에 P5 펩타이드 0.37 % 이상 첨가하여, P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료를 제작하였다.

[0050] <2-2> P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 제조

- [0051] 상기 <실시에 1>에서 대량 생산된 P5 펩타이드를 사료첨가제로 이용하게 위하여, 육계 사료에 P5 펩타이드를 첨가하고자 하였다.
- [0052] P5 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서 항균 펩타이드 P5 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.
- [0053] 육계 사료 내에서 펩타이드의 효과를 최적화하기 위해서는 전기(0 ~ 3주 동안)은 에너지 3,200 kcal/kg, 조단백

질 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, P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료를 급여하였다.

실시예 3

[0054] 동물의 사육

[0055] <3-1> 이유자돈의 사육

[0056] 이유자돈 300두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복(반복 당 15두)에 완전임의 배치하였다. 시험기간은 I기(0 ~ 2주)와 II기(3 ~ 4주)로 나누어 총 4주(28일)간 실시하였으며, I기와 II기의 시험사료는 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), P5 펩타이드 급여군 I(항균 펩타이드 P5 펩타이드 60 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군) 그리고 P5 펩타이드 급여군 II(항균 펩타이드 P5 펩타이드 90 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군)로 나누었다.

[0057] <3-2> 육계의 사육

[0058] 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), P5 펩타이드 급여군 I(항균 펩타이드 P5 펩타이드 60 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군) 그리고 P5 펩타이드 급여군 II(항균 펩타이드 P5 펩타이드 90 ppm+락토바실러스 포함 사료 급여군)로 나누었다.

실시예 4

[0059] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료의 급여를 통한 사양성적 측정

[0060] 항균 P5 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.

[0061] 그 결과, I기에서 항균 펩타이드 P5를 사료 내 60ppm+ 급여하였을 경우 일당증체량과 일일사료섭취량이 아무것도 처리하지 않은 비교군에 비하여 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 급여군(대조군 I) 및 생균제 급여군(대조군 II)과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여군간에는 60ppm+ 급여군이 40ppm+ 급여군에 비하여 증체량이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). P5 급여군과 대조군 I 급여군간의 비교시에는 대조군 I 급여군이 P5 급여군에 비하여 일당증체량이 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여군과 생균제 급여군간의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

[0062] 또한, II기에서 P5 60ppm+ 급여군이 대조군에 비하여 일당증체량 및 사료요구율에서 유의적으로 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm+ 급여군과 항생제 및 생균제 급여군과의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여군간의 비교시에는 60ppm+ 급여군이 40ppm+ 급여군에 비해 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군과의 비교시에는 항생제 급여군이 P5 급여군에 비하여 일일사료섭취량이 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여군과 생균제 급여군과의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

[0063] 즉, 전체기간으로 볼 때 P5 급여군이 대조군에 비하여 일일사료섭취량을 개선하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

표 1

[0064]

항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 사양성적 변화 측정결과

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
I 기 (0?14일)								
일당증체량, g	275 ^c	308 ^a	295 ^{ab}	282 ^{bc}	302 ^a	3.50	0.032	0.969
일일사료섭취량, g	419 ^c	442 ^a	435 ^{ab}	426 ^{bc}	438 ^{ab}	2.49	0.114	0.547
사료 요구율	1.53 ^a	1.43 ^b	1.47 ^{ab}	1.51 ^{ab}	1.45 ^{ab}	0.01	0.093	0.643
II 기 (14?28일)								
일당증체량, g	352 ^c	401 ^a	378 ^{ab}	367 ^{bc}	392 ^a	5.00	0.096	0.926
일일사료섭취량, g	593 ^b	609 ^a	602 ^{ab}	600 ^{ab}	601 ^{ab}	1.80	0.032	0.690
사료 요구율	1.68 ^a	1.52 ^b	1.59 ^{ab}	1.64 ^a	1.53 ^b	0.02	0.185	0.978
전체 (0?28일)								
일당증체량, g	311 ^b	357 ^a	330 ^{ab}	323 ^{ab}	335 ^{ab}	5.60	0.124	0.745
일일사료섭취량, g	506 ^c	525 ^a	518 ^{ab}	513 ^{ab}	519 ^{ab}	2.60	0.146	0.931
사료 요구율	1.63 ^a	1.48 ^b	1.57 ^{ab}	1.60 ^a	1.55 ^{ab}	0.02	0.169	0.804

[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, P5: 항균 펩타이드,

[0067]

SEM: 표준 오차

실시예 5

[0068]

항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여를 통한 영양소 소화율 측정

[0069]

항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료를 급여받은 이유자돈의 영양소소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 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]

[0071]

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 분석하

였다.

[0072] 그 결과, I기의 건물 및 조단백질 소화율에서 P5 60ppm+ 급여군이 대조군에 비하여 소화율이 높은 것으로 나타났다($p<0.05$), 항생제 및 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여군간의 비교시에는 60ppm+ 급여군이 40ppm+ 급여군에 비하여 건물 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군과의 비교시에는 건물 및 조단백질에서 항생제 급여군이 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

[0073] 또한, II기에서는 항생제 급여군이 건물, 조단백질 및 에너지 소화율에서 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군과의 비교시에는 항생제 급여군이 P5 급여군에 비하여 건물 소화율이 높게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$) (표 2).

표 2

[0074] 향균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 영양소 소화율 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
14일								
건물	80.58 ^d	84.36 ^a	82.60 ^{bc}	81.76 ^{cd}	83.41 ^{ab}	0.36	0.030	0.980
조단백질	79.68 ^c	82.65 ^a	81.40 ^{ab}	80.63 ^{bc}	81.71 ^{ab}	0.28	0.014	0.675
총에너지	78.99	82.48	80.08	79.51	80.76	0.56	0.095	0.963
조회분	49.31	52.83	51.81	50.34	52.97	0.63	0.518	0.935
칼슘	45.80	48.43	46.83	45.39	47.83	0.60	0.339	0.911
인	39.38	42.81	39.96	38.96	41.44	0.61	0.126	0.884
28일								
건물	81.69 ^b	83.76 ^a	82.47 ^{ab}	81.97 ^b	82.61 ^{ab}	0.24	0.029	0.735
조단백질	78.12 ^b	82.38 ^a	78.95 ^b	79.16 ^b	80.77 ^{ab}	0.51	0.078	0.438
총에너지	79.48 ^b	82.82 ^a	80.50 ^{ab}	80.53 ^{ab}	81.46 ^{ab}	0.39	0.060	0.630
조회분	50.74	51.78	50.12	50.39	51.13	0.60	0.502	0.645
칼슘	44.85	47.21	45.28	45.62	45.83	0.55	0.340	0.728
인	42.36	43.65	42.35	42.42	42.63	0.46	0.411	0.887

[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, P5: 향균 펩타이드,

[0077] SEM: 표준 오차

실시예 6

[0078] 향균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 장 및 분 중 미생물 측정

[0079] 향균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 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 펩트리디쉬에 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℃, 48시간 이었다.

[0080] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 14일째의 총 균수와 클로스트리디움 종은 급여군간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나($p>0.05$), 콜리폼 수치에서는 P5 60ppm+ 급여군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 항생제 급여군 및 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군간의 비교에서는 콜리폼 수치가 항생제 급여군에서 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

[0081] 또한, 28일째의 콜리폼 수치는 항생제 급여군이 다른 급여군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), P5 60ppm+과 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p<0.05$). P5 처리구와 항생제 급여군과의 비교시에는 항생제 급여군에서 콜리폼 수치가 낮게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여군과의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

표 3

[0082] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 분 중 미생물 균총 변화 측정 ($\log_{10}$ CFU/g) 결과

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
14일								
총 혐기성 박테리아	8.75	8.56	8.67	8.73	8.62	0.03	0.284	0.964
클로스트리디움 종	7.43	7.18	7.33	7.35	7.24	0.06	0.417	0.806
콜리폼	6.78 ^a	6.37 ^c	6.69 ^a	6.62 ^{ab}	6.51 ^{bc}	0.04	0.011	0.119
28일								
총 혐기성 박테리아	8.61	8.45	8.52	8.59	8.49	0.04	0.456	0.821
클로스트리디움 종	7.34	7.08	7.13	7.18	7.11	0.05	0.611	0.858
콜리폼	6.61 ^a	6.19 ^c	6.53 ^{ab}	6.50 ^{ab}	6.37 ^{bc}	0.04	0.018	0.242

[0083] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 ($p<0.05$).

[0084] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5: 항균 펩타이드,

[0085] SEM: 표준 오차

실시예 7

[0086] P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 혈중 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린M(IgM) 농도 측정

[0087] 이유자돈의 총 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA)와 면역글로불린M(IgM)의 양을 측정하기 위해 자돈의 정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C 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.

[0088] 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 $100\mu\text{L}$ 씩 넣은 후 37°C 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, pH 8.0]을 각 웰당 $200\mu\text{L}$ 씩 넣고 37°C 에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 자돈의 혈청을 웰에 각각 $100\mu\text{L}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. 염소 항-돼지 면역글로불린M-에이치알피 접합 항체, 염소 항-돼지 면역글로불린A-

에이치알피 접합 항체와 염소 항-돼지 면역글로불린M-에이치알피 접합 항체를 접합 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 μ l씩 넣은 후, 37℃에서 1시간 배양하였다. 5회 세척한 후 발색제를 100 μ l씩 넣고 37℃에서 15분간 반응시킨 후 2 M 황산을 각각 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 플레이트를 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

[0089] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 각 처리에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았지만($p>0.05$), 항균 펩타이드 P5의 첨가수준이 높을수록 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린M(IgM)의 농도가 높게 나타났다.

표 4

[0090] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 이유자돈의 혈중 면역글로불린(mg/ml) 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
14일								
면역글로불린G(IgG)	6.98	7.51	7.26	7.21	7.33	0.24	0.727	0.992
면역글로불린A(IgA)	0.33	0.40	0.36	0.34	0.37	0.03	0.743	0.986
면역글로불린M(IgM)	0.86	0.96	0.89	0.90	0.93	0.03	0.638	0.714
28일								
면역글로불린G(IgG)	7.09	7.57	7.30	7.24	7.44	0.37	0.850	0.973
면역글로불린A(IgA)	0.35	0.42	0.39	0.38	0.39	0.05	0.787	0.958
면역글로불린M(IgM)	0.90	1.03	0.91	0.92	0.95	0.06	0.626	0.800

[0091] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여구, PC II: 생균제 급여구, P5 : 항균 펩타이드

[0092] SEM: 표준 오차

실시예 8

[0093] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 장기발달 정도 측정

[0094] 항균 P5 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.

[0095] 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이, 각 처리군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($p>0.05$).

표 5

[0096] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 장기와 소장의 길이변화 측정 결과 (28일)

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
생체 중 대비 장기 무게, %								
심장	0.46	0.54	0.51	0.50	0.53	0.01	0.578	0.907
간	3.25	3.36	3.28	3.29	3.32	0.09	0.822	0.944
폐	1.27	1.34	1.27	1.24	1.28	0.05	0.559	0.981
신장	0.43	0.44	0.43	0.39	0.42	0.02	0.530	0.597
위	0.53	0.62	0.57	0.56	0.58	0.02	0.287	0.906
소장	4.22	4.56	4.51	4.34	4.49	0.15	0.755	0.843
대장	2.15	2.31	2.27	2.20	2.23	0.12	0.814	0.872

길이, cm								
소장	1356.50	1445.75	1490.50	1420.67	1438.50	26.88	0.813	0.507
대장	367.25	412.00	386.25	374.75	397.00	11.92	0.479	0.979

[0097] NC: 대조군, PC I : 항생제 급여군, PC II : 생균제 급여군, P5 : 항균 펩타이드

[0098] SEM: 표준 오차

실시예 9

[0099] **항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 소장 형태 측정**

[0100] 항균 P5 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 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 파라핀으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 아조르 A 와 에오신으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다. 용모높이와 용와 깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

[0101] 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

[0102] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 이유자돈 사료 급여 후, 이유자돈의 소장 형태변화 측정 결과 (28일)

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
음모 길이, μm								
십이지장	684	656	679	649	665	18.35	0.983	0.700
공장	541	574	551	528	546	18.66	0.483	0.848
회장	457	431	451	467	455	20.83	0.634	0.846
음와 높이, μm								
십이지장	323	335	344	343	345	6.44	0.630	0.982
공장	275	233	247	253	276	7.82	0.239	0.485
회장	241	258	213	298	274	20.50	0.663	0.253
음모길이와 음와높이의 비례								
십이지장	2.11	1.96	1.98	1.89	1.92	0.08	0.816	0.733
공장	1.97	2.46	2.24	2.08	1.98	0.11	0.169	0.520
회장	1.90	1.67	2.12	1.57	1.66	0.20	0.776	0.234

[0103] NC: 대조군, PC I : 항생제 급여군, PC II : 생균제 급여군, P5 : 항균 펩타이드

[0104] SEM: 표준 오차

실시예 10

[0105] **P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 사양성적 측정**

[0106] 본 발명에 따른 항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 시험개시, 전기와 후기의 종료시에 측정하였으며 사료섭취량은 체중 측정시 사료 급이통에서 사료잔량의 무게를 측정하였다. 본 시험은 전기와 후기로 나누어 진행하였으며 사양성적의 결과는 표 7과 같다.

[0107] 표 7에 나타난 바와 같이, 전기 기간에는 항생제 급여군이 다른 처리구에 비하여 증체량과 사료섭취량이 개선되

는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm+ 급여군은 대조군에 비하여 증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여군과 항생제 급여군의 비교에서는 항생제 급여군이 증체량에서 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으나($p < 0.05$), 생균제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 후기 기간에 P5 60ppm+ 급여군은 대조군에 비하여 증체량이 개선되었으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 전체 기간으로 볼 때 사료섭취량 및 사료요구율에서는 차이가 나타나지 않았으나($p > 0.05$), 증체량에서 항생제 급여군이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm+ 급여군은 대조군에 비하여 증체량이 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여군과는 차이가 나지 않았다($p > 0.05$) (표 7).

표 7

[0108]

항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 사양성적 변화 측정 결과

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
전기 (0?3주)								
증체량,g	760 ^c	813 ^a	802 ^{ab}	777 ^{bc}	793 ^{ab}	5.51	0.032	0.139
사료섭취량,g	1175	1196	1190	1187	1191	3.86	0.530	0.895
사료요구율	1.55 ^a	1.47 ^c	1.49 ^{bc}	1.53 ^{ab}	1.50 ^{abc}	0.01	0.189	0.100
후기 (3?5주)								
증체량, g	1111 ^c	1228 ^a	1184 ^{ab}	1162 ^b	1207 ^{ab}	11.22	0.067	0.995
사료섭취량,g	2146	2266	2211	2188	2218	20.90	0.338	0.892
사료요구율	1.93	1.85	1.87	1.88	1.84	0.02	0.833	0.912
전체 (0?5주)								
증체량,g	1826 ^d	1996 ^a	1941 ^b	1893 ^c	1955 ^{ab}	14.51	0.012	0.481
사료섭취량,g	3320	3462	3401	3375	3409	22.16	0.304	0.882
사료요구율	1.82	1.73	1.75	1.78	1.74	0.01	0.524	0.822

[0109]

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

[0110]

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5: 항균 펩타이드,

[0111]

SEM: 표준 오차

실시예 11

[0112]

P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료의 영양소 소화율 측정

[0113]

영양소 소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 <실시예 2>의 사료(NC, PC I, PC II, P5)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.

[0114]

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.

[0115]

그 결과, 하기 표 8에 나타난 바와 같이, 시작 기간에는 항생제 급여군이 건물 및 조단백질 소화율에서 가장 높

게 나타났다($p<0.05$). P5 60ppm+ 급여군은 대조군에 비하여 건물 및 조단백질 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$), 항생제 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 항생제 급여군이 건물 및 조단백질 소화율이 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$).

[0116] 후기에는 P5 60ppm+ 급여군이 대조군에 비하여 건물 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). P5 급여군과 항생제 및 생균제 급여군과의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$)(표 8).

표 8

[0117] 향균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 영양소 소화율에 미치는 영향

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
전기 (0?3주)								
건물	77.81 ^b	80.81 ^a	79.17 ^{ab}	78.48 ^b	79.05 ^{ab}	0.34	0.018	0.660
조단백질	68.38 ^c	71.96 ^a	70.30 ^b	69.27 ^{bc}	70.42 ^{ab}	0.35	0.006	0.474
총에너지	74.65	76.29	75.05	74.80	75.02	0.48	0.420	0.933
조회분	45.89	49.78	49.57	47.82	49.65	0.58	0.563	0.634
칼슘	36.10	38.70	37.64	36.86	37.56	0.42	0.239	0.600
인	34.60	37.46	36.97	36.88	36.90	0.53	0.620	0.960
후기 (3?5주)								
건물	76.04 ^c	78.44 ^a	77.13 ^{abc}	76.75 ^{bc}	77.97 ^{ab}	0.26	0.103	0.670
조단백질	65.86 ^b	68.58 ^a	66.45 ^{ab}	65.56 ^b	67.98 ^{ab}	0.41	0.185	0.717
총에너지	74.06 ^b	76.35 ^a	75.04 ^{ab}	74.98 ^{ab}	75.75 ^{ab}	0.31	0.227	0.732
조회분	46.47	47.65	46.86	46.98	46.94	0.46	0.581	0.944
칼슘	35.92	37.78	36.81	36.26	36.57	0.62	0.486	0.815
인	32.94	34.52	33.15	33.09	33.36	0.45	0.554	0.924

[0118] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 ($p<0.05$).

[0119] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5: 향균 펩타이드,

[0120] SEM: 표준 오차

실시예 12

[0121] 향균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 장 및 분 중 미생물 측정

[0122] 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 펩트리디쉬에 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 $\log_{10}$ 으로 환산하였다. 배양조건은 37℃, 48시간이었다.

[0123] 나. 실험결과

[0124] 향균 펩타이드 P5 급여에 의한 분 중 미생물 수치의 변화는 표 9와 같다. 21일째의 총 균수 및 콜리폼 수치는 항생제 급여군에서 가장 낮게 나타났으나($p<0.05$), P5 60ppm+ 급여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여군과 항생제 급여군과의 비교에서는 항생제 급여군의 콜리폼 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

[0125] 35일째에는 P5 처리구가 대조군에 비하여 총 균수 및 콜리폼스 수치가 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), P5

60ppm+ 급여군은 항생제 급여군과의 비교시에도 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여군과 생균제 급여군을 비교할 때 P5 급여군에서 콜리폼 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

표 9

[0126] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 분 중 미생물 군총 변화 측정 결과 ($\log_{10}$ CFU/g)

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
21일								
총 혐기성 박테리아	8.74 ^a	8.49 ^b	8.65 ^{ab}	8.61 ^{ab}	8.54 ^{ab}	0.04	0.378	0.424
클로스트리디움 중	7.49	7.29	7.45	7.41	7.39	0.03	0.258	0.548
콜리폼	6.87 ^a	6.55 ^c	6.73 ^{ab}	6.79 ^a	6.61 ^{bc}	0.03	0.030	0.729
35일								
총 혐기성 박테리아	8.70 ^a	8.38 ^b	8.56 ^{ab}	8.53 ^{ab}	8.46 ^b	0.03	0.173	0.427
클로스트리디움 중	7.44 ^a	7.21 ^b	7.33 ^{ab}	7.35 ^{ab}	7.25 ^{ab}	0.03	0.240	0.667
콜리폼	6.81 ^a	6.37 ^d	6.58 ^b	6.52 ^{bc}	6.47 ^{cd}	0.04	0.029	0.031

[0127] a, b, c: 같은 줄의 각기 다른 어깨 글자의 뜻은 유의적 차이임 ($p<0.05$).

[0128] NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5: 항균 펩타이드,

[0129] SEM: 표준 오차

실시예 13

[0130] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 혈중 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린A(IgA) 및 면역글로불린M(IgM) 농도 변화 측정

[0131] 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°C 에서 보관하였다.

[0132] 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 μL 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 워싱 용액[50 mM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 0.05% 트윈 20, pH 8.0]을 이용하여 3회 세척하였다. 역제 용액[50 mM 트리스, 0.14 M 염화나트륨, 1% 비에스에이(BSA), pH 8.0]을 각 웰당 200 μL 씩 넣고 37°C 에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 육계의 혈청을 웰에 각각 100 μL 씩 넣은 후 37°C 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 μL 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제를 100 μL 씩 넣고 37°C 에서 15분간 반응시킨 후 2 M 황산을 각각 100 μL 씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 플레이트를 450 nm의 흡광도에서 분석하였다.

[0133] 그 결과, 각 처리에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았지만($p>0.05$), 항균 펩타이드 P5의 첨가수준이 높을수록 면역글로불린G, 면역글로불린A 및 면역글로불린M 농도가 높게 나타났다(표 10).

표 10

표 10. 항균 펩타이드(P5)가 육계의 혈중 면역 글로부린(mg/ml)에 미치는 영향								
항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	유의성검증	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
21일								
면역글로불린G	284.94	310.51	302.33	297.73	304.83	11.18	0.685	0.972
면역글로불린A	34.86	37.01	35.19	35.03	38.51	2.25	0.967	0.840
면역글로불린M	78.36	86.52	82.56	79.14	83.39	2.07	0.365	0.851
35일								
면역글로불린G	283.04	314.36	302.60	295.58	308.29	16.64	0.780	0.984
면역글로불린A	35.20	37.21	35.13	35.53	38.68	1.19	0.979	0.557
면역글로불린M	78.94	87.10	82.79	81.43	84.96	2.37	0.593	0.957

NC: 대조군, PC I: 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5: 항균 펩타이드

SEM: 표준 오차.

실시예 14

항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 도체성적 및 장기발달 정도도 변화 측정

항균 펩타이드 P5의 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.

그 결과, 표 11에 나타난 바와 같이, 항생제, 생균제 및 본 발명에 따른 항균 P5 펩타이드가 함유된 사료 급여군에서 유의적인 차이가 나타나지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(표 11).

표 11

항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 장기와 소장의 길이변화 측정 결과 (35일)

항목	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
생체중 대비 도체율, %								
도체중	54.51	57.68	56.20	55.61	56.35	1.07	0.272	0.966
가슴 근육	16.50	16.65	16.18	15.59	16.49	0.46	0.531	0.921
복강지방	1.42	1.24	1.22	1.29	1.25	0.07	0.882	0.796
생체중 대비 장기 무게, %								
심장	0.56	0.59	0.56	0.55	0.58	0.02	0.680	0.926
간	0.47	0.59	0.55	0.57	0.55	0.05	0.845	0.966
소낭	1.76	1.73	1.72	1.73	1.75	0.05	0.948	0.919
위	2.38	2.52	2.41	2.44	2.47	0.07	0.720	0.831
소장	2.75	2.85	2.80	2.76	2.83	0.10	0.833	0.991
대장	0.54	0.63	0.57	0.54	0.56	0.01	0.159	0.640
길이, cm								
소장	161.88	166.83	165.13	159.88	165.78	3.86	0.759	0.830
대장	25.38	27.15	26.13	25.25	26.75	0.62	0.406	0.955

¹NC: 비교군, PC I : 항생제 급여군, PC II: 생균제 급여군, P5 : 항균 펩타이드

²SEM: 표준 오차

[0141] NC: 대조군, PC I : 항생제 급여군, PCII: 생균제 급여군, P5 : 항균 펩타이드

[0142] SEM: 표준 오차

실시예 15

[0143] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 소장 형태 변화 측정

[0144] 항균 P5 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 융와 깊이를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 파라핀으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 아조르 A 와 에오신으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다. 용모높이와 융와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

[0145] 그 결과, 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장) 의 용모길이, 융와높이, 용모길이와 융와높이의 비례를 조사한 결과 항생제 및 항균 펩타이드 P5 첨가에 따른 처리군간의 변화는 나타나지 않았다($p>0.05$) (표 12).

표 12

[0146] 항균 P5 펩타이드를 포함하는 육계 사료 급여 후, 소장 형태 변화 측정 결과 (28일)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm+, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
용모 길이, μm								
십이지장	1746	1933	1780	1863	1822	46.71	0.546	0.679
공장	1060	1114	1151	1120	1085	33.39	0.915	0.627
회장	515	584	564	547	572	17.74	0.662	0.920
융와 높이, μm								
십이지장	661	657	656	664	653	18.21	0.971	0.968
공장	422	414	445	434	437	15.25	0.651	0.851
회장	249	225	242	234	214	6.72	0.975	0.316
용모길이와 융와높이의 비례								
십이지장	2.68	2.96	2.78	2.80	2.87	0.11	0.671	0.879
공장	2.53	2.75	2.70	2.65	2.56	0.13	0.725	0.823
회장	2.13	2.60	2.35	2.35	2.69	0.09	0.739	0.454

[0147] NC: 대조군, PC I : 항생제 급여군, PCII: 생균제 급여군, P5 : 항균 펩타이드

[0148] SEM: 표준 오차

산업상 이용가능성

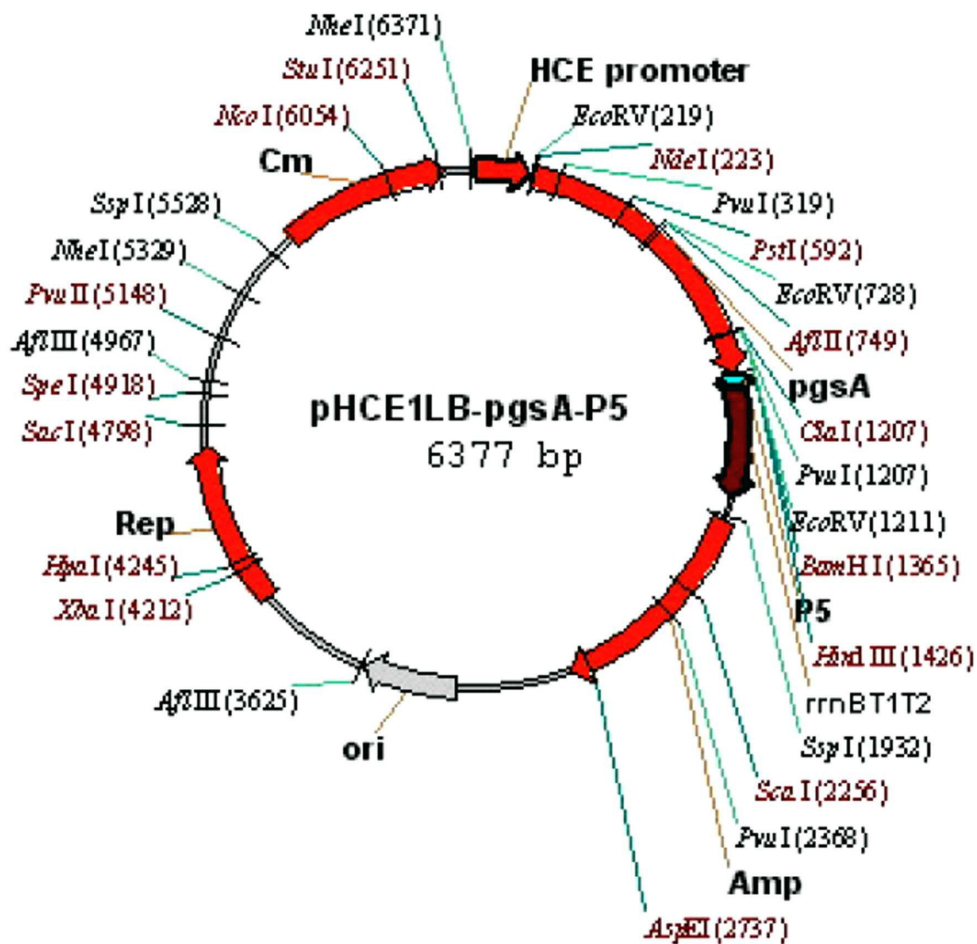
[0149] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 P5 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제는 유해 미생물의 성장을 억제하였으며, 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시켰으므로, 장내 유해 미생물 억제 및 면역 증진 방법으로 사용할 수 있으며, 아울러 영양소 소화율 및 성장을 증진시키는 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

도면1

펩타이드	아미노산 서열	특징
CA-MA	KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF- NH ₂	모체 펩타이드
P1	KWKLFKKIGIGKFL-NH ₂	CA-MA : C-말단 제거 (HSAKKF)
P2	KKKKWKLFKKIGIGKFL-NH ₂	P1 : N-말단 첨가 (KKK)
P3	KWKLFKKIGIGKFLKKK-NH ₂	P1 : C-말단 첨가 (KKK)
P4	KWKKKKKPKFL-NH ₂	CA-MA : C-말단 제거와 치환 (HSAKKF) GIG→Pro L ₄ →K ₄ , F ₅ →K ₅ , I ₈ →K ₈
P5	KWKLLKKPLKKLLKKL-NH ₂	CA-MA : 치환, GIG→Pro L ₄ →K ₄ , F ₅ →L ₅ , K ₆ →L ₆ , I ₈ →K ₈ , K ₁₂ →L ₁₂ , F ₁₃ →L ₁₃ , L ₁₄ →K ₁₄ , H ₁₅ →K ₁₅ , S ₁₆ →L ₁₆ , A ₁₇ →L ₁₇ , F ₂₀ →L ₂₀

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 P5 peptide and method for manufacturing thereof
- <130> 10p-06-46
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 61
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> P5 forward primer
- <400> 1

gatccaagtg gaagaaactg ctcaagaaac cgctgctcaa gaagctgctc aagaaactgt 60

a 61

<210> 2

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5 reverse primer

<400> 2

aagctacagt ttcttgagca gcttcttgag cagccggttt cttgagcagt ttcttcact 60

tg 62

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5 peptide amino acid sequence

<400> 3

Lys Trp Lys Lys Leu Leu Lys Lys Pro Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys

1

5

10

15

Lys Leu