

최 종
연구보고서

기능성 신 품 종 감 자 를 이 용 한 천 연 항 생 제
사 료 (펩 타 이 드) 개 발 및 산 업 화

**Utilization of Protein (Peptide) from Novel
Functional Potato Breeds as Natural Antibiotics in Feed and
its Industrial Application and Development**

주 관 연 구 기 관 : 강 원 대 학 교

협 동 연 구 기 관 : 조 선 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하:

본 보고서를 “기능성 신식품종 감자를 이용한 천연항생제 사료(펩타이드) 개발 및 산업화”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 4월 24일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 채 병 조

세부연구책임자 : 임 학 태

세부연구책임자 : 한 태 욱

협동연구기관명 : 조선대학교

협동연구책임자 : 박 윤 경

요 약 문

I. 제 목

기능성 신식품종 감자를 이용한 천연항생제 사료(펩타이드) 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

항생물질의 사용은 가축생산에 있어서 질병을 예방하고 생산성을 향상시키는데 탁월한 공헌을 하였다. 그러나 항생제의 오남용과 내성의 문제점은 가축의 생산에는 물론 인류의 건강까지 영향을 미치게 되었다(Koch, 1981; Ogawara, 1981; Bark 등, 1996). 따라서 많은 과학자들에 의해 항생제를 대체할 수 있는 새로운 물질의 탐색과 연구가 활발히 이루어지고 있으며 그중에서도 생균제(Probiotics), 산제(Acidifiers), 효소제(Enzymes), 광물질 첨가제(Mineral supplements) 그리고 올리고당(Oligosaccharides) 등이 대표적이다. 최근에는 동물(Zasloff, 1987; Skerlavaj 등, 1999; Henzler 등, 2003;)과 식물(Taniguchi와 Kubo, 1993; Broekaert 등, 1995;)에서 추출된 천연 항균펩타이드(Antimicrobial peptides, AMPs)가 발견되면서 많은 주목을 받고 있다. 항균펩타이드는 저분자단백질로서 선천적인 면역방어시스템에 작용하고 모든 생명체에서 발견되어지고 있다(Boman과 Hultmark, 1987; Boman 등, 1991; Hoffmann, 1995). 또한 항균펩타이드는 광범위한 항균효과를 나타내어 박테리아(Gazit 등, 1994; Saberwal과 Nagaraj, 1994; Steiner 등, 1998), 바이러스 그리고 진균(Quang 등, 1992; Lee 등, 1995; De Lucca와 Walsh, 1999; Lee 등, 1999;)의 성장을 억제시키고 면역능력을 개선함으로써 새로운 항생제 대체제로서의 가능성을 지니고 있다.

국내에서는 신식품종 기능성 감자를 이용하여 항균실험을 실시한결과 기존의 감자품종과는 달리 신식품종 감자인 고구밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)와 골든밸리 (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)에서 뛰어난 항균활성이 나타났으며 항균기능성분인 단백질(항균펩타이드)을 분리하는데 성공하였다(Kim 등, 2005).

따라서, 기능성 신식품종 감자(고구밸리와 골든밸리)로부터 천연항균펩타이드를 분리·정제하여 항생제 대체 첨가제로 활용할 수 있다면 국내 축산업 및 국가 경쟁력에 큰 도움이 될

수 있을 것으로 판단된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 항균능력을 지닌 기능성 신품종 감자로부터 항균단백질(펩타이드)을 추출하여 이유자돈과 육계 사료에 첨가, 급여함으로써 사료첨가제로서의 가치를 평가하고자 한다. 또한, 기능성 감자의 대량생산체계와 더불어 항균단백질(펩타이드)을 대량생산할 수 있는 mass product system을 개발하여 새로운 항생제 대체 사료첨가제의 산업화를 이루고자 아래와 같이 시험을 수행하였다.

제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료개발

- <1차년도> 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구벨리와 골든벨리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치평가
- <2차년도> 검증된 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구벨리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치를 평가하고 challenge study를 통한 면역반응조사

제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식

- <1차년도> 감자유전자원 특성분석평가 및 선발
- <2차년도> 유망 감자유전자원 대량생산체계 확립 및 육성

협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성화조사(천연항균물질 탐색)

- <1차년도> 신품종 감자의 괴경, 잎 및 줄기를 이용한 병원성 미생물에 대한 항생 작용 탐색

<2차년도> 신품종 감자를 이용한 항균활성 단백질의 대량분리 및 가축 병원성 박테리아 및 진균에서 항생활성작용 검색

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료개발

<1차년도> 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리와 골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치평가

본 연구에서는 항균펩타이드가 포함된 두 가지 신품종 감자, 고구밸리와 골든밸리의 감자단백의 사료내 적정첨가수준을 검증하고 무첨가 대조구 그리고 항생제 처리구와 비교평가하기 위하여 자돈과 육계를 이용하여 사양실험을 실시하였다.

실험 1. 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장내 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

감자단백의 급여수준이 자돈의 성장, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 280두의 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc)을 이용하여 28일간의 사양실험을 진행하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 14두였으며 자돈(23±3일령, 개시체중 6.42±0.74kg)은 체중과 성별에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 감자단백(crude potato protein, CPP) 0.25, 0.50 그리고 0.75% 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 CPP는 항균펩타이드(Potamin-1)가 함유된 신품종 감자(고구밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)에서 추출되었다. 전체기간의 사양성적에서는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 일당증체량이 높았고($p<0.05$), 감자단백급여구는 대

조구에 비하여 일당증체량과 일당사료섭취량이 개선되었다($p<0.05$). 높은 수준의 감자단백급여구는 항생제 급여구와 유사한 결과가 나타났다. 영양소 소화율에서 건물(phase I와 II)과 조단백질(phase II) 소화율은 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 높았으며($p<0.05$) 또한, phase II에서 감자단백의 급여수준이 증가함에 따라 건물 소화율의 개선효과가 나타났다($p<0.05$). 감자단백급여에 의한 외관상 아마노산 소화율, 혈액성상 그리고 면역반응에 대한 효과는 나타나지 않았다($p>0.05$). 분중의 총균수(14일)와 *E. coli*(14와 28일) 수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었지만; 감자단백급여구의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus* 수치는 14와 28일에 걸쳐 모두 대조구에 비하여 감소하였다. 맹장과 직장의 총균수, 맹장의 *Staphylococcus* 그리고 직장의 *E. coli* 수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었고 감자단백급여구와 대조구의 비교에서도 비슷한 경향으로 맹장, 결장 그리고 직장의 총균수와 *Staphylococcus*, 그리고 결장의 *E. coli* 수치는 감자단백급여구가 각각 더 낮았다. 그러나 간과 근육의 조단백질과 수분함량, 소화장기의 무게 그리고 소장 형태 조사에서는 항생제 또는 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어볼 때 감자단백의 급여는 자돈의 성장을 개선함으로써 항생제대체 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

실험 2. 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

감자단백의 급여수준이 육계의 성장, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 600수의 Ross종 브로일러(개시체 중 $44.10\pm 3.59g$)를 이용하여 6주간의 사양시험을 진행하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 30수였으며 육계는 체중에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 감자단백(crude potato protein, CPP) 0.25, 0.50 그리고 0.75% 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 CPP는 항균펩타이드(Potamin-1)가 함유된 신품종 감자(고구밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)에서 추출되었다. 항생제 처리구는 감자단백급여구에 비하여 전체기간(0~6주)의 증체량과 사료요율이 개선되었고($p<0.05$) 감자단백의 급여는 전기(0~3주)의 사양성과 전체기간의 증체량 개선효과를 나타냈다($p<0.05$). 전기와 후기의 건물과 조단백질 소화율은 모두 항생제 처리구

가 감자단백급여구에 비하여 높게 나타났으며 감자단백의 급여는 대조구에 비하여 전기의 건물과 조단백질 소화율 그리고 후기의 조단백질 소화율을 개선하였다. 외관상 회장 alanine, aspartic acid, cystine 그리고 glutamic acid의 소화율은 항생제처리구가 감자단백급여구에 비하여 높게 나타났으며 감자단백의 급여는 glutamic acid의 소화율을 개선하였다 ($p<0.05$). 분중의 총균수(28과 42일), *E. coli*(14, 28 및 42일) 그리고 *Staphylococcus*(28과 42일)수치는 항생제처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었지만; 감자단백급여구의 *E. coli*(14일) 그리고 *Staphylococcus*(28과 42일)수치는 모두 대조구에 비하여 감소되었다. 맹장과 총배설장의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 낮았고 감자단백급여구와 대조구의 비교에서도 비슷한 경향으로 맹장과 총배설장의 총균수와 *Staphylococcus* 그리고 맹장의 *E. coli*수치는 감자단백급여구가 각각 더 낮았다. 세포매개성 면역 측정에서 PHA2의 12시간째 수치는 항생제 처리구가 높게 나타났으며, 25일령의 HA 역가는 감자단백급여구가 대조구에 비하여 높게 나타났다($p<0.05$). 그러나 혈액성상, 간과 근육의 조단백질과 수분함량, 소화장기의 무게 그리고 소장 형태 조사에서는 항생제 또는 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어볼 때 감자단백의 급여는 육계의 성장을 개선함으로써 항생제대체 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

실험 3. 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

감자단백의 급여수준이 자돈의 성장, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 280두의 이우자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc)을 이용하여 28일간의 사양시험을 진행하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 14두였으며 자돈(23 ± 3 일령, 개시체중 7.16 ± 0.88 kg)은 체중과 성별에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 감자단백(crude potato protein, CPP) 0.25, 0.50 그리고 0.75% 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 CPP는 항균펩타이드(Potide-G)가 함유된 신품종 감자(골든밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)에서 추출되었다. 전체기간의 사양시험에서는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 일당증체량과 사료요구율이 개선되었고, 감자단백급

여구는 대조구에 비하여 사료요구율이 개선되었다($p<0.05$). Phase I(0~14일)의 건물 소화율과 Phase II(14~28일)의 건물과 조단백질 소화율은 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 높았고 또한 Phase II에서는 감자단백급여수준에 의한 건물 소화율 개선효과가 나타났다($p<0.05$). 감자단백급여에 의한 외관상 아미노산 소화율, 혈액성상, 세포매개성면역과 체액성면역의 변화는 나타나지 않았다. 분증의 총균수(14, 21 및 28일), *E. coli*(21과 42일) 그리고 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 감자단백 급여구에 비하여 적었지만; 감자단백급여구의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치는 21과 28일에 걸쳐 모두 대조구에 비하여 감소되었다($p<0.05$). 결장의 총균수와 맹장과 직장의 *E. coli*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 낮았고; 감자단백급여구에서 맹장과 결장의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치는 각각 대조구에 비하여 감소되었다($p<0.05$). 그러나 간과 근육의 조단백질과 수분함량, 소화장기의 무게 그리고 소장 형태 조사에서는 항생제 또는 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어볼 때 감자단백의 급여는 자돈의 성장을 개선함으로써 항생제대체 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

실험 4. 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

감자단백의 급여수준이 육계의 성장, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 600수의 Ross종 브로일러(개시체 중 $44.21 \pm 2.11g$)를 이용하여 6주간의 사양시험을 실시하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 30수였으며 육계는 체중에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 감자단백(crude potato protein, CPP) 0.25, 0.50 그리고 0.75% 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 CPP는 항균펩타이드(Potide-G)가 함유된 신품종 감자(골든밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)에서 추출되었다. 항생제 처리구는 감자단백급여구에 비하여 후기(4~6주)와 전체기간(0~6주)의 증체량이 개선되었고($p<0.05$) 사료섭취량과 사료이용효율은 각 처리구간에 차이가 없었다($p>0.05$). 전기와 후기의 건물과 단백질의 소화율 그리고 회장의 외관상 cystine의 소화율 모두 항생제 처리구가 대조구에 비하여 높게 나타났으며($p<0.05$) 감자단백급여에 의한 소화율 개선효과는 나타나지 않았다($p>0.05$). 분증의 총균수(14과 42일), *E. coli*(28과 42일) 그리고

Staphylococcus(28과 42일)수치는 항생제처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었지만; 감자단백급여구의 총균수(28일)와 *Staphylococcus*(28과 42일)수치는 모두 대조구에 비하여 감소되었다. 맹장과 총배설강의 총균수와 총배설강의 *E. coli*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 낮았고; 감자단백급여구와 대조구의 비교에서 총배설강의 총균수와 맹장과 총배설강의 *E. coli*수치는 감자단백급여구가 각각 더 낮았다. 혈액성상, 간과 근육의 조단백질과 수분함량, 면역반응, 소화장기의 무게 그리고 소장 형태 조사에서는 항생제 또는 감자단백급여에 의한 변화가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어볼 때 감자단백의 급여는 자돈의 성장을 개선함으로써 항생제대체 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

<2차년도> 검증된 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치를 평가하고 challenge study를 통한 면역반응조사

본 연구에서는 항균효과가 검증된 신품종 감자(고구밸리) 정제(refined)단백의 사료내 적정첨가수준을 검증하고, 무첨가 대조구 그리고 항생제와 비교평가하기 위하여 자돈과 육계를 이용하여 두 차례의 사양실험을 실시하였으며; 정제감자단백과 항생제의 면역반응효과를 비교하기 위하여 자돈과 육계를 이용하여 challenge study를 실시하였다.

실험 5. 자돈 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구

정제감자단백의 첨가수준이 자돈의 성장, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 280두의 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc)을 이용하여 28일간의 사양시험을 진행하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 14두였으며 자돈(23±3일령, 개시체중 5.96±0.66kg)은 체중과 성별에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 정제감자단백(refined potato protein, RPP) 200, 400 그리고 600ppm 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 RPP는 항균펩타이드(Potamin-1)가 함유된 신품종 감자(고구밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)에서 추출되었다. Phase I, Phase II 그리고 전체

기간의 사양성적은 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 높게 나타났다($p < 0.05$). 그러나 정제감자단백의 급여는 대조구에 비하여 phase I의 사료요구율과 phase II의 일당증체량을 개선하였다($p < 0.05$). 영양소 소화율, 외관상 아미노산 소화율, 혈액성상, 면역반응, 간과 근육의 단백질과 수분함량, 소화장기의 무게 그리고 소장의 형태 조사에서는 처리구간에 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 그러나 phase I과 phase II의 칼슘 소화율은 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 높았다. 분(7, 14, 21 및 28일)과 장내 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 현저히 낮았다($p < 0.01$). 또한 정제감자단백급여구는 대조구에 비하여 분중의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치가 감소하였다($p < 0.05$). 이러한 결과로 보아 정제감자단백의 급여는 병원성박테리아를 감소시키고 성장개선효과가 있는 것으로 판단되며 정제감자단백의 사용량을 늘이면 항생제 대체 가능성도 기대할 수 있는 것으로 사료된다.

실험 6. 육계 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구

정제감자단백의 첨가수준이 육계의 성장률, 영양소 소화율, 혈액성상, 면역반응, 소장 형태 그리고 분과 장내 미생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 총 600수의 Ross종 브로일러(개시체중 34.71 ± 2.18 g)를 이용하여 6주간의 사양시험을 진행하였다. 실험설계는 5처리 4반복으로, 반복당 30수였으며 육계는 체중에 따라 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제(기초사료+항생제; positive control, PC), 대조구(기초사료; negative control, NC)와 정제감자단백(refined potato protein, RPP) 200, 400 그리고 600ppm 급여구로 나뉘었다. 실험에 사용된 RPP는 항균펩타이드(Potamin-1)가 함유된 신품종 감자(고구밸리; *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)에서 추출되었다. 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율은 처리구간에 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 또한 항생제와 정제감자단백급여에 의한 영양소 소화율, 외관상아미노산 소화율, 혈액성상, 간과 근육의 조단백질과 수분함량, 면역반응, 소화장기의 무게 그리고 소장의 형태조사의 변화는 없었다($p > 0.05$). 분(21과 28일)과 장내 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 현저히 낮았다($p < 0.01$). 또한 정제감자단백급여구는 대조구에 비하여 분중의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*수치가 감소되었다($p < 0.05$). 그리고 맹장의 총균수와 *Staphylococcus*수치 그리고 총배설장의 *E.*

*coli*수치는 감자단백급여구가 대조구에 비하여 낮았다($p < 0.05$). 이러한 결과로 보아 정제감자단백은 병원성박테리아를 감소시키는 능력이 있는 것으로 판단되며 정제감자단백의 사용량을 늘이면 항생제 대체 효과도 기대할 수 있는 것으로 사료된다.

실험 7. 자돈에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역반응 조사

본 연구에서는 자돈에서 정제감자단백(refined potato protein, RPP)의 급여가 살모넬라 공격접종에 대한 효과를 검토하고자 실시하였다. 세 가지 수준(200, 400 및 600ppm)의 정제감자단백에서 모두 항생제에 비하여 폐사율이 높게 나타났다. 공격접종군의 균수가 비교적 많은 것으로 판명되었을 때 일단 정제감자단백 200ppm을 첨가한 군에서 폐사율이 적은 것으로 보아 정제감자단백 200ppm에서 살모넬라에 대한 방어효과가 있는 것으로 판명되었다. 또한 감자단백의 급여는 세포매개성 면역을 높여주는 것으로 나타났다.

실험 8. 육계에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역반응 조사

본 연구에서는 육계에서 정제감자단백(refined potato protein, RPP)의 급여가 살모넬라 공격접종에 대한 효과를 검토하고자 실시하였다. 정제감자단백의 급여는 병원체로부터 육계를 보호하고 또한 회복에도 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 정제감자단백의 급여는 세포매개성 면역을 높여주는 것으로 나타났다.

나. 제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식

<1차년도> 감자유전자원 특성분석평가 및 선발

감자유전자원 특성분석평가 및 선발된 감자에서의 생리활성 물질을 탐색하고 분석하고 스크린하여 감자 육종소재은행 중에서 생리활성이 높은 감자계통을 찾는 것은 기능성 감자 육종에 있어서 특히 친본의 선정에 있어서 아주 중요한 일이다. 한국 육종소재은행에서는 매년마다 3만여 립의 감자를 과종하고 매년마다 20%씩 3년간 실생선발을 거친 후 예비검

정과 본 검정 단계에 들어간다. 이렇게 선발된 계통은 생산성이 뛰어나고 저항성이 강한 등 농업적 형질을 가지고 있으며 또한 이러한 계통들에 대하여 기능성을 검정하여 기능성 친본을 선정한다. 교잡육종은 농업형질이 뛰어난 계통과 기능성이 높은 계통사이 혹은 서로 다른 기능성 물질을 함유하고 있는 계통들 사이에서 진행하여 다양한 기능성을 지닌 고품질의 감자품종 육성을 동시에 시도하고 있다.

▶ 감자유전자원 확보 및 평가: 각종감자 유전자원의 포장시험

- 다양한 벨리 품종 및 계통을 비롯한 감자 유전자원의 포장시험을 통해서 천연항균물질을 함유한 유망 계통을 선발
- ▶ 감자재배 특성 성분 및 선발: 선발된 계통의 지역 간 품질 특성검정 및 항균물질을 함유한 계통의 비교 검정 및 최종 선발
- 지역 적응시험을 거쳐서 국내기후에 적합한 항균성 물질을 함유한 유망계통을 선발하였고, 또한 다양한 지역에서 UPOV규정에 따라 품종간의 특성평가를 함.

<2차년도> 유망 감자유전자원 대량생산체계 확립 및 육성

천연 항균제를 다량으로 함유한 계통을 선발한 다음, 성장점부분만 남기고, 나머지 부분인 엽원기을(2엽만 남기고) 제거를 한다. 성장점배양을 통해서 생산된 무병주를 계대배양을 하여 급속대량증식을 한다, 계대배양을 통해서 나온 식물체를 순화(상토를 이용)나 양액재배를 통해서 다량의 MT(mini tuber; 소괴경)을 생산을 한다, 생산된 MT를 망실재배를 통해서 원종을 생산을 하고, 생산된 원종을 해발 800m이상인 고랭지 지역에서 재배를 하여 보급종을 생산을 한다. 생산된 보급종(씨감자)은 (주)포테이토벨리를 통해서 유통 및 상품화를 한다.

▶ 다양한 유전자원으로부터 우수 감자 품종 및 계통 스크리닝

▶ 유망 계통의 재배적 특성변화 검정 및 분석

- ▶ 선발된 감자 계통 및 품종의 기내도입 및 증식
- ▶ 우수 감자품종 및 계통의 대량생산체계 확립
- ▶ 감자의 무병주 대량증식 및 씨감자 대량생산과 상품화

다. 협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성조사(천연항균물질 탐색)

(1) 연구의 목적 및 중요성

본 연구로부터 트립신-키모트립신 단백질 분해효소 저해제가 감자(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley and *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)로부터 분리되었다. 그들의 분리 방법은 1차적으로 단백질을 분리 버퍼에서 분획하고, ultrafiltration, C18 HPLC에 의해 단계적으로 수행되었다. 이 트립신-키모트립신 단백질 분해효소 저해제를 Potamin-1(PT-1)과 Potide-G(PT-G)라고 명명하였다. 이들 단백질은 열에는 안정하고 항생효과를 갖지만, 세포에는 독성을 나타내지 않았다. 특히 Potamin-1(PT-1)과 Potide-G(PT-G)는 *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*와 *Clavibacter michiganense subsp. michiganinse*에 강력한 항생효과를 나타내었다. 이들을 단백질 서열 분석하기 위하여 Automated Edman degradation 방법에 의해 N-terminal sequence을 수행하였고 PT-1의 단백질 서열 일부를 읽을수 있었다. 즉, 서열은 NH₂-DICTCCAGTKGCNNTTSANGAFICEGQSDPKPKACPLNCDPHIAYA으로 나타났다.

그리고 이들 서열은 트립신-키모트립신 단백질 분해효소 저해제와 약 62%의 유사성을 나타냈다. 특히 Potamin-1(PT-1)과 Potide-G(PT-G)는 이황화 결합에 의해서 이들 단백질이 서로 연결되었음을 확인할 수 있었으며 이황화 결합은 이들의 항생활성과 단백질분해효소 저해제의 기능을 나타냄에 있어 중요한 서열이라는 것을 분석할 수 있었다.

(2) 연구 내용

본 연구는 감자로부터 단백질의 분리과정 및 동정을 설명하고 있으며, 특히 PT-1은 사람에게 병원성을 나타내는 곰팡이 및 박테리아에 대해 활성을 나타내고, 단백질 분해효소와 유사성을 나타내고 이를 질량분석기에 의해 분자량을 확인함으로써 단백질에 대한 정확한 정보를 확인할 수 있었다.

(3) 연구 결과

본 연구는 PT-1 단백질(펩타이드)을 신품종 감자(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)로부터 분리하였다. 1차적으로 이를 분리하기 위하여 수용성 단백질을 물에서 분리한 후, 열을 가하여 열에 안정한 단백질만 분리하였다. 그 후 ultrafiltration을 이용하여 단백질 분자량 1만 이하의 단백질만 분리하였다. 이들 단백질 분자량 1만 이하의 샘플을 이용하여 C18 reverse-phase HPLC에 의해 단백질을 재분리 하였다. 다음 실험으로 재분리된 이들 단백질을 분획된 부위별로 병원성 곰팡이 및 박테리아에 대해서 항생활성을 측정하였으며, 최종적으로 이들 항생제 기능성 펩타이드를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*와 *Clavibacter michiganense subsp. michiganinse*에 대해서 특히 강력한 항생제 기능을 나타 냈다.

분리된 PT-1펩타이드가 세포 독성을 나타내는지 여부를 확인하기 위해 사람의 적혈구를 분리하여 PT-1을 처리하였고 펩타이드가 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

PT-1은 N-말단 서열분석에 의해 단백질분해효소 저해제와 유사성이 62%임을 확인하였고, 단백질분해효소 저해제의 기능을 하는 것으로 확인되었다.

2. 활용에 대한 건의

1) 신품종 감자인 고구밸리와 골든밸리에서 추출한 펩타이드는 높은 항균활성을 나타냈지만 세포독성은 나타나지 않았다. 따라서 본연구를 통하여 추출된 항균펩타이드는 새로운 개념의 항생제 및 항생제 대체제를 개발하는데 이용가능할 것으로 판단됨.

2) 본 연구에서 추출된 감자단백과 정제감자단백은 사료에서 항생제를 대체하는 효과가 있을 뿐만 아니라 화장품 첨가제와 농약 대체품 등의 상품화를 위한 산업화 등에 활용 가능할 것이다. 또한 아미노산의 일부를 절단함으로써 펩타이드의 길이는 짧으면서 항균활성은 모델 펩타이드보다 우수한 펩타이드를 개량하는데 활용가능하다.

3) 본 연구에서 분리한 Potamin-1과 Potide-G는 항균펩타이드의 항균, 항암, 항진균 작용의 기작을 이해하는데 정보를 제공할 수 있다.

4) 본 연구에서 분리된 강력한 항균 펩타이드를 국내외 감자가공업체와 공동으로 연구하여 생산비용이 적으면서 대량생산 할 수 있는 시스템을 개발하는데 정보로 활용가능하다.

SUMMARY

I . Title

Utilization of novel functional breeds of potato containing antimicrobial peptide as natural antibiotics in feed and its industrial application and development

II . Research Objectives and Background

The use of antibiotics has led to dramatic improvements in treating infectious diseases and has significantly increased food-animal productivity. However, the attention was drawn to the risk of bacterial resistance to certain antibiotics and the potential harm to both human health and animal production. Therefore many feed additives have been studied to find alternative to antibiotics. Up to now, the typical substances are Probiotics, Acidifiers, Enzymes Mineral supplements and Oligosaccharides. Recently, some natural proteins, such as antimicrobial peptides (AMPs), have been isolated and characterized from tissues and organisms representing virtually every kingdom and phylum. Antimicrobial peptides (also called host defence peptides) are an evolutionarily conserved component of the innate immune response and are found among all classes of life. These peptides are potent, broad spectrum antibiotics which demonstrate potential as novel therapeutic agents. Antimicrobial peptides have been demonstrated to kill Gram negative and Gram positive bacteria (including strains that are resistant to conventional antibiotics), mycobacteria (including *Mycobacterium tuberculosis*), enveloped viruses, fungi and even transformed or cancerous cells.

New domestic potato breeds (Gogu valley and Golden valley) have been invented and studies demonstrated these breeds had stronger antimicrobial activity than normal breeds invented previously. Furthermore, some antimicrobial peptides were extracted successfully from these potatoes.

So these new breeds of potato not only can be applied in domestic livestock production, but

also this kind of natural substance can be used as an alternative to antibiotics.

III. Research Scope and Contents

This research is conducted to use this kind of domestic potato breeds containing antimicrobial activity, evaluate its effect when extract potato protein having antimicrobial compounds, and applied to animal production. Moreover, it will establish the techniques for separation, extraction, purification and mass production potato peptide. In order to evaluate this natural antimicrobial peptide substituting for antibiotics in feed industry and animal husbandry, the following researches were conducted during two years period.

Part I: Natural Antimicrobial peptide, application and use as alternative to antibiotic in feed development

<1st Year> To evaluate the efficacy and nutritional properties of crude potato protein (Gogu valley and Golden valley) containing antimicrobial peptide at different dietary inclusion levels and compare with antibiotics.

<2nd Year> Verification and use of the potato protein having antimicrobial peptide in refined form to evaluate its nutritional properties and assess immune response by challenge studies using different dietary inclusion levels and compare with antibiotics.

Part II: Selection and propagation of potato as an alternative to Antibiotics as feed additive

<1st Year> Selecting and evaluation for quality analyze of potato genetic resources

<2nd Year> Development and establishment for mass production of promising potato varieties

Associated Part: Screening of novel potato strains producing natural antimicrobial peptide

<1st Year> Use of tuber, leaf and stem of new potato breeds to scan their antimicrobial activity towards pathogenic microorganism

<2nd Year> Use of new potato breeds to purify potato protein and scan their antimicrobial activity towards pathogenic microorganism in livestock.

IV. Research Results and Proposal for Practical Use

1. Research Results

Part I: Natural antimicrobial peptide, application and use as alternative to antibiotic in feed development

<1st Year> To evaluate the efficacy and nutritional properties of crude potato protein (Gogu valley and Golden valley) containing antimicrobial peptide at different dietary inclusion levels and compare with antibiotics.

The purpose of the study was to evaluate crude potato protein from two different breeds of potatoes (Gogu valley and Golden valley) for their antimicrobial properties and their optimal level of dietary inclusion by comparing with negative control (diet without antibiotics) and positive control (diet added with antibiotics) by conducting four experiments using weanling piglets and broilers.

Experiment 1. Impact of feeding antibiotics and different levels of crude potato protein (Gogu valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in weanling piglets

A total of 280 weanling piglets (Landrace × Yorkshire × Duroc) were used in a 28-d growth study to investigate the effects of feeding crude potato protein (CPP) on growth performance, nutrient digestibility, hematological status, immune response, small intestinal morphology and

bacterial populations in feces and large intestine. These piglets (initially 6.42 ± 0.74 kg and 23 ± 3 d of age) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weight and sex, each treatment comprised of four pens and each pen had 14 piglets. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.15% apramycin and 0.10% colistin sulfate); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 0.25, 0.50 and 0.75% of CPP. This CPP was extracted from a special potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) containing antimicrobial peptides (Potamin-1). PC treatment showed significantly ($p < 0.05$) higher ADG than CPP, but CPP showed linear improvement ($p < 0.05$) in ADG and ADFI. The digestibility of DM (phase I and II) and CP (phase II) was found to be significantly ($p < 0.01$) higher in piglets fed PC diets as compared to piglets fed CPP diets. There was also a linear increase ($p < 0.05$) in digestibility of DM (phase II) with increasing levels of CPP. The feeding of CPP to piglets had no effect ($p > 0.05$) on their apparent ileal digestibilities of amino acids, hematological status and immune response. The population of total bacteria (d 14) and *E. coli* (d 14 and 28) in the feces of piglets was found to be significantly ($p < 0.05$) lower in PC compared with piglets fed of CPP, and CPP fed piglets had reduced population of total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in feces on d 14 and 28 than NC. The total bacteria in caecum and colon, *Staphylococcus* in caecum and *E. coli* in rectum were significantly ($p < 0.05$) lower in PC. Similarly, CPP had lower (linear, $p < 0.05$) total bacteria and *Staphylococcus* in caecum, colon and rectum, and *E. coli* in rectum than NC. The CP and moisture concentration of liver and muscle; organ weights and small intestinal morphology were not affected by either CPP or PC. These results suggest that CPP may be an alternative to medicated feed with antibiotics since it was effective in reducing the pathogenic bacteria and improved performance of piglets.

Experiment 2. Impact of feeding antibiotics and different levels of crude potato protein (Gogu valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in broilers

A total of 600 broiler (Ross, day old) chicks were used in a 6-wk growth study to investigate the effect of feeding different levels of crude potato protein (CPP) on their growth

performance, apparent nutrient and ileal amino acid digestibility, hematological indices, immune response, small intestinal morphology and bacterial populations in feces and large intestine. These birds (initially 44.10 ± 3.59 g) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weights, each treatment comprised of four replicates and each replicate had 30 birds. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.05% avilamycin); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 0.25, 0.50 and 0.75% of CPP. This CPP was extracted from a special potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) containing antimicrobial peptides (Potamin-1). Birds fed PC diets had higher ($p < 0.01$) overall (0 ~ 6 wk) body weight gain and improved feed efficiency ($p < 0.05$) and those fed CPP diets showed improved performance during starter phase and higher ($p < 0.05$) overall body weight gain than birds fed NC diets. The digestibility of DM and CP was higher ($p < 0.05$) in PC during both the phases and feeding of CPP improved ($p < 0.05$) the DM (starter phase) and CP (starter and finisher phase) digestibility when compared with birds fed NC diets. The ileal digestibility of alanine, aspartic acid, cystine and glutamic acid were higher in PC, and feeding of CPP improved ($p < 0.05$) the ileal digestibility of glutamic acid. The populations of total bacteria (d 28 and 42), *E. coli* (d 14, 28 and 42) and *Staphylococcus* (d 28 and 42) were lower ($p < 0.01$) in the feces of birds fed PC diets and birds fed CPP diets had lower ($p < 0.01$) population of *E. coli* (14 d) and *Staphylococcus* (d 28 and 42) in the feces than those fed NC diets. The populations of total bacteria, *E. coli*, and *Staphylococcus* in the caecum and cloaca were lower in PC and CPP had lower (linear, $p < 0.05$) total bacteria and *Staphylococcus* in caecum and cloaca, and *E. coli* in caecum than NC. The cutaneous basophilic hypersensitivity in terms of PHA2 at 12 h was higher ($p < 0.01$) in PC and HA titer were greater (linear $p < 0.05$) in piglets fed CPP than those fed NC diet. The hematological indices, CP and moisture concentration of liver and muscle, organ weights and morphology of small intestinal did not vary among the dietary treatments. These results suggest that birds fed crude potato protein had improved growth performance and lower pathogenic bacteria and hence can be a potential candidate to replace antibiotics in feed.

Experiment 3. Impact of feeding antibiotics and different levels of crude potato protein (Golden valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient

digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in weanling piglets

A total of 280 weanling piglets (Landrace × Yorkshire × Duroc) were used in a 28-d growth study to investigate the effects of feeding crude potato protein (CPP) on growth performance, nutrient digestibility, hematological status, immune response, small intestinal morphology and bacterial populations in feces and large intestine. These piglets (initially 7.16 ± 0.88 kg and 23 ± 3 d of age) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weight and sex, each treatment comprised of four pens and each pen had 14 piglets. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.15% apramycin and 0.10% colistin sulfate); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 0.25, 0.50 and 0.75% of CPP. This CPP was extracted from a functional potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) had antimicrobial activity. PC treatment showed significantly ($p < 0.05$) higher overall ADG and improved FCR and CPP showed improvement ($p < 0.05$) in FCR when compared with NC treatment. In phase I (d 0 ~ 14) the digestibility of DM was found to be significantly ($p < 0.05$) higher in piglets fed PC diets as compared to piglets fed CPP diets. However, in phase II (d 14 ~ 28) piglets fed PC diets had significantly ($p < 0.05$) higher DM and CP digestibility than piglets fed CPP diets. There was also an increase (linear, $p < 0.05$) in digestibility of DM with increasing levels of CPP. The feeding of CPP to piglets had no effect ($p > 0.05$) on their apparent ileal amino acids digestibility, hematological status, cutaneous basophilic hypersensitivity as well as humoral immune response. The population of total bacteria (d 14, 21 and 28), *E. coli* (d 21 and 28) and *Staphylococcus* (d 21 and 28) in the feces of piglets was found to be significantly ($p < 0.05$) lower in PC and CPP fed piglets had reduced population of total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in feces on d 21 and 28 than NC. The total bacteria in rectum and *E. coli* in caecum and colon were significantly ($p < 0.05$) lower in PC and CPP had lower (linear, $p < 0.05$) total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in caecum and rectum than NC. However, the CP and moisture concentration of liver and muscle, organ weights and small intestinal morphology was not affected either by CPP or PC. These results suggest that CPP may be potential alternative to antibiotics as it was effective in reducing the pathogenic bacteria and improved performance of piglets.

Experiment 4. Impact of feeding antibiotics and different levels of crude potato protein (Golden valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in broilers

A total of 600 broiler (Ross, day old) chicks were used in a 6-wk growth study to investigate the effect of feeding different levels of crude potato protein (CPP) on their growth performance, apparent nutrient and ileal amino acid digestibility, hematological indices, immune response, small intestinal morphology and bacterial populations in feces and large intestine. These birds (initially 44.21 ± 2.11 g) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weights, each treatment comprised of four replicates and each replicate had 30 birds. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.05% avilamycin); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 0.25, 0.50 and 0.75% of CPP. This CPP was extracted from a functional potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) that had antimicrobial activity. The body weight gain was higher ($p < 0.01$) during the overall (0 ~ 6 wk) and finisher (3 ~ 6 wk) phase in birds fed PC diets; however, the feed intake and FCR were comparable among the dietary treatments. The digestibility of DM and CP and the ileal digestibility of cystine were higher in birds fed PC diets in both the phases as compared with birds fed CPP diets. The populations total bacteria (d 14 and 42), *E. coli* (d 28 and 42) and *Staphylococcus* (d 28 and 42) were lower ($p < 0.01$) in the feces of birds fed PC diets and these fed CPP diets had lower ($p < 0.01$) population of *Staphylococcus* (28 and 42 d) and total bacteria (28 d) in the feces than those fed NC diets. The populations of total bacteria in the caecum and cloaca and *E. coli* in the cloaca were lower ($p < 0.01$) in PC fed birds and CPP fed broilers had lower population of total bacteria in cloaca and *E. coli* in caecum and cloaca than broilers fed NC diets. The hematological indices, CP and moisture concentration of liver and muscle, immune response, organ weights and morphology of small intestinal did not vary among the dietary treatments. These results suggest that crude potato protein was effective in reducing the pathogenic bacteria and hence can be a potential candidate to replace antibiotics in feed.

<2nd Year> Verification and use of the potato protein having antimicrobial peptide in refined form to evaluate its nutritional properties and assess immune response by challenge studies using different dietary inclusion levels and compare with antibiotics.

The purpose of the study was to evaluate the breed of potato having antimicrobial peptide by further refinement of crude potato protein (Gogu valley) and determine optimal level for the dietary inclusion of refined potato protein and compare with negative control (diets without antibiotics) and positive control (diets added with antibiotics) by conducting two experiments using weanling piglets and broilers. And also compare the immune response by challenge studies in weanling piglets and broilers.

Experiment 5. Impact of feeding antibiotics and different levels of refined potato protein (Gogu valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in weanling piglets

A total of 280 weanling piglets (Landrace × Yorkshire × Duroc) were used in a 28-d growth study to investigate the effects of feeding refined potato protein (RPP) on growth performance, nutrient digestibility, hematological status, immune response, small intestinal morphology and bacterial populations in feces and large intestine. These piglets (initially 5.96 ± 0.66 kg and 23 ± 3 d of age) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weight and sex, each treatment comprised of four pens and each pen had 14 piglets. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.15% apramycin and 0.10% colistin sulfate); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 200, 400 and 600 ppm of RPP. This RPP was extracted from a special potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) containing antimicrobial peptides (Potamin-1). The overall growth performance (ADG, ADFI and FCR) was improved ($p < 0.01$) in PC, and feeding of RPP improved (linear, $P < 0.05$) FCR in phase I (d 0 ~ 14) and higher ADG in phase II (d 14 ~ 28) than NC. Dietary treatments had no effect on the apparent nutrient and ileal amino acid digestibilities, hematological status, cutaneous

basophilic hypersensitivity, humoral immune response, CP and moisture concentration of liver and muscle, organ weights and morphology of small intestinal. However, the digestibility of Ca was higher in PC in both the phases. The total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in the feces of piglets (d 7, 14, 21 and 28) and large intestine were lower ($p<0.01$) in PC and RPP had lower total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in feces on d 14, 21 and 28 as compared with NC. These results suggest that piglets fed antibiotics had improved performance; however, feeding of RPP was effective in reducing the pathogenic bacteria and improved performance of piglets. Lower levels of RPP were used in the present study, but based on the results use of higher levels of RPP might show further improved growth performance.

Experiment 6. Impact of feeding antibiotics and different levels of refined potato protein (Gogu valley) containing antimicrobial peptide on the growth performance, nutrient digestibility, small intestinal morphology, fecal and intestinal microflora, and immune response in broilers

A total of 600 broiler (Ross, day old) chicks were used in a 6-wk growth study to investigate the effect of feeding different levels of refined potato protein (RPP) on their growth performance, apparent nutrient and ileal amino acid digestibility, hematological indices, immune response, small intestinal morphology and bacterial populations in feces and large intestine. These birds (initially 34.71 ± 2.18 g) were randomly allotted to five treatments on the basis of their body weights, each treatment comprised of four replicates and each replicate had 30 birds. Dietary treatments included: PC (positive control; basal diet + 0.05% avilamycin); NC (negative control; basal diet); and supplemented with 200, 400 and 600 ppm of RPP. This RPP was extracted from a special potato breed (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) containing antimicrobial peptides (Potamin-1). The body weight gain, feed intake, FCR, apparent nutrient and ileal amino acid digestibility, hematological status, CP and moisture concentration of liver and muscle, cutaneous basophilic hypersensitivity, humoral immune response, organ weights and morphology of small intestinal did not vary among the dietary treatments. The population of total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in the feces (d 21 and 42) and large intestine of broilers fed PC diets was lower ($p<0.01$) than broilers fed RPP diets and feeding of RPP was

effective in reducing the populations of total bacteria, *E. coli* and *Staphylococcus* in the feces of broilers on d 21 and *E. coli* on d 42 as compared with broilers fed NC diets. Birds fed RPP had lower (linear, $p < 0.01$) total bacteria and *Staphylococcus* in caecum and *E. coli* in cloaca than birds fed NC diets. These results suggest that antibiotics had more impact in reducing pathogenic bacteria than RPP. But use of RPP at higher levels may show higher antimicrobial activity and also improve the growth performance of broilers.

Experiment 7. Challenge study using antimicrobial peptide (refined protein, Gogu valley) protein and antibiotics in weanling piglets

Effect of refined potato protein (RPP) against *Salmonella typhimurium* challenge in weaning piglets were observed. Three different concentrations (200, 400, and 600 ppm) of refined potato protein did not prevent from mortality compared with the antibiotic treated group. However, the treatments of refined potato protein affected the recovery from clinical signs in pigs fed with 200 ppm refined potato protein. Cutaneous basophil hypersensitivity (cell mediated immunity) was also significantly enhanced by the refined potato protein treatments.

Experiment 8. Challenge study using antimicrobial peptide (refined protein, Gogu valley) protein and antibiotics in broilers

Effect of refined potato protein (RPP) against *Salmonella gallinarum* challenge in broilers was also studied. Treatment of refined potato protein prevented from the clinical signs and affected the recovery of the clinical signs. Cutaneous basophil hypersensitivity was also significantly enhanced by the refined potato protein treatments.

Part II: Selection and propagation of potato as an alternative to antibiotics as feed additive

<1st Year> Selection and evaluation for quality analyzing of potato genetic resources

There has been great trend in the potato eating style in developed countries. There was no potato varieties with natural antibiotics in Korea. The purpose of this study was to select functional potato varieties with antibiotics. This research was a three-year project. Already selected advanced clones were used for the adaptation experiments at three different locations. The content of antifungal protein in potato varieties has been measured by C₁₈ RP-HPLC respectively.

- ▶ To guarantee and select quality analyzing of potato: an experiment in soil about each potato genetic source
- To select promising potato with natural antibiotics through a soil test on potato genetic source of various valley varieties and lines
- ▶ Selection and component quality in potato cultivation: quality analyzing at three different locations and comparison analyzing for lines with natural antibiotics, final selection
- To select suitable promising lines with natural antibiotics in internal climate through location adaptation test, also to evaluate quality of varieties in various location by UPOV regulation

<2st Year> Development and establishment for mass production system of promising potato varieties

Promising potato have been selected lines with much natural antibiotics and then have been leaved a growth point and have attached 2 leaves, To produce mass-production which produce virus-free plant in meristem culture.

Plants which produced virus-free plant in meristem culture have produced MT(mini tuber) to acclimation proliferation and nutriculture.

Produced MT(to acclimation proliferation and nutriculture) has made of seed potato in net-house cultivation. Produced seed potato has made of a supply breed to Goreangji (800 meters above the sea level). Produced seed potato was marking and was commercializing by *potato valley* company.

- ▶ To screen the promising potato varieties and lines.
- ▶ To analyze cultivation quality of promising potato varieties and lines.
- ▶ To introduce into *in vitro* condition and to propagate the selected potato varieties and lines.
- ▶ To establish mass production system of superior potato varieties and lines.
- ▶ Mass production and commercialization with the virus-free potatoes.

Associated Part: Screening of novel potato strains producing natural antimicrobial peptide

(1) Goal and importance

A trypsin-chymotrypsin protease inhibitor was isolated from the tubers of the potatoes (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley and *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) by extraction of the water-soluble fraction, dialysis, ultrafiltration, and C18 reversed-phase high performance liquid chromatography. This inhibitor, which we named Potamin-1 (PT-1) and Potide-G (PT-G), were thermostable and possessed antimicrobial activity but lacked hemolytic activity. PT-1 and PT-G strongly inhibited pathogenic microbial strains, including *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, and *Clavibacter michiganense subsp. michiganense*. Automated Edman degradation showed that the N-terminal sequence of PT-1 was NH₂-DICTCCAGTKGCNTTTSANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYA-.

The sequence had 62% homology with a serine protease inhibitor belonging to the Kunitz family, and the peptide inhibited chymotrypsin, trypsin, and papain. This protease inhibitor, PT-1 and PT-G, were composed of polypeptide chains joined by disulfide bridge(s). Reduced PT-1 and PT-G almost completely lost its activity against fungi and proteases indicating that disulfide bridge is essential for its protease inhibitory and antifungal activity.

(2) Contents and Scope

We describe the purification and characterization of the antimicrobial peptide Potamin-1 (PT-1) from potato tubers. PT-1 inhibits human pathogenic fungal and plant pathogenic bacterial strains, and it shows sequence homology with a protease inhibitor produced by potatoes upon fungal attack. Finally, we characterized the protease inhibitor activity of PT-1 and determined its molecular mass by mass spectrometry.

(3) Results

We have isolated a PT-1 peptide from the potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu Velley). These water soluble peptide was first extracted from potato tubers and dialyzed using 1,000 MWCO dialysis tubing. The retained >1 kDa-components were then boiled to obtain heat-stable peptides and subjected to ultrafiltration using a 10,000 MWCO membrane. Thus, three components were obtained: >10 kDa, <10 kDa - >1 kDa, and <1 kDa. The component with a mass <10 and >1 kDa was the most active. This component was subjected to further fractionation by C18 revers-phase HPLC.

We next examined the antimicrobial activity of the purified peptides against various human and plant pathogenic microbial cells by assessing the minimum inhibition concentration (MIC). Peptides had antimicrobial activity against the human pathogenic fungus *C. albicans*, the plant pathogenic fungus *R. solani*, and the pathogenic bacterium *C. michiganense*. The microbicidal effect of PT-1 was further visualized by treating *C. michiganense* and *C. albicans* with PT-1 and then spreading the cells on agar plates.

We next examined the cytotoxicity of peptides against mammalian cells by measuring the lysis of human erythrocytes. These peptides had no hemolytic activity, whereas melittin, used as a positive control for lysis, was strongly hemolytic. These results demonstrated that peptides have a remarkable antimicrobial activity against various microbial cells but no hemolytic activity.

We found that PT-1 sequence was 62% identical to potato serine protease inhibitor and is a dimeric protein belonging to the Kunitz superfamily of protease inhibitors.

2. Proposal for Practical Use

1) The peptides derived from new breeds potatoes, Gogu valley and Golden valley, possessing the higher antimicrobial activity but no cellular toxicity. We will apply these results to the developments of the antimicrobial peptides as therapeutic antibiotics.

2) In present study, isolated CPP and RPP can be used not only as an alternative in feed industry, but also as additives in cosmetics and alternative to agricultural chemicals, which suggests potato peptide can be applied commercially and industrially in above fields. In addition, new peptide can be obtained by shortening amino acid length, which exhibits higher antimicrobial activity than model peptide. This can be applied in new breed development.

3) Isolated Potamin-1 and Potide-G provides valuable information in understanding the mechanism of antimicrobial peptide on antibacterial, antifungal and anticancer.

4) The isolation procedure for antimicrobial peptide in present research decreases the cost of it's production, which provides valuable information in application of mass production.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	30
Section 1. Research Objectives and Background	30
Section 2. Research Scope and contents	32
Chapter 2. Literature Review and Information	35
Chapter 3. Research Results and Discussion	36
Section 1. Part I: Natural Antimicrobial peptide, application and use as alternative to antibiotic in feed development	36
Section 2. Part II: selection and propagation of potato as an alternative to antibiotics as feed additive	121
Section 3. Associated Part: Screening of novel potato strains producing natural antimicrobial peptide	139
Chapter 4. Achievement and contribution to related industry	152
Section 1. Achievement of the study	152
Section 2. Contribution to related industry	157
Chapter 5. Practical Use and Field Application	158
Chapter 6. Overseas gathering of information & technology	159
Chapter 7. References	160

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	30
제 1 절	연구개발의 필요성 및 목적	30
제 2 절	연구개발의 내용 및 범위	32
제 2 장	국내외 기술개발 현황	35
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1 절	제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료 개발	36
제 2 절	제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식	121
제 3 절	협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성화조사 (천연항균물질 탐색)	139
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	152
제 1 절	목표달성도	152
제 2 절	관련 산업에의 기여도	157
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	158
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	159
제 7 장	참고문헌	160

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적

현대축산은 단기간동안의 빠른 성장을 목적으로 다두사육시스템을 도입함으로써 질병이 만연하여 엄청난 어려움을 겪고 있다. 특히 자돈에서는 폐렴, 돼지유행성 설사병(PED), 전염성 위장염(TGE)이나 로타바이러스성 장염과 같은 질병이 지속적으로 발생하며, 그 결과 질병예방 및 치료 목적으로 항생제 사용이 불가피한 실정이다.

항생제는 질병예방과 치료의 목적이외에도 증체율과 사료효율을 개선하는 성장촉진제로 장기간 사용되어 왔으나 가축에서의 오남용과 이로 인한 항생제에 대한 저항유전자의 출현이 보고되고 있으며 인류의 건강에도 영향을 끼칠 수 있을 것으로 보고되고 있다(Koch, 1981; Ogawara, 1981; Russell, 1991; Bark 등, 1996; Kang 등, 1996). 따라서 유럽과 미국에서는 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있으며 우리나라에서도 현재 시중에 유통되고 있는 항생제의 종류를 제한해 가고 있으며 여러 가지 새로운 대체 물질의 개발이 시급한 상황이다.

새로운 사료첨가제로서 천연물질 유래의 무독성 항균제 개발이 관심의 대상이 되고 있다(Mitscher 등, 1987; Taniguchi와 Kubo, 1993;). 근래 국내에서 개발된 신품종 감자를 통한 실험에서 기능성 감자에서 추출된 항균펩타이드의 항균효과가 검증되었다. 기존의 “수미, 대서”와 같은 품종에서는 항균효과가 나타나지 않았으나 신품종 감자에서 추출된 단백질은 항균활성이 높게 나타났으며 항균활성성분인 펩타이드(단백질)의 분리에 성공하였다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 개발된 기능성 감자로부터 분리한 항균펩타이드가 포함된 감자 단백을 이용하여 항생제 대체효과를 구명하여 항생제 대체 사료첨가제로서의 가치를 검토해 보고자 본 연구를 수행하였다.

1. 기술적 측면

천연식물성 항균제는 식물성 천연살균 소독제로서 독성이 없고, 부식성이 없으며 인체에

전혀 무해한 안전한 천연항균제로 알려져 있다. 그러나 실제로 현재 천연항균제 사료로 이용되고 있는 식물체들은 거의 찾아보기가 힘들다. 그 이유는 재배규모가 작거나, 국내에서 많이 재배되고 있지 않으며 재배방법이 어려운 것들이어서 원료수급이 원활하지 못하기 때문에 쉽게 이용되지 못하고 있다. 또한, 실질적인 가축에 적용한 항생제 대체 항균작용 검증이 안되어진 상태이다.

감자는 재배지역이 넓으며 그 수량 또한 많기 때문에 물량확보가 용이하다. 본 연구진인 강원대학교 농생대 임학태 교수 연구팀은 감자로부터 천연항균단백질(펩타이드)을 분리하였고 항균작용을 검증하였다. 이미 항균펩타이드가 포함된 기능성 식품종 감자는 특허권을 취득한 상태로써 이에 대한 단독연구가 용이하다. 그러므로 항균검증을 거친 항균단백질(펩타이드)에 대한 충분한 사양시험과 면역 및 생리적인 반응을 통하여 동물사료에서 항생제 대체 효과를 구명하고자 한다.

2. 경제 · 산업적 측면

일반적으로 항생제는 사료효율과 성장능력을 3~6% 개선함으로써 생산성 증진과 생산비 절감에 효과적이다. 감자를 이용한 천연항균제 사료를 개발하여 항생제를 대체할 경우 가축의 질병을 예방할 뿐만 아니라 항생제 사용을 줄일 수 있다. 또한 항생제 저항성 균주의 출현을 효과적으로 막을 수 있으며 성장률과 사료효율을 개선시켜 생산비를 줄이는 효과도 기대할 수 있다.

현재 가축에 사용되고 있는 항생제는 거의 전부 수입에 의존하고 있는 실정으로 감자에서 분리한 천연항균제를 이용하게 되면 산업적으로 많은 이익이 창출될 수 있다. 또한, 감자소비의 다양성을 꾀할 수 있다는 측면에서 중요하며, 앞으로는 가축의 항생제 사용 규제가 강화되어 천연항균제의 개발은 더욱 절실할 것으로 판단된다.

3. 사회적 측면

가축생산에서 항생제를 무절제하에 사용할 경우 인간의 건강을 위협할 수 있다. 감자단백과 같은 천연의 항생제 대체제를 사용함으로써 국민건강에 유익할 뿐만 아니라 최근 많은 관심이 되고 있는 안전한 축산물을 생산함으로써 국민의 먹거리를 보호하고 안전한 식품으로서 축산물의 부가가치 창출을 통한 수익을 확대시킬 수 있다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 국내에서 개발된 기능성 신품종 감자품종 두 가지(고구밸리, *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley와 골든밸리 *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)를 이용하여 감자단백을 추출하여 항균효과시험을 진행한 다음 자돈과 육계에서 항생제 대체시험을 실시하였다. 또한 검증된 감자품종에서 우수한 품종을 선택하여 정제감자단백을 분리하여 항생제 대체효과를 검증하고 신품종 감자의 대량생산체계와 사료자원개발을 위한 연구를 수행하였다.

제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료개발

<1차년도> 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리와 골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치평가

- 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구
- 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구
- 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구
- 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

<2차년도> 검증된 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치를 평가하고 challenge study를 통한 면역반응조사

- 자돈 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구벨리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구
- 육계 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구벨리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구
- 자돈에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역 반응 조사
- 육계에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역 반응 조사

제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식

<1차년도> 감자유전자원 특성분석평가 및 선발

- 항생작용 있는 감자 유전자원 확보 및 평가
- 항생작용 물질을 함유한 감자재배 특성 분석 및 선발

<2차년도> 유망 감자유전자원 대량생산체계 확립 및 육성

- 다양한 유전자원으로부터 우수 감자 품종 및 계통스크리닝
- 유망 계통의 재배적 특성변화 검정 및 분석
- 선발된 감자 계통 및 품종의 기내도입 및 증식
- 우수 감자품종 및 계통의 대량생산체계 확립
- 감자의 무병주 대량증식 및 씨감자 대량생산과 상품화

협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성조사(천연항균물질 탐색)

<1차년도> 신품종 감자의 괴경, 잎 및 줄기를 이용한 병원성 미생물에 대한 항생 작용 탐색

- 감자의 괴경, 잎 및 줄기로부터 단백질 추출 및 분리
- 1차 천연 항생제 작용 검색
- 항생제 기능성 단백질을 함유한 감자인 고구벨리와 골든벨리로부터 crude 단백질(펩타

이드)의 분리

<2차년도> 신품종 감자를 이용한 항균활성 단백질의 대량분리 및 가축 병원성 박테리아
및 진균에서 항생활성작용 검색

- 사료 실험을 위한 **refined** 단백질(고구벨리)의 대량 분리
- **Amicon**을 이용한 단백질(펩타이드)의 크기별 절단
- 단백질(펩타이드)의 활성부위 1차 탐색
- **Reverse-Phase HPLC**에 의한 **refined** 단백질(고구벨리)의 분리
- 항균활성의 측정
- 항진균 활성의 측정
- 단백질(펩타이드) 서열분석
- 항생제 활성 단백질의 분자량 확인
- 세포독성에 대한 검사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

기능성 단백질(펩타이드) 및 생리활성기능이 향상된 단백질을 개발하여 농·화학, 의학, 제약학, 식품화학 및 화장품 등의 기능성 첨가제 측면에서 상품화하고자하는 연구가 선진국에서는 진행되어지고 있다. 그러나 국내에서는 이와 같은 연구가 아직까지는 미흡한 실정이며, 이러한 연구의 수단이 되는 단백질(펩타이드)의 분리 및 분석기술도 아직은 미약한 실정이다.

국외의 펩타이드에 관한 연구로는 Cecropin A, Magainin, Melittin 및 sapecin, apidaecin등에 대한 연구가 진행 중이나 작용기작은 아직 잘 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 미국 캘리포니아 라졸라 스크립스 연구소의 레자 가디리 박사는 식물이나 동물들이 천연 상태에서 세균감염을 퇴치하기 위해 만들어 내는 강력한 항균작용의 단백질을 합성하는데 성공하였고, 이러한 연구 결과로 9개의 관형 환상 단백질(cyclic peptide nanotubes)으로 알려진 이 물질은 도넛처럼 세균의 세포벽 내에 쌓여 세균을 사멸시킬 수 있는 구멍을 만든다고 연구팀은 밝혔다. 분명한 것은 항균활성을 지니는 펩타이드는 여러 종이 알려져 왔으나 이들의 사료적 가치에 대해서는 연구된바가 전혀 없는 실정이다.

국내에서는 기능성 신품종 감자품종인 고구밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)와 골든밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)로부터 항균활성을 나타내는 단백질(펩타이드)인 "Potamin-1, Potamin-2, Potide-G"(Kim 등, 2005; Kim 등, 2006)를 분리하였으며 측정결과 식중독을 유발하는 세균 및 곰팡이에서 강한 항균 활성을 나타냈으며, 특히 단백질분해 효소 저해 작용을 가짐으로써 항균 기능을 나타냄을 알 수 있었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료개발

<1차년도> 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구벨리와 골든벨리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치평가

실험 1. 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구벨리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장외의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

감자는 식품으로 많이 소비되고 있으며 영양학적가치도 우수한 편이다. 또한 감자는 항미생물(Han 등, 1996), 항균(Do 등, 2004), 항암(Berrocal-Lobo 등, 2002) 및 소화기의 궤양을 예방하는데(Pouvreau 등, 2001) 효과적이라고 알려져 왔다. 본 실험에서 사용한 기능성 감자인 고구벨리는 국내에서 개발된 신품종으로써 표피는 적색이고 단백질 함량이 높으며 항균 펩타이드인 PT-1을 포함하여 항균실험에서 높은 항균활성을 나타내었다. 본 실험은 고구벨리에서 1차적으로 추출된 감자단백(펩타이드)과 항생제와의 비교를 통하여 자돈에 대한 항균효과와 성장, 면역 그리고 소화율에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 감자단백의 추출과 MIC test

본 시험에 사용된 감자(고구벨리, *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)는 (주) 포테이토 벨리에서 제공되었으며 상대습도 90~95%, 4℃ 조건에서 저온보관되었다.

감자단백(crude potato protein, CPP)의 추출을 위하여 선별된 감자를 세척후 햄머밀로 분쇄작업을 거치고 원심분리하여 전분을 제거하였으며 수용성 단백질이 용해된 상층액을 건조시켜 감자단백을 획득하였다.

감자단백의 MIC(minimum inhibitory concentration) test를 위하여 감자에서 분리된 단백질 분획을 sterile deionized distilled water(SDDW)에 10,000 μ g/ml(10,000ppm) 농도로 만든 후 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다. 배양된 네가지 균주[*E. coli*, *staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *salmonella choleraesuis* (ATCC 13312) 그리고 *salmonella gallinarum* (ATCC 9184)]의 배양액은 MHB를 이용하여 0.5 McFarland standard(1.5×10^8 CFU/ml)와 비교하여 투명도를 맞추었다. 각 세균액을 5×10^5 CFU/ml으로 희석한 후(1:300) 앞서 희석한 단백질 1ml와 희석된 세균 1ml를 각각 멸균된 15ml 유리 tube에 첨가한 후 35 $^{\circ}$ C에서 16~20시간동안 진탕배양하였으며 각 배지(agar)에 균 성장 유무를 확인하여 최소억제농도(MIC)를 결정하였다.

나. 시험설계, 공시동물 및 사양관리

본 시험을 위해 개시체중이 6.42 ± 0.74 kg인 이유자돈(Landrace \times Yorkshire \times Duroc, 23 \pm 3일령) 280두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복, 반복당 14두씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.15% apramycin과 0.10% colistin sulfate), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 감자단백을 0.25, 0.50 및 0.75% 첨가구로 구분하였다. 사양시험은 총 4주간(0~28일) 실시하였고 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1998)에 맞추어 Phase I(0~14일)와 Phase II(14~28일)로 구분하여 배합하였으며(Table 1과 2) 사료와 물은 자유채식시켰다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

자돈의 체중은 Phase I와 Phase II로 나누어 측정하였고 체중 측정시 사료급이통의 잔량을 측정하여 사료섭취량을 기록하였으며 사육일수를 나누어 일당증체량(average daily gain, ADG)과 일당사료섭취량(average daily feed intake, ADFI)을 산출하였다. 사료요구율(feed conversion ratio, FCR)은 일당사료섭취량에서 일당증체량을 나누어 계산하였다.

다. 사료채취 및 화학분석

영양소 소화율을 측정하기 위하여 각 단계별로 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3)을 시험사료에 첨가하여(0.25%) 급여하였으며 시험사료에 대한 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 두었다. 채취한 분 시료는 열풍건조기를 이용하여 65 $^{\circ}$ C에서 72시간 건조시킨 후 1mm 망사

Table 1. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Phase I, d 0 ~ 14)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Crude potato protein, %		
			0.25	0.50	0.75
Ingredients, %					
Corn	33.09	33.58	33.28	33.02	32.73
Whey powder	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Lactose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Soybean meal, 48% CP	13.84	13.76	13.65	13.51	13.38
Soy protein concentrate	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Spray-dried plasma protein	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal	4.25	4.25	4.25	4.25	4.25
Soybean oil	2.20	2.04	2.20	2.35	2.51
Limestone	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Tricalcium phosphate	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
L-Lysine-HCl, 78%	0.16	0.16	0.16	0.16	0.17
DL-Methionine, 100%	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Tryptophan, 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride, 25%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin premix ²	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ³	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin, 10%	0.15	—	—	—	—
Colistin sulfate, 1%	0.10	—	—	—	—
Crude potato protein	—	—	0.25	0.50	0.75
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,400	3,400	3,400	3,400	3,400
CP, %	23.50	23.50	23.50	23.50	23.50
Lys, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Met + Cys, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Ca, %	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65
Av. P, %	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Supplied per kg diet: 9,600 IU vitamin A, 1,800 IU vitamin D₃, 24 mg vitamin E, 1.5 mg vitamin B₁, 12 mg vitamin B₂, 2.4 mg vitamin B₆, 0.045 mg vitamin B₁₂, 1.5 mg vitamin K₃, 24 mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09 mg biotin, 0.39 mg folic acid, 7.2 mg ethoxyquin.

³Supplied per kg diet: 150 mg Fe, 96 mg Cu, 72 mg Zn, 46.5 mg Mn, 0.9 mg I, 0.9 mg Co, 0.3 mg Se.

Table 2. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Phase II, d 14 ~ 28)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Crude potato protein, %		
			0.25	0.50	0.75
Ingredients, %					
Corn	42.00	42.48	42.21	41.92	41.64
Whey powder	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Lactose	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soybean meal, 48% CP	19.08	19.00	18.86	18.73	18.58
Spray-dried plasma protein	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
Soybean oil	1.90	1.75	1.90	2.06	2.22
Limestone	0.88	0.88	0.88	0.89	0.89
Tricalcium phosphate	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
L-Lysine-HCl, 78%	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15
DL-Methionine, 100%	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14
Tryptophan, 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride, 25%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin premix ²	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ³	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin, 10%	0.15	—	—	—	—
Colistin sulfate, 1%	0.10	—	—	—	—
Crude potato protein	—	—	0.25	0.50	0.75
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,350	3,350	3,350	3,350	3,350
CP, %	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
Lys, %	1.43	1.43	1.43	1.43	1.43
Met + Cys, %	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Supplied per kg diet: 9,600 IU vitamin A, 1,800 IU vitamin D₃, 24 mg vitamin E, 1.5 mg vitamin B₁, 12 mg vitamin B₂, 2.4 mg vitamin B₆, 0.045 mg vitamin B₁₂, 1.5 mg vitamin K₃, 24 mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09 mg biotin, 0.39 mg folic acid, 7.2 mg ethoxyquin.

³Supplied per kg diet: 150 mg Fe, 96 mg Cu, 72 mg Zn, 46.5 mg Mn, 0.9 mg I, 0.9 mg Co, 0.3 mg Se.

Wiley mill로 분쇄하여 성분분석에 사용되었다. 외관상 회장아미노산 소화율, 장기무게, 간과 근육의 수분과 조단백질 함량, 장내미생물 그리고 소장의 형태조사를 위하여 실험종료시 반복당 1두씩(총 20두) 전기충격 후 도살하여 분석에 사용되었다. 도체직후 소화관은 분리되어 위, 소장 및 대장의 소화내용물을 포함한 무게와 내용물을 제거한 무게 그리고 간의 무게를 기록하였다. 장기무게는 체중으로 나눈 백분율로 표시하였다.

소장의 십이지장, 공장 그리고 회장을 구분하여 소장 내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)은 1cm크기로 적출되어 식염수로 세척 후 10% 포르말린 용액에 고정시켜 주사현미경으로 관찰할 때까지 상온에서 보관하였다. 회장내용물은 수거되어 즉시 냉동처리 하였으며 냉동시킨 시료는 -80℃의 동결건조기(Samwon Inc., Korea)를 이용하여 동결건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산 함량을 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량의 측정을 위하여 각각 샘플을 취하였으며 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 장내미생물 조사를 위하여 맹장, 결장 및 직장의 내용물은 멸균용기에 채집되어 7℃에서 냉장보관하였다. 분종의 미생물 검사를 위하여 실험개시와 주간단위로(0, 7, 14, 21 및 28일째) 반복당 4두씩(총 80두) 분 샘플을 취하여 분석에 사용하였다.

모든 샘플의 일반성분분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 크롬함량은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다. 사료와 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간동안 105℃에서 6N HCl용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유아미노산은 24시간동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid 용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

소장의 용모 높이(villus height), 용와 깊이(crypt depth) 그리고 용모 넓이(villus width)를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6μm크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모 높이와 용와 깊이의 비율(villus height: crypt depth)은 용모 높이를 용와 깊이로 나누어 산출하였다. 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 산출하였다;

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

혈액성상을 측정하기 위하여 사양시험의 각 단계별 종료시점(14와 28일)에 반복당 2두의 자돈을 선별하였다. 경정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액은 K₂EDTA로 항응고처리된 튜브에 넣어 icebox에 보관한 다음 자동혈액분석기(HemacyteTM, Oxford science, Inc., USA)를 이용하

여 백혈구수(white blood cells, WBC), 호중구(neutrophils, NE), 임파구(lymphocytes, LY), 단핵구(monocytes, MO), 호산구(eosinophils, EO), 호염구(basophils, BA), 적혈구수(red blood cells, RBC), 헤모글로빈(hemoglobin, Hb) 및 헤마토크릿(hematocrit, Hct) 등을 측정하여 분석하였다.

라. 장 및 분증 미생물과 면역반응 조사

장 및 분증의 총세균수(total bacterial counts, TBC)와 대장균수(*E. coli*)를 검사하기 위하여 채취한 샘플 5g을 45ml의 BPBDW (buffer-field's phosphate-buffered dilution water)에 넣어 잘 혼합하고 혼합물 1ml를 취하여 다시 9ml의 BPBDW희석용액으로 10배 희석한 후 BPBDW희석용액으로 10^{-1} 부터 10^{-7} 까지 10진씩 희석하였다. 각 희석용액별로 1ml를 취하여 petri dish에 넣고 56°C의 water bath에 있는 PCA, VRBA 배지를 2회 분주하였다. 분주한 배지를 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 colony를 count하여 세균수를 측정하였다. 포도상구균(*Staphylococcus*)의 검사는 배지 Baird-Parker Agar를 고압멸균 후 56°C 때 Egg-yolk Tellurite Emulsion을 첨가하고 충분히 혼합하여 petri dish에 20ml씩 분주하였으며 균은 후 4°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 총세균수 검사방법중에서 이미 10진씩 희석된 샘플 용액 100 μ l를 Baird-Parker agar에 spreading하여 37°C 인큐베이터에서 24~48시간동안 배양하였다. 배양 후 성장된 colony를 count하여 세균수를 측정하였다.

면역반응조사는 세포매개성면역과 체액성면역으로 구분하여 조사하였으며 세포매개성면역의 경우는 피내지연형과민반응법(cutaneous basophile hypersensitivity)을, 체액성면역에 대해서는 양혈액에 대한 항체반응(antibody response to sheep red blood cells)을 측정하여 조사하였다.

세포매개성면역조사는 실험 종료시 반복당 1두씩(총 20두) 선발하여 다음과 같이 피하(subcutaneous)로 접종하였다. 접종부위는 마지막 젖꼭지에서 5cm뒤와 중간선(median line)에서 5cm왼쪽으로 떨어진 지점에 접종을 하였다. 왼쪽의 접종부위에는 PBS(phosphate buffered saline)만을 0.1ml 접종하여 대조지점으로 삼았고 오른쪽 부위에는 PBS(0.01M, pH 7.4)에 1.5 mg/ml의 PHA-P(phytohaemagglutinin-P)를 첨가하여 0.1ml 접종하였다. 접종 전(0시간), 접종 후 18과 42시간제에 동일한 지점의 피부두께(skin thickness)를 측정하였다. 측정시 전 과정은 동일한 긴장감(tension정도)을 주어 측정하였다. PHA1은 PHA-P/PBS 접종부위의 시간에 따른 종창정도를 나타내고 PHA2는 접종시간별 PHA-P/PBS 접종부위에서 PBS만을 접종한 부위의 두께를 뺀 숫자로 산출하였다.

체액성면역조사를 위하여 실험개시 14일째에 반복당 1두씩(총 20두) 선발하여 마리당 농도가 20%인 S-RBC(sheep red blood cells)를 근육에 접종하였다. 접종 후 7일과 14일 후 즉 실험개시 21일과 28일째에 채혈하여 혈청을 분리한 후 56℃에서 30분간 비동화 처리한 후 마지막 채혈할 때까지 -20℃에 보관하였다. 혈구응집반응은 U-bottom 96 well microplate를 사용하였으며 보관된 혈청을 2진 희석한 후 2% S-RBC용액을 각 well당 50 μ l씩 분주한 후 37℃에서 30분간 반응시켜 혈구응집유무를 관찰하였다. 각 혈청당 최종혈구응집역가는 혈구응집이 일어난 최대 희석배수로 표시하였다(log₂ base).

마. 통계 분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료는 SAS(1988)의 GLM (general linear model) procedure를 이용하여 감자단백의 첨가수준에 대한 Linear와 Quadratic 효과를 분석하였고 PC와 CPP의 두 개 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. MIC 측정

본 시험에 사용된 고구밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) 감자단백의 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 측정결과는 Table 3과 같다. 네 가지 균주(*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinarum*, *E. coli*)에 대한 억제 실험에서 감자단백의 농도가 500ppm일 때 균의 성장을 관찰할 수 없었다. 그래서 감자단백의 첨가수준은 항생제(apramycin)의 MIC수준과 실제 첨가시 사용수준에 근거하여 채택되었다.

Table 3. MIC of crude potato protein (Gogu valley) for 4 types of bacteria

Bacteria. spp.	Concentration of crude potato protein (μ g/ml)					MIC ¹
	600	500	400	300	200	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	500
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	+	+	400
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	-	-	-	+	300
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	400

¹MIC: Minimum Inhibitory Concentration.

나. 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Phase I과 Phase II로 나누어 진행하였으며 사양성적 결과는 Table 4와 같다. Phase I에서 항생제와 감자단백급여구의 일당증체량(ADG)과 일당사료섭취량(ADFI)은 차이가 없었으나 사료요구율(FCR)의 경우 항생제 급여구가 감자단백급여구에 비하여 개선되었다($p<0.05$). 그러나 감자단백급여구와 대조구를 비교하였을 때 ADG, ADFI 그리고 FCR에서는 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). Phase II에서 항생제와 감자단백급여구의 ADG, ADFI 그리고 FCR에서는 차이가 없었으나 감자단백급여수준이 높을수록 ADG가 증가하였다 (Linear, $p<0.05$). 전체기간으로 볼 때, 항생제처리구는 감자단백급여구보다 ADG가 높았으며 감자단백급여구도 대조구에 비하여 일당증체량이 개선되었다(Linear, $p<0.05$).

Table 4. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on growth performance in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
ADG, g	326	276	291	320	322	8.60	NS	NS	NS
ADFI, g	466	415	440	475	472	11.14	NS	NS	NS
FCR	1.43	1.51	1.52	1.49	1.47	0.01	*	NS	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
ADG, g	424	355	358	377	418	10.31	NS	*	NS
ADFI, g	661	573	567	604	648	14.63	NS	NS	NS
FCR	1.56	1.62	1.59	1.60	1.55	0.01	NS	NS	NS
Overall (d 0 ~ 28)									
ADG, g	374	315	324	349	371	7.97	*	*	NS
ADFI, g	561	494	506	540	560	10.63	NS	NS	NS
FCR	1.50	1.57	1.56	1.55	1.51	0.01	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$).

영양소 소화율 시험결과는 Table 5와 같다. 항생제 처리구와 감자단백급여구를 비교할 때 Phase I의 건물 소화율과 Phase II의 건물과 조단백질 소화율은 모두 항생제 처리구가 감자

단백급여구에 비하여 높았으며($p<0.01$); Phase II의 건물 소화율은 감자단백급여수준이 높아짐에 따라 대조구에 비하여 개선되었다($p<0.05$). 그러나 회장의 외관상 아미노산 소화율 (Table 6)에서는 항생제처리와 감자단백급여에 의한 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 5. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on nutrient digestibility (%) in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
DM	83.94	80.83	81.45	80.53	82.97	0.48	**	NS	NS
CP	82.13	78.87	79.27	78.66	81.11	0.58	NS	NS	NS
Ash	49.85	46.25	47.13	46.05	48.18	1.65	NS	NS	NS
Ca	43.13	41.29	42.77	40.83	41.90	0.49	NS	NS	NS
P	41.42	38.72	39.08	37.15	39.34	0.71	NS	NS	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
DM	84.03	80.28	81.20	81.34	82.50	0.36	**	*	NS
CP	82.36	79.13	81.16	78.87	80.78	0.40	**	NS	NS
Ash	49.88	46.42	47.26	46.27	47.89	0.46	*	NS	NS
Ca	44.67	42.37	43.23	42.64	43.76	0.32	NS	NS	NS
P	41.76	39.08	39.93	38.96	40.35	0.40	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

자돈은 이유시 각종 스트레스에 인하여 사료섭취량이 저하되고 성장이 지연된다. 이유자돈에게 항생제를 급여하면 일당증체량이 개선된다고 보고하였고(Kendall 등, 2000; Lewis와 Southern, 2001) 본 시험의 결과에서도 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 일당사료섭취량과 사료요구율 측면에서는 차이가 없었으며 대조구와 비교할 때 감자단백급여수준이 높을수록 일당증체량과 일당사료섭취량이 개선되었다. 락토페린(Lactoferrin)은 한가지 항균펩타이드로서 병원성 미생물에 대하여 저항작용이 있으며(Dial 등, 1998; Pyong 등, 2001) 일당증체량과 사료요구율을 개선하는 효과가 있다(Wang 등, 2006). 그러나 Greiner 등(2004)은 항균펩타이

드의 급여는 생쥐의 증체량, 사료섭취량 및 사료효율에 영향을 미치지 못하였다고 보고하였다. 본 시험 결과로 미루어보아 항균펩타이드가 포함된 감자단백의 급여는 증체량을 개선하는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 사료섭취량 증진효과와 관계가 있는 것으로 판단된다.

Table 6. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on apparent ileal digestibility of amino acids in weanling piglets (d 28)

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Essential amino acids, %									
Arginine	84.79	80.68	80.28	78.58	83.81	1.21	NS	NS	NS
Histidine	80.01	77.06	70.29	75.98	78.90	1.39	NS	NS	NS
Isoleucine	79.40	73.12	75.01	73.89	80.13	1.51	NS	NS	NS
Leucine	78.85	75.85	80.15	76.77	73.76	1.41	NS	NS	NS
Lysine	83.04	82.66	84.26	79.94	78.15	1.04	NS	NS	NS
Phenylalanine	81.13	78.78	83.10	77.84	76.87	1.37	NS	NS	NS
Threonine	78.23	69.90	75.02	76.89	72.23	1.80	NS	NS	NS
Valine	75.39	72.41	79.05	71.94	73.91	1.75	NS	NS	NS
Methionine	79.06	72.87	75.02	77.11	78.02	1.67	NS	NS	NS
Sub-mean	79.99	75.91	78.02	76.55	77.31	0.67	NS	NS	NS
Nonessential amino acids, %									
Alanine	80.85	77.28	78.07	75.45	76.21	1.35	NS	NS	NS
Aspartic acid	83.26	79.51	84.01	81.11	82.53	0.89	NS	NS	NS
Cystine	78.76	74.84	81.21	76.13	77.01	1.36	NS	NS	NS
Glutamic acid	85.36	79.59	80.20	84.06	86.18	1.16	NS	NS	NS
Glycine	73.88	63.65	63.93	66.45	71.87	1.59	NS	NS	NS
Proline	80.76	73.20	75.96	77.09	81.63	1.41	NS	NS	NS
Serine	82.19	77.71	81.01	77.15	80.02	1.04	NS	NS	NS
Tyrosine	77.11	73.97	78.32	74.81	79.08	1.28	NS	NS	NS
Sub-mean	80.27	74.97	77.84	76.53	79.32	0.73	NS	NS	NS
Total	80.13	75.47	77.93	76.54	78.25	0.63	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

다. 장 및 분중 미생물

감자단백급여에 의한 분중 미생물 수치의 변화는 Table 7과 같다. 14일째의 총균수와 *E. coli* 그리고 28일째의 *E. coli*수치는 항생제처리구가 감자단백급여구보다 낮았다($p<0.05$). 또한 감자단백급여구는 대조구에 비하여 14와 28일째의 총균수와 *E. coli* 그리고 14, 21 및 28일째의 *Staphylococcus*의 수치가 유의적으로 적었다($p<0.05$).

Table 7. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in feces of weanling piglets

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
Initial	Total bacteria	8.87	8.91	8.89	8.90	8.88	0.01	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	6.54	6.66	6.57	6.60	6.56	0.03	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	5.09	5.17	4.96	4.95	4.95	0.04	NS	NS	NS
7	Total bacteria	8.67	9.22	9.08	8.91	8.46	0.11	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	6.14	6.64	6.33	6.30	6.08	0.12	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.78	5.23	4.99	4.76	4.46	0.12	NS	NS	NS
14	Total bacteria	8.46	9.49	9.15	8.92	8.23	0.12	*	**	NS
	<i>E. coli</i>	5.77	7.12	6.11	6.18	5.84	0.13	*	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.11	4.92	4.17	4.10	4.08	0.09	NS	**	NS
21	Total bacteria	8.34	9.00	8.68	8.52	8.23	0.11	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.45	6.70	6.08	5.89	5.68	0.17	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.64	4.80	4.00	3.83	3.61	0.15	NS	*	NS
28	Total bacteria	8.07	8.90	8.49	8.44	8.23	0.10	NS	*	NS
	<i>E. coli</i>	5.09	5.65	5.41	5.51	5.27	0.06	*	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.66	4.26	3.65	3.73	3.44	0.10	NS	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

Table 8은 감자단백급여가 자돈의 대장내 미생물(28일)에 대한 영향을 나타냈다. 맹장의 총균수와 *Staphylococcus*의 수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구보다 적었다($p<0.05$). 그

러나 *E. coli*수치는 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 또한, 감자단백급여수준이 높을수록 대조구에 비하여 총균수와 *Staphylococcus*의 수치가 유의적으로 감소되었다($p<0.05$). 직장의 총균수와 결장의 *E. coli*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었지만 감자단백의 급여는 대조구에 비하여 미생물의 성장을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타났다($p<0.05$).

Table 8. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in large intestine of weanling piglets (d 28)

Items	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
	Total bacteria	7.44	8.24	7.90	7.77	7.35	0.10	*	**	NS
Caecum	<i>E. coli</i>	5.30	5.78	5.58	5.47	5.38	0.07	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.37	4.76	4.88	4.68	4.25	0.07	*	*	NS
	Total bacteria	8.07	8.88	8.49	8.44	8.23	0.08	**	*	NS
Colon	<i>E. coli</i>	5.09	5.65	5.41	5.51	5.27	0.08	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.66	4.26	3.65	3.73	3.44	0.11	NS	*	NS
	Total bacteria	8.40	8.78	8.64	8.23	8.14	0.10	NS	*	NS
Rectum	<i>E. coli</i>	5.18	5.78	5.58	5.49	5.34	0.06	**	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.22	4.86	4.23	3.93	4.02	0.12	NS	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

이상의 결과로부터 감자단백급여는 항생제에 비하여 다소 차이를 나타내지만 미생물의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다. 또한 항생제 처리구는 두 가지 항생제를 사 용함으로써 작용이 컸다고 여겨진다.

사료를 통하여 섭취된 에너지의 6%가량은 위와 장내의 미생물발효에 의하여 소실된다 (Doyle, 2001). 이러한 관점에서 장내미생물의 성장을 효과적으로 억제할 수 있다면 에너지의 이용효율을 높여줄 것이다. 본 실험의 결과에서도 항균펩타이드가 포함된 감자단백을 자돈에 급여함으로써 장내미생물 성장을 억제하여 에너지와 영양소 이용효율이 제고되었으며 이에 따른 성장성적 개선효과가 나타난 것으로 판단된다.

라. 면역반응과 혈액성상

감자단백급여와 항생제 처리에 따른 면역반응 조사와 혈중 백혈구, 적혈구계 및 혈소판계 조사의 결과는 Table 9와 10에 나타났다. 세포매개성 측정결과에서 PHA-P를 접종한 부위는 빨갱게 홍반을 형성하였으나 PBS접종부위에는 거의 변화가 없는 것이 관찰되었다. PBS를 접종한 다섯 그룹 중에서 대조군을 제외한 나머지 4개 그룹에서 비교적 비슷한 미세한 종창정도를 나타낸 반면 PHA-P를 접종한 5개 그룹에서 모두 18시간째에 거의 모두 300% 이상의 종창정도를 나타내었다. 결과를 보면 접종 후 18시간째가 가장 높은 수치의 종창을 보이며 42시간째에는 종창정도가 18시간에 측정한 것보다 감소하는 경향이 있었다. 또한 감자단백급여구의 종창정도는 대조구에 비하여 수치상으로 높게 나타났지만 급여수준에 따른 효과는 나타나지 않았다($p>0.05$). 면양혈액(S-RBC)에 대한 항체형성능과 혈액성상 조사에서는 처리구간에 차이가 나타나지 않았다. 항균펩타이드는 면역계에 영향 주지만 (Hunter 등, 2002) 본 실험의 결과와 비교할 때 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 9. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on immunity test in weanling piglets

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
PHA									
PHA1 ⁴ (18 h)	4.55	3.82	4.27	4.17	4.50	0.11	NS	NS	NS
PHA1 (42 h)	0.62	0.60	0.70	0.58	0.67	0.02	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (18 h)	4.45	3.55	4.00	4.04	4.27	0.11	NS	NS	NS
PHA2 (42 h)	0.61	0.46	0.52	0.54	0.52	0.02	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 21	3.00	2.00	3.00	2.25	2.50	0.15	NS	NS	NS
d 28	4.75	3.50	4.25	4.50	4.00	0.17	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (18 h and 42 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right intersection injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (18 h and 42 h) skin thickness of left intersection measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right intersection skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

Table 10. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on hematological status in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
d 14									
White blood cell, k/ μ l	15.26	15.35	15.05	14.41	14.68	0.26	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	7.17	7.38	7.15	7.11	7.06	0.16	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	7.28	7.24	7.11	6.32	6.74	0.22	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	0.56	0.49	0.54	0.70	0.61	0.06	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.21	0.20	0.23	0.25	0.23	0.01	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.003	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	5.90	6.79	5.62	6.66	5.99	0.15	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	12.03	12.48	11.73	12.08	11.50	0.23	NS	NS	NS
Hematocrit, %	37.50	40.60	37.25	40.05	38.20	0.54	NS	NS	NS
d 28									
White blood cell, k/ μ l	19.97	19.73	19.54	19.98	20.01	0.26	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	9.22	9.30	9.15	9.40	9.78	0.20	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	9.08	8.58	8.62	8.94	8.51	0.17	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.16	1.40	1.35	1.13	1.26	0.06	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.46	0.40	0.39	0.47	0.42	0.04	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.06	0.05	0.03	0.05	0.04	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	6.36	5.83	6.06	6.14	6.07	0.13	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.48	11.45	12.07	11.95	12.24	0.17	NS	NS	NS
Hematocrit, %	37.28	35.45	36.70	36.55	36.93	0.65	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

마. 장기무게, 소장 의 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

소화장기인 간장, 위, 소장 그리고 대장의 체중에 대한 백분율 퍼센트로 장기무게를 조사하였는데(Table 11), 각 처리구간에는 차이가 없었다(p>0.05). 비슷한 결과로, 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융모높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융모높이의 비례(VH/CD) 그리고 융모넓이(villus width, VW)를 조사한 결과(Table 12) 처리구간에 변화가 없었다(p>0.05). 또한, 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량을 조사한 결과(Table 13) 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다(p>0.05).

Table 11. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on relative organ weights in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	3.18	2.99	3.50	3.52	3.43	0.13	NS	NS	NS
Stomach, full	2.08	2.23	2.22	2.90	2.62	0.20	NS	NS	NS
Stomach, empty	0.78	0.80	0.79	0.86	0.73	0.03	NS	NS	NS
Small intestine, full	6.35	6.30	7.84	7.98	7.09	0.30	NS	NS	NS
Small intestine, empty	4.40	4.50	4.75	4.61	4.52	0.12	NS	NS	NS
Large intestine, full	4.14	2.95	4.01	3.62	3.40	0.16	NS	NS	NS
Large intestine, empty	2.47	1.77	2.25	1.95	1.76	0.12	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

이유자돈의 장 점막의 건강은 성장과 면역상태에 매우 중요한 작용을 일으킨다(Bosi 등, 2003). 항생제와 항균펩타이드의 한가지인 락토페린(lactoferrin)을 급여하면 용모의 길이가 길어지고 용와의 깊이는 낮아져 성장을 촉진한다(Wang 등, 2006). 그러나 본 시험에서는 차이가 나타나지 않았으며 성장촉진효과는 주요하게 미생물억제능력에 있다고 판단된다.

본 시험에서 사용된 감자단백은 수용성으로서 가능한 작용기전은 저분자 단백질로부터 병원성미생물의 성장을 억제하는 것으로 판단된다(Plate 등, 1993). 또한 감자에서 추출된 수용성 단백질로부터 분리하여 항균효과가 검증된 PT-1 (Potamin-1)과 AFP-J(antifungal protein J)와 같은 항균펩타이드는 사료첨가제로서도 작용이 있는 것으로 사료되며 감자단백의 항생제대체 가능성을 보여주고 있다.

Table 12. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on small intestinal morphology in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Duodenum									
Villus height, μm	1,050	1,070	1,083	1,035	1,042	17.98	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	503	495	517	488	500	5.53	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	2.09	2.16	2.10	2.12	2.08	0.04	NS	NS	NS
Villus width, μm	186	193	201	179	183	3.07	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	788	810	818	795	819	22.69	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	313	345	337	350	331	12.96	NS	NS	NS
VH/CD	2.54	2.42	2.46	2.30	2.49	0.07	NS	NS	NS
Villus width, μm	168	171	174	180	173	2.49	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	570	563	557	588	575	10.40	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	189	215	222	223	213	6.05	NS	NS	NS
VH/CD	3.08	2.62	2.53	2.63	2.78	0.09	NS	NS	NS
Villus width, μm	184	163	168	165	179	3.99	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴Villus height: crypt depth ration.

Table 13. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in weanling piglets

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Liver CP, %	19.33	19.55	20.08	19.45	20.01	0.12	NS	NS	NS
Liver moisture, %	72.04	72.95	71.66	72.61	71.76	0.28	NS	NS	NS
Muscle CP, %	19.43	18.74	18.97	19.28	18.69	0.19	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	70.95	69.56	70.66	69.87	70.01	0.24	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

4. 요약

본 실험의 결과 이유자돈에서 분과 장내 미생물, 영양소 소화율 및 사양성적에 대한 영향은 항생제가 전체 감자단백(고구벨리) 급여구보다 더 컸다. 그러나 높은 수준의 감자단백 급여구는 항생제와 유사한 결과가 나타났으며 대조구와 비교할 때 감자단백급여수준이 높을수록 분과 장내 미생물수치를 감소시켜 영양소 소화율을 개선하였으며 사양성적도 좋아졌다. 이로서 자돈에서 항균펩타이드(Potamin-1)가 함유된 신제품 감자단백의 급여효과는 확인되었으며 본 실험의 항생제 처리구는 두 가지 항생제(Apramycin과 Colistin)를 사용하였고 감자단백급여수준이 높을 때 항생제와 유사한 촉진효과가 나타난 것으로 보아 항균펩타이드가 포함된 기능성 신제품 감자단백의 급여는 사료용 항생제 대체 가능성을 나타내는 것으로 판단되며 적정첨가수준은 0.75%보다 높은 것으로 사료된다.

실험 2. 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

본 실험에서는 실험 1에서 사용된 기능성 신제품 감자인 고구밸리를 이용하여 육계에 급여하였을 때 항생제와 비교하여 항균능력, 성장, 면역 그리고 소화율 등 방면에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

가. 감자단백의 추출과 MIC test

본 시험에서는 실험 1에서 사용된 고구밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) 감자품종의 감자단백을 사용하였으며 감자단백의 추출방법과 특성은 실험1과 동일하다. 감자단백의 MIC는 500ppm으로 판단되었다.

나. 시험설계, 공시동물 및 사양관리

본 시험을 위해 체중이 44.10 ± 3.59 g인 1일령 Ross종 브로일러 600수를 공시하여 5처리 4반복, 반복당 30수씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제와의 비교와 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.05% avilamycin), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 감자단백 0.25, 0.50 및 0.75% 첨가구로 구분하였다. 사양 시험은 총 6주간(0~42일) 실시하였고 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1994)에 맞추어 Starter(0~3주)와 Finisher(3~6주)로 구분하여 배합하였으며(Table 14와 15) 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며 시험기간 동안 사료와 물은 자유채식 시켰다. 사육면적은 2.0x2.0m이고 평사하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

육계의 체중측정은 시험개시, 중간시점(21일째) 및 종료일(42일째)에 측정하여 증체량, 사료섭취량을 기록하였으며 사료요구율은 사료섭취량에서 증체량을 나누어 산출하였다.

Table 14. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Starter, 0 ~ 3 wk)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Crude potato protein, %		
			0.25	0.50	0.75
Ingredients, %					
Corn-grain	55.01	55.12	54.86	54.60	54.36
Soybean meal, 44% CP	28.28	28.26	28.12	28.00	27.85
Corn gluten meal	8.15	8.15	8.15	8.15	8.15
Soybean oil	4.27	4.23	4.37	4.50	4.63
Dicalcium phosphate	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70
Limestone	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40
Choline chloride, 25%	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine, 50%	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
L-Lysine-HCl, 78%	0.14	0.14	0.15	0.15	0.16
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ³	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
Clinacox, 0.2%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Avilamycin, 2%	0.05	—	—	—	—
Crude potato protein	—	—	0.25	0.50	0.75
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP, %	22.01	22.01	22.01	22.01	22.01
Lys, %	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Met + Cys, %	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Av. P, %	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Vitamin premix per kg diet: 9,000 IU vit. A, 30 IU vit. E, 1,800 IU vit. D, 1 mg vit. K₃, 1 mg vit. B₁, 10 mg vit. B₂, 4 mg vit. B₆, 0.02 mg vit. B₁₂, 30 mg niacin, 12 mg pantothenic acid, 0.5 mg folic acid, 0.2 mg biotin.

³Supplied per kg diet: 56 mg Fe, 56 mg Cu, 70 mg Zn, 84 mg Mn, 1.4 mg I, 0.07 mg Co, 0.2 mg Se.

Table 15. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Finisher, 3 ~ 6 wk)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Crude potato protein, %		
			0.25	0.50	0.75
Ingredients, %					
Corn-grain	63.10	63.23	62.98	62.69	62.47
Soybean meal, 44% CP	21.84	21.80	21.67	21.55	21.40
Corn gluten meal	8.40	8.40	8.40	8.40	8.40
Soybean oil	2.84	2.80	2.93	3.08	3.20
Dicalcium phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Limestone	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
Choline chloride, 25%	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine, 50%	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L-Lysine-HCl, 78%	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ³	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
Maduramycin, 0.5%	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Avilamycin, 2%	0.05	—	—	—	—
Crude potato protein	—	—	0.25	0.50	0.75
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP, %	20.01	20.01	20.01	20.01	20.01
Lys, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Met + Cys, %	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Vitamin premix per kg diet: 9,000 IU vit. A, 30 IU vit. E, 1,800 IU vit. D, 1 mg vit. K₃, 1 mg vit. B₁, 10 mg vit. B₂, 4 mg vit. B₆, 0.02 mg vit. B₁₂, 30 mg niacin, 12 mg pantothenic acid, 0.5 mg folic acid, 0.2 mg biotin.

³Supplied per kg diet: 56 mg Fe, 56 mg Cu, 70 mg Zn, 84 mg Mn, 1.4 mg I, 0.07 mg Co, 0.2 mg Se.

다. 시료채취 및 화학분석

영양소 소화율을 측정하기 위하여 각 단계별로 반복당 2수씩 선별하여 소화율측정 케이지에 수용하고 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 시험사료에 대한 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 실시하였다. 채취한 분 시료는 열풍 건조기를 이용하여 65°C 에서 72시간 건조시킨 후 1mm 망사 Wiley mill로 분쇄하여 성분분석에 사용되었다.

외관상 회장아미노산 소화율, 장기무게, 간과 근육의 수분과 조단백질 함량, 장내미생물 그리고 소장내의 형태조사를 위하여 실험종료시 반복당 2수씩(총 40수씩) 전기충격후 도살하여 분석에 사용되었다. 도체직후 소화관은 분리되어 전위, 위, 소장 및 대장 각 부분의 소화내용물을 포함한 무게와 내용물을 제거한 무게 그리고 간의 무게를 기록하였다. 소장의 십이지장, 공장 그리고 회장을 구분하여 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)은 1cm크기로 적출되어 식염수로 세척 후 10% 포르말린 용액에 고정시켜 주사현미경으로 관찰할 때까지 상온에서 보관하였다. 회장내용물은 수거되어 즉시 냉동처리 하였으며 냉동시킨 시료는 -80°C 의 동결건조기(Samwon Inc., Korea)를 이용하여 동결건조 하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산 함량을 분석하기 전까지 냉장보관 하였다. 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량의 측정을 위하여 각각 샘플을 취하였으며 분석하기 전까지 냉장보관 하였다. 장내미생물 조사를 위하여 맹장과 총배설강의 내용물은 멸균용기에 채집되어 7°C 에서 냉장보관 하였다. 분중의 미생물 검사를 위하여 실험개시와 주간단위로(0, 14, 28 및 42일째) 반복당 4수씩(총 80수) 분 샘플을 채집하여 분석에 사용하였다.

모든 샘플의 일반성분분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 크롬함량은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다. 사료와 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간동안 105°C 에서 6N HCl용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유아미노산은 24시간동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid 용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

소장의 용모 높이(villus height), 용와 깊이(crypt depth) 그리고 용모 넓이(villus width)를 측정하기 위하여 10% 포르말린 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 $6\mu\text{m}$ 크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모 높이와 용와 깊이의 비율(VH/CD)은 용모 높이를 용와 깊이로 나누어 산출하였다.

혈액성상을 측정하기 위하여 사양시험의 각 단계별 종료시점(21과 42일)에 반복당 두 마리의 육계를 선별하였다. 익정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액은 K₂EDTA로 항응고처리된 튜브에 넣어 icebox에 보관한 다음 실험 1과 같은 방법으로 분석하였다.

라. 장 및 분중 미생물과 면역반응 조사

장 및 분중의 총세균수(total bacterial counts, TBC)와 대장균수(*E. coli*)를 검사하기 위하여 채취한 샘플 5g을 45ml의 BPBDW (buffer-field's phosphate-buffered dilution water)에 넣어 잘 혼합하고 혼합물 1ml를 취하여 다시 9ml의 BPBDW희석용액으로 10배 희석한 후 BPBDW희석용액으로 10⁻¹부터 10⁻⁷까지 10진씩 희석하였다. 각 희석용액별로 1ml를 취하여 petri dish에 넣고 56°C의 water bath에 있는 PCA, VRBA 배지를 2회 분주하였다. 분주한 배지를 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 colony를 count하여 세균수를 측정하였다. 포도상구균(*Staphylococcus*)의 검사는 배지 Baird-Parker Agar를 고압멸균 후 56°C때 Egg-yolk Tellurite Emulsion을 첨가하고 충분히 혼합하여 petri dish에 20ml씩 분주하였으며 균은 후 4°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 총세균수 검사방법중에서 이미 10진씩 희석된 샘플 용액 100 μ l를 Baird-Parker agar에 spreading하여 37°C 인큐베이터에서 24~48시간동안 배양하였다. 배양 후 성장된 colony를 count하여 세균수를 측정하였다.

면역반응조사는 세포매개성면역과 체액성면역으로 구분하여 조사하였으며 세포매개성면역의 경우는 피내지연형과민반응법(cutaneous basophile hypersensitivity)을, 체액성면역에 대해서는 양혈액에 대한 항체반응(antibody response to sheep red blood cells)을 측정하여 조사하였다.

세포매개성면역조사는 실험 5주째에 반복당 네 마리씩(총 80수) 선발하여 닭의 양쪽 지간 두께(3번째와 4번째 사이의 지간)를 측정하였다. 양쪽의 지간두께의 측정이 끝나면 바로 왼쪽의 지간에는 멸균된 PBS(phosphate buffered saline)만을 0.1ml 피내(intradermal)로 접종을 하였다(대조). 오른쪽 지간에는 멸균 PBS에 100 μ g/0.1ml로 희석된 PHA-P(phytohaemagglutinin-P)를 0.1ml씩 피내로 접종하였다(측정). 접종 전(0시간), 접종 후 12와 24시간째에 동일한 지점의 지간두께를 측정하였다. 측정시 전 과정은 동일한 긴장감(tension정도)을 주어 측정하였다. PHA1은 PHA-P/PBS 접종부위의 시간에 따른 종창정도를 나타내고 PHA2는 접종시간별 PHA-P/PBS 접종부위에서 PBS만을 접종한 부위의 두께를 뺀 숫자로 산출하였다.

체액성면역조사를 위하여 실험개시 3주째에 반복당 1수씩(총 20수) 선발하여 마리당 농도가 20%인 S-RBC(sheep red blood cells) 2.5ml를 근육에 접종하였다. 접종 후 7일과 14일

후 채혈하여 혈청을 분리한 후 56°C에서 30분간 비동화 처리한 후 마지막 채혈할 때까지 -20°C에 보관하였다. 혈구응집반응은 U-bottom 96 well microplate를 사용하였으며 보관된 혈청을 2진 희석한 후 2% S-RBC용액을 각 well당 50 μ l씩 분주한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 혈구응집유무를 관찰하였다. 각 혈청당 최종혈구응집역가는 혈구응집이 일어난 최대 희석배수로 표시하였다(log₂ base).

마. 통계적 분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료는 SAS(1988)의 GLM (general linear model) procedure를 이용하여 감자단백의 첨가수준에 대한 Linear와 Quadratic 효과를 분석하였고 PC와 CPP의 두 개 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Starter와 Finisher로 나누어 진행되었으며 사양성적 결과는 Table 16과 같다.

Table 16. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on growth performance in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
Weight gain, g	719	652	646	703	708	9.11	NS	*	NS
Feed intake, g	1,116	1,054	1,035	1,119	1,109	12.22	NS	*	NS
FCR	1.55	1.62	1.60	1.59	1.57	0.01	*	**	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	1,481	1,401	1,416	1,403	1,479	14.41	*	NS	NS
Feed intake, g	2,847	2,821	2,816	2,773	2,880	30.90	NS	NS	NS
FCR	1.92	2.01	1.99	1.98	1.95	0.02	NS	NS	NS
Overall (0 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	2,199	2,053	2,062	2,106	2,186	18.98	**	*	NS
Feed intake, g	3,962	3,875	3,851	3,893	3,989	30.82	NS	NS	NS
FCR	1.80	1.89	1.87	1.85	1.82	0.01	*	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

Starter 기간에는 항생제와 감자단백급여구의 증체량(weight gain)과 사료섭취량(feed intake)에서는 차이가 없었으나 사료요구율(FCR)의 경우 항생제 급여구가 감자단백급여구에 비하여 개선되었다($p<0.05$). 또한 감자단백급여구는 대조구에 비하여 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 개선하는 효과가 나타났다($p<0.05$, $p<0.01$). Finisher 기간에 항생제의 급여는 감자단백급여구에 비하여 증체량이 개선되었으나($p>0.05$) 감자단백급여구와 대조구를 비교하였을 때 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율에서는 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 전체기간으로 볼 때 항생제처리구는 감자단백급여구보다 증체량과 사료요구율이 개선되었으며 감자단백의 급여는 대조구보다 증체량이 개선되었다($p<0.05$).

영양소 소화율 시험결과는 Table 17과 같다. 항생제 처리구와 감자단백급여구를 비교할 때 Starter와 Finisher 기간의 건물과 조단백질 소화율은 모두 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 높았으며($p<0.05$); Starter 기간의 건물과 조단백질 소화율 그리고 Finisher 기간의 조단백질 소화율은 감자단백급여구가 대조구에 비하여 개선되었다($p<0.05$).

Table 17. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on digestibility in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. NC vs. CPP		
							CPP	L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
DM	78.93	75.09	76.59	77.06	78.04	0.39	*	*	NS
CP	66.50	62.22	63.26	64.46	65.18	0.46	*	*	NS
Ash	43.40	40.64	42.23	42.64	42.70	0.58	NS	NS	NS
Ca	41.34	37.80	37.15	38.28	39.06	0.68	NS	NS	NS
P	41.25	39.98	39.60	38.31	40.64	0.41	NS	NS	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
DM	77.73	75.44	76.28	76.60	77.01	0.30	*	NS	NS
CP	65.64	62.04	63.06	62.80	64.77	0.44	*	*	NS
Ash	43.96	40.41	41.83	42.16	40.05	0.58	NS	NS	NS
Ca	39.53	38.38	35.59	37.91	39.46	0.53	NS	NS	NS
P	41.57	39.30	37.76	38.88	39.26	0.65	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$).

회장아미노산소화율에서(Table 18) Arginine, Alanine, Aspartic acid, Cystine 및 Glutamic acid의 소화율은 항생제 처리구가 감자단백급여구보다 높았으며 감자단백급여구는 대조구보다 Cystine의 소화율이 높게 나타났다(p<0.05).

Table 18. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on apparent ileal digestibility of amino acids in broilers (d 42)

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Arginine	75.62	71.81	71.43	71.56	71.16	0.70	*	NS	NS
Histidine	68.12	63.74	65.79	64.17	65.04	0.93	NS	NS	NS
Isoleucine	64.69	59.28	59.71	59.83	58.84	0.92	NS	NS	NS
Leucine	76.50	73.96	72.66	76.89	76.71	0.66	NS	NS	NS
Lysine	65.79	63.68	65.56	65.86	65.65	0.48	NS	NS	NS
Phenylalanine	67.59	68.50	68.52	70.16	68.82	0.55	NS	NS	NS
Threonine	45.65	47.07	48.31	49.20	49.75	0.73	NS	NS	NS
Valine	59.98	59.35	59.04	58.39	59.65	0.43	NS	NS	NS
Methionine	79.35	76.78	77.83	78.70	79.09	0.87	NS	NS	NS
Alanine	71.23	69.67	68.33	69.50	69.21	0.40	*	NS	NS
Aspartic acid	57.15	54.68	54.99	54.10	55.78	0.37	*	NS	NS
Cystine	49.65	44.05	42.46	47.25	48.45	0.88	*	*	NS
Glutamic acid	76.64	74.26	74.01	74.29	74.73	0.27	**	NS	NS
Glycine	46.01	44.94	47.26	45.12	43.15	0.63	NS	NS	NS
Serine	61.28	59.24	60.60	61.55	59.10	0.68	NS	NS	NS
Total	64.35	62.07	62.43	63.10	63.01	0.39	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

나. 장 및 분중 미생물

감자단백급여에 의한 분중 미생물 수치의 변화는 Table 19와 같다. 14일째의 *E. coli*수치, 28일째의 총균수(total bacteria)와 *Staphylococcus*수치 그리고 42일째의 총균수, *E. coli* 및 *Staphylococcus*수치는 항생제처리구가 감자단백급여구보다 뚜렷이 적었다($p<0.01$). 또한 감자단백급여수준이 높아질수록 대조구에 비하여 14일째의 *E. coli*수치 그리고 28과 42일째의 *Staphylococcus*의 수치가 유의적으로 적었다($p<0.01$).

Table 19. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in feces of broilers

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
Initial	Total bacteria	7.78	7.88	7.86	7.84	7.80	0.02	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.23	5.28	5.26	5.21	5.24	0.01	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.53	4.52	4.54	4.56	4.55	0.01	NS	NS	NS
14	Total bacteria	7.85	7.99	7.93	7.94	7.88	0.02	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	4.96	5.29	5.23	5.06	5.13	0.03	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.21	4.27	4.16	4.24	4.19	0.03	NS	NS	NS
28	Total bacteria	8.00	8.26	8.22	8.17	8.18	0.03	**	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.11	5.27	5.17	5.08	5.15	0.02	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.08	4.42	4.37	4.31	4.27	0.03	**	**	NS
42	Total bacteria	7.79	8.33	8.30	8.32	8.19	0.05	**	NS	NS
	<i>E. coli</i>	4.88	5.20	5.29	5.23	5.16	0.04	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.89	4.28	4.34	4.20	4.06	0.04	**	**	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), ** ($p<0.01$).

Table 20에서는 감자단백의 급여가 육계의 대장내 미생물(42일)에 미치는 영향을 나타냈다. 맹장과 총배설장의 총균수, *E. coli* 및 *staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 적게 나타났다($p<0.05$). 그러나 감자단백의 급여수준에 따른 대장내 미생물 억제효과도 유의적으로 나타났다($p<0.05$).

Table 20. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in large intestine of broilers (d 42)

Variable	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	NC vs. Q
								CPP	L	Q
Total bacteria		7.88	8.20	8.19	8.11	7.96	0.04	*	*	NS
Caecum <i>E. coli</i>		4.95	5.38	5.34	5.41	5.17	0.05	**	*	NS
<i>Staphylococcus</i>		3.98	4.52	4.47	4.36	4.33	0.05	**	*	NS
Total bacteria		7.86	8.40	8.36	8.30	8.18	0.05	**	**	NS
Cloaca <i>E. coli</i>		4.93	5.25	5.27	5.24	5.18	0.04	**	NS	NS
<i>Staphylococcus</i>		3.90	4.30	4.40	4.17	4.09	0.05	*	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

다. 면역반응과 혈액성상

육계에서 실시한 지연형 과민반응 결과와 면양혈액에 대한 항체형성능의 결과는 Table 21과 같다. PHA2 12시간째의 결과는 항생제가 유의적으로 높게 나타나(p<0.05) 세포매개성 면역력이 상승된 결과를 나타냈으며 25일령의 항체가에서 감자단백의 급여수준이 높아질수록 역가가 높게 나타나는 것으로(p<0.05) 보아 감자단백의 급여가 체액성면역을 조절하는 것으로 나타났다. 그러나 혈중 백혈구, 적혈구계 및 혈소판계의 조사에서는 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다(p>0.05).

라. 장기무게, 소장의 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

소화장기인 간장, 전위, 위, 소장 및 대장의 체중에 대한 백분율 퍼센트로 장기무게를 조사하였는데(Table 23), 각 처리구간에는 차이가 없었다(p>0.05). 또한, 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량을 조사한 결과(Table 24) 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다(p>0.05). 비슷한 결과로, 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(VH/CD) 그리고 융모넓이(villus width, VW)를 조사한 결과(Table 25) 처리구간에 변화는 나타나지 않았다(p>0.05).

Table 21. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on immunity test in broilers

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
PHA									
PHA1 ⁴ (12 h)	0.37	0.35	0.30	0.31	0.27	0.03	NS	NS	NS
PHA1 (24 h)	0.18	0.16	0.13	0.19	0.15	0.02	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (12 h)	0.54	0.42	0.21	0.24	0.27	0.04	**	NS	NS
PHA2 (24 h)	0.42	0.32	0.14	0.17	0.24	0.04	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 25	5.50	4.25	4.75	5.00	5.25	0.15	NS	*	NS
d 29	6.25	5.50	5.75	6.00	6.75	0.23	NS	NS	NS
d 35	8.25	7.75	7.50	6.75	7.00	0.34	NS	NS	NS
d 39	9.00	8.25	8.50	8.75	8.25	0.17	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (12 h and 24 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right toe web injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (12 h and 24 h) skin thickness of left toe web measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right toe skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

Table 22. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on hematological status in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
d 21									
White blood cell, k/ μ l	16.65	16.55	16.85	16.40	16.57	0.14	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	4.87	4.73	4.82	4.88	4.89	0.05	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	9.67	9.57	9.80	9.33	9.42	0.11	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.34	1.41	1.43	1.36	1.38	0.04	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.54	0.61	0.56	0.57	0.60	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.25	0.22	0.23	0.27	0.26	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	2.65	2.76	2.60	2.67	2.64	0.03	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	10.36	10.38	10.40	10.66	10.53	0.07	NS	NS	NS
Hematocrit, %	31.00	30.36	30.20	31.38	30.90	0.25	NS	NS	NS
d 42									
White blood cell, k/ μ l	17.97	17.73	17.96	17.59	17.74	0.14	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	5.76	5.61	5.62	5.65	5.74	0.04	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	10.67	10.57	10.80	10.33	10.42	0.11	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.16	1.11	1.14	1.20	1.12	0.04	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.34	0.41	0.36	0.37	0.40	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.04	0.03	0.04	0.05	0.06	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	2.91	2.71	2.81	2.77	2.85	0.03	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.53	10.80	11.05	11.10	11.21	0.12	NS	NS	NS
Hematocrit, %	32.98	31.60	31.58	32.48	32.45	0.33	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 23. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on relative organ weights in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	3.29	3.25	3.42	3.31	3.27	0.08	NS	NS	NS
Proventriculus, full	0.45	0.47	0.44	0.48	0.50	0.01	NS	NS	NS
Proventriculus, empty	0.44	0.40	0.39	0.42	0.41	0.01	NS	NS	NS
Gizzard, full	2.97	2.78	2.70	2.98	2.77	0.06	NS	NS	NS
Gizzard, empty	1.87	1.84	1.80	1.77	1.82	0.04	NS	NS	NS
Small intestine, full	3.74	4.14	3.87	3.95	3.49	0.14	NS	NS	NS
Small intestine, empty	2.62	2.50	2.66	2.35	2.58	0.05	NS	NS	NS
Large intestine, full	1.17	1.02	1.15	1.07	1.05	0.06	NS	NS	NS
Large intestine, empty	0.56	0.58	0.51	0.54	0.53	0.01	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 24. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Liver CP, %	18.53	18.50	17.73	18.05	18.92	0.26	NS	NS	NS
Liver moisture, %	64.09	64.22	63.79	64.55	63.89	0.23	NS	NS	NS
Muscle CP, %	20.29	20.09	19.77	20.02	19.87	0.24	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	75.97	76.14	76.57	75.65	75.84	0.18	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 25. Effect of crude potato protein (Gogu valley) on small intestinal morphology in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Duodenum									
Villus height, μm	2,413	2,380	2,248	2,423	2,314	55.74	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	591	589	572	616	626	16.08	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	4.11	4.08	3.94	3.95	3.74	0.11	NS	NS	NS
Villus width, μm	270	256	275	263	260	3.95	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	1,793	1,744	1,755	1,761	1,778	8.76	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	328	315	310	313	324	5.34	NS	NS	NS
VH/CD	5.49	5.56	5.71	5.66	5.51	0.08	NS	NS	NS
Villus width, μm	193	178	192	176	195	4.16	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	793	811	782	807	819	9.82	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	183	180	184	182	191	3.21	NS	NS	NS
VH/CD	4.34	4.51	4.25	4.47	4.28	0.05	NS	NS	NS
Villus width, μm	143	142	141	146	145	1.25	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

⁴Villus height: crypt depth ration.

4. 요약

실험 1의 결과와 비교할 때 육계에서도 감자단백의 첨가에 의한 성장촉진효과가 뚜렷이 나타난 것으로 판단된다. 비록 항생제의 효과에는 미치지 못하였지만 감자단백급여수준이 높아질수록 미생물에 대한 억제 능력이 향상되었고 이로 인한 영양소 이용효율이 향상될 수 있었으며 또한 성장능력을 개선하는 효과가 나타난 것으로 사료된다. 또한 면역반응조사에서도 감자단백의 급여는 육계의 체액성면역력을 개선하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 항균펩타이드가 함유된 감자단백(고구벨리)의 급여는 미생물성장을 억제하고 면역능력을 개선하며 성장촉진효과가 있어 항생제대체 가능성이 있는 것으로 판단된다.

실험 3. 자돈 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

본 실험에서 사용한 기능성 감자인 골든밸리는 국내에서 개발된 신품종으로써 표피는 노란색이고 비타민 C와 단백질 함량이 높으며 항균펩타이드인 Potide-G를 함유하여 높은 항균활성을 나타냈다(Kim 등, 2006). 본 실험에서는 골든밸리에서 추출된 감자단백(펩타이드)과 항생제와의 비교를 통하여 자돈에 대한 항균효과와 성장, 면역 그리고 소화율 등 방면에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

본 시험에 사용된 감자(골든밸리, *Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley)는 (주)포테이토밸리에서 제공되었으며 상대습도 90~95%, 4°C 조건에서 저온보관되었다.

감자단백(crude potato protein, CPP)의 추출을 위하여 선별된 감자를 세척후 햄머밀로 분쇄작업을 거치고 원심분리하여 전분을 제거하였으며 수용성 단백질이 용해된 상층액을 건조시켜 감자단백을 획득하였다.

감자단백의 MIC(minimum inhibitory concentration) test를 위하여 감자에서 분리된 단백질분획을 sterile deionized distilled water(SDDW)에 10,000 μ g/ml(10,000ppm) 농도로 만든 후 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다. 배양된 네가지 균주[*E. coli*, *staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *salmonella choleraesuis* (ATCC 13312) 그리고 *salmonella gallinarum* (ATCC 9184)]의 배양액은 MHB를 이용하여 0.5 McFarland standard(1.5×10^8 CFU/ml)와 비교하여 투명도를 맞추었다. 각 세균액을 5×10^5 CFU/ml으로 희석한 후(1:300) 앞서 희석한 단백질 1ml와 희석된 세균 1ml를 각각 멸균된 15ml 유리 tube에 첨가한 후 35°C에서 16~20시간동안 진탕배양하였으며 각 배지(agar)에 균 성장 유무를 확인하여 최소억제농도(MIC)를 결정하였다.

나. 시험설계, 공시동물 및 사양관리

본 시험을 위해 개시체중이 7.16 ± 0.88 kg인 이유자돈(Landrace \times Yorkshire \times Duroc, 23 \pm 3일령)

280두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복, 반복당 14두씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.15% apramycin과 0.10% colistin sulfate), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 감자단백을 0.25, 0.50 및 0.75% 첨가구로 구분하였다. 사양시험은 총 4주간(0~28일) 실시하였고 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1998)에 맞추어 Phase I(0~14일)와 Phase II(14~28일)로 구분하여 배합하였으며 사료배합비는 실험 1과 동일하였다.

기타 조사항목의 재료 및 방법은 실험 1과 동일하다.

3. 결과 및 고찰

가. MIC 측정

본 시험에 사용된 골든밸리 감자단백의 최소성장억제농도(MIC)의 측정결과는 Table 26과 같다. 네 가지 균주(*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinarum*, *E. coli*)에 대한 실험에서 감자단백의 MIC는 1,250ppm으로 판단되었다. 본 시험에서 감자단백의 사료내 첨가수준은 고구밸리와 비교를 위하여 같은 수준으로 설정하였다.

Table 26. MIC of crude potato protein (Golden valley) for 4 types of bacteria

Bacteria. spp.	Concentration of crude potato protein ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)					MIC ¹
	1,500	1,250	1,000	500	250	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	1,250
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	+	+	1,000
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	-	-	+	+	1,000
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	1,000

¹MIC: Minimum Inhibitory Concentration.

나. 사양성적과 영양소 소화율

사양성적 결과는 Table 27과 같다. Phase I와 Phase II에서 항생제 처리구와 감자단백급여구의 일당증체량(ADG), 일당사료섭취량(ADFI) 그리고 사료요구율(FCR)은 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 감자단백과 대조구를 비교하였을 때에도 급여수준에 따른 성장촉진효과가 나타나지 않았지만($p>0.05$) FCR에서는 개선경향을 나타냈다($p=0.055$). 전체기간으로 보았을 때 항생제 처리구는 감자단백급여구에 비하여 ADG와 FCR이 개선되었고 감자단백급여 수

준이 높을수록 FCR이 개선되었다($p < 0.05$).

Table 27. Effect of crude potato protein (Golden valley) on growth performance in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
ADG, g	267	257	251	260	265	3.53	NS	NS	NS
ADFI, g	378	384	368	383	380	3.90	NS	NS	NS
FCR	1.42	1.50	1.47	1.48	1.44	0.01	NS	NS	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
ADG, g	479	459	454	468	473	4.38	NS	NS	NS
ADFI, g	727	734	717	732	723	5.09	NS	NS	NS
FCR	1.52	1.60	1.58	1.56	1.53	0.01	NS	0.055	NS
Overall (d 0 ~ 28)									
ADG, g	373	358	353	364	369	2.04	*	NS	NS
ADFI, g	556	560	541	552	558	3.14	NS	NS	NS
FCR	1.49	1.57	1.54	1.52	1.51	0.01	*	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$).

영양소 소화율시험 결과는 Table 28과 같다. Phase I에서 건물의 소화율은 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 높았고($p < 0.05$) 감자단백급여구와 대조구의 비교에서는 개선효과가 나타나지 않았다. Phase II에서는 항생제 처리구의 건물과 조단백질 소화율이 감자단백급여구보다 높았고 감자단백급여 수준이 증가할수록 건물 소화율이 개선되었다($p < 0.05$). 항생제와 감자단백급여에 의한 회장 외관상 아미노산 소화율에서는(Table 29) 처리구간에 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 28. Effect of crude potato protein (Golden valley) on digestibility in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
DM	82.23	79.58	80.55	81.33	79.99	0.32	*	NS	NS
CP	80.02	77.81	78.26	79.09	78.68	0.28	NS	NS	NS
Ash	48.02	48.53	47.98	47.55	46.99	0.22	NS	NS	NS
Ca	42.28	41.39	40.18	40.99	42.05	0.28	NS	NS	NS
P	39.50	37.88	38.96	37.55	39.21	0.22	NS	NS	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
DM	83.39	80.22	80.09	81.36	82.44	0.42	*	*	NS
CP	81.88	77.79	78.25	78.03	80.21	0.48	*	NS	NS
Ash	48.58	47.96	48.07	47.66	47.85	0.18	NS	NS	NS
Ca	43.03	41.78	41.29	42.11	42.93	0.23	NS	NS	NS
P	40.15	39.32	37.99	38.48	39.61	0.30	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05).

항생제의 성장촉진효과는 이미 많이 보고되어 있으며(Kendall 등, 2000; Lewis와 Southern, 2001) 실험 1의 고구밸리 감자단백의 급여는 대조구에 비하여 사료요구율 개선효과를 나타냈다. 본 실험의 결과에서도 골든밸리 감자단백의 급여는 Phase II의 건물 소화율을 개선하였다. 또한, 감자단백의 급여는 성장률 개선효과가 있다고 보고된 바가 있다(Smits 등, 1991).

Table 29. Effect of crude potato protein (Golden valley) on apparent ileal digestibility of amino acids in weanling piglets (d 28)

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	CPP vs. Q
Essential amino acids, %									
Arginine	82.79	78.43	78.78	77.83	80.56	1.21	NS	NS	NS
Histidine	78.76	75.81	72.79	76.48	77.65	1.21	NS	NS	NS
Isoleucine	78.90	73.87	74.51	75.89	76.63	1.36	NS	NS	NS
Leucine	76.35	74.60	76.90	73.52	75.01	1.19	NS	NS	NS
Lysine	81.54	79.79	78.51	78.69	79.40	0.75	NS	NS	NS
Phenylalanine	79.63	76.53	77.60	75.59	76.23	1.02	NS	NS	NS
Threonine	75.52	72.48	71.80	70.53	72.04	1.49	NS	NS	NS
Valine	73.28	71.02	71.54	70.75	70.69	0.91	NS	NS	NS
Methionine	77.02	75.91	75.25	76.62	76.94	1.29	NS	NS	NS
Sub-mean	78.20	75.38	75.30	75.10	76.13	0.55	NS	NS	NS
Nonessential amino acids, %									
Alanine	78.30	76.63	77.29	78.27	77.84	1.20	NS	NS	NS
Aspartic acid	78.43	77.46	79.70	78.73	79.19	0.77	NS	NS	NS
Cystine	78.04	76.52	78.53	77.96	75.82	1.21	NS	NS	NS
Glutamic acid	83.53	82.12	83.43	81.66	82.54	0.91	NS	NS	NS
Glycine	75.04	76.56	76.03	77.23	75.35	1.57	NS	NS	NS
Proline	75.24	73.85	72.59	72.45	72.83	0.96	NS	NS	NS
Serine	79.90	79.40	80.62	81.15	80.66	0.96	NS	NS	NS
Tyrosine	77.08	78.03	78.89	77.18	79.68	1.17	NS	NS	NS
Sub-mean	78.19	77.57	78.38	78.08	77.99	0.46	NS	NS	NS
Total	78.20	76.41	76.75	76.50	77.00	0.41	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

다. 장 및 분변 미생물

Table 30에서는 주간단위로 채집한 분변의 미생물 수치를 나타냈다. 총균수(14, 21 및 28일), *E. coli*(21과 28일) 그리고 *Staphylococcus*(14, 21 및 28일)수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 적었다($p<0.05$). 또한, 21일째의 총균수와 *Staphylococcus*수치 그리고 28일째의 총균수, *E. coli* 및 *Staphylococcus*수치는 감자단백급여 수준이 높을수록 대조구에 비하여 감소되었다($p<0.05$).

Table 30. Effect of crude potato protein (Golden valley) on bacterial populations in feces of weanling piglets

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	Q
Initial	Total bacteria	8.85	8.88	8.86	8.87	8.89	0.01	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	6.51	6.52	6.48	6.49	6.50	0.01	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.99	4.98	4.95	4.97	4.96	0.01	NS	NS	NS
7	Total bacteria	8.73	8.87	8.86	8.78	8.80	0.03	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	6.38	6.56	6.53	6.40	6.50	0.05	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	5.02	5.22	5.14	5.18	5.11	0.05	NS	NS	NS
14	Total bacteria	8.65	8.94	8.88	8.76	8.83	0.05	*	NS	NS
	<i>E. coli</i>	6.19	6.37	6.32	6.26	6.33	0.06	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.78	5.03	4.93	4.98	4.89	0.04	*	NS	NS
21	Total bacteria	8.27	8.69	8.60	8.51	8.46	0.05	*	*	NS
	<i>E. coli</i>	6.21	6.42	6.40	6.37	6.29	0.04	*	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.52	4.88	4.78	4.66	4.60	0.04	*	*	NS
28	Total bacteria	8.17	8.82	8.71	8.56	8.47	0.07	*	*	NS
	<i>E. coli</i>	6.06	6.54	6.47	6.36	6.22	0.06	*	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.43	4.79	4.67	4.66	4.56	0.04	*	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$).

대장의 각 부분 내용물의 미생물 수치를 측정된 결과는 Table 31과 같다. 맹장의 총균수와 *Staphylococcus*수치, 직장의 총균수 및 결장의 *E. coli*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구보다 낮았고; 맹장에서 감자단백급여구는 대조구에 비하여 결장 및 직장의 총균수와 *Staphylococcus*수치 그리고 결장의 *E. coli*수치가 감자단백급여수준이 높아짐에 따라 감소되었다($p<0.05$).

Table 31. Effect of crude potato protein (Golden valley) on bacterial populations in large intestine of weanling piglets (d 28)

Items	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
	Total bacteria	7.72	8.34	7.87	8.04	7.62	0.09	NS	*	NS
Caecum	<i>E. coli</i>	6.23	7.12	6.77	6.57	6.32	0.10	*	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.14	4.55	4.52	4.21	4.03	0.07	NS	*	NS
	Total bacteria	7.97	8.35	8.18	8.15	7.99	0.05	NS	NS	NS
Colon	<i>E. coli</i>	5.90	6.57	6.35	6.19	5.92	0.06	*	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.39	4.63	4.44	4.42	4.38	0.05	NS	NS	NS
	Total bacteria	8.05	8.51	8.26	8.28	8.09	0.05	*	*	NS
Rectum	<i>E. coli</i>	6.06	6.79	6.31	6.42	6.16	0.08	NS	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.65	5.15	4.63	4.67	4.59	0.07	NS	*	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$).

이러한 결과는 많이 알려진 항균펩타이드의 항균효과(Wang 등, 2006)에 기인한 것으로 판단되며 미생물 발효에 의한 에너지 손실을 줄인 것으로 사료된다(Doyle, 2001).

라. 면역반응과 혈액성상

항생제 처리와 감자단백의 급여가 자돈의 면역반응과 혈액성상에 미치는 영향은 Table 32와 33과 같다. 세포매개성면역반응과 체액성면역반응 시험에서 각 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 또한 혈액성상조사에서도 항생제와 감자단백의 첨가효과는 관찰되지 않았다($p>0.05$). 이러한 결과는 항균펩타이드가 포함된 감자단백은 주요하게 항균 기능을 나타내나 면역계통에 대한 영향은 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

Table 32. Effect of crude potato protein (Golden valley) on immunity test in weanling piglets

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs.	NC vs.	CPP
							CPP	L	Q
PHA									
PHA1 ⁴ (18 h)	3.72	3.93	3.69	3.95	3.99	0.09	NS	NS	NS
PHA1 (42 h)	1.86	1.27	1.46	2.11	1.58	0.12	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (18 h)	3.54	3.40	3.24	3.81	3.68	0.10	NS	NS	NS
PHA2 (42 h)	1.89	1.11	1.18	2.01	1.38	0.14	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 21	3.00	2.00	3.00	2.25	2.50	0.17	NS	NS	NS
d 28	3.75	3.25	3.50	2.75	3.50	0.15	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (18 h and 42 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right intersection injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (18 h and 42 h) skin thickness of left intersection measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right intersection skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

Table 33. Effect of crude potato protein (Golden valley) on hematological status in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
d 14									
White blood cell, k/ μ l	15.94	16.17	15.09	15.27	14.90	0.27	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	7.80	8.20	7.50	7.53	7.63	0.22	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	7.21	7.14	6.76	6.68	6.41	0.17	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	0.50	0.49	0.51	0.55	0.45	0.03	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.40	0.31	0.28	0.49	0.36	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.04	0.04	0.03	0.03	0.07	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	6.13	6.28	6.58	6.63	6.12	0.17	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.55	11.75	11.30	12.00	10.83	0.14	NS	NS	NS
Hematocrit, %	38.28	39.00	37.00	38.03	36.08	0.82	NS	NS	NS
d 28									
White blood cell, k/ μ l	21.19	20.84	20.80	20.08	20.64	0.21	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	9.72	9.35	9.34	9.15	9.23	0.15	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	9.74	9.83	9.69	9.54	9.96	0.12	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.22	1.19	1.23	1.03	1.06	0.03	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.46	0.40	0.49	0.32	0.34	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.06	0.07	0.05	0.06	0.05	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	5.71	5.73	5.42	5.74	5.57	0.08	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.20	11.30	11.00	11.13	11.03	0.16	NS	NS	NS
Hematocrit, %	36.75	36.28	35.83	33.80	36.18	0.46	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

마. 장기무게, 소장 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

항생제 처리와 감자단백급여가 간 그리고 위, 소장 및 대장의 내용물을 포함한 무게와 제거한 무게에 미치는 영향에 대하여 조사하였는데(Table 34) 각 처리구간에 차이는 관찰되지 않았다($p>0.05$). 또한 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 형태(villus height, crypt depth, villus height: crypt depth ratio 및 villus width; Table 35)와 간과 뒷다리 근육의 수분과 조단백질 함량을 조사한 결과(Table 36)에서도 처리구간에 변화는 나타나지 않았다($p>0.05$).

이유후 소장점막의 상태는 장의 건강을 나타내는 지표이기도 하다(Bosi 등, 2003). 또한 항생제와 락토페린(lactoferrin)의 첨가는 장 건강을 촉진하여 성장능력을 개선한다는 보고가 있지만(Wang 등, 2006), 본 실험의 결과에서는 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다.

따라서 본 연구결과에 의하면, 감자단백(골든벨리)의 작용기전은 항균기능을 나타내는 저분자 단백질이 병원성 미생물에 대한 방어력을 조절하는 것으로 판단된다.

Table 34. Effect of crude potato protein (Golden valley) on relative organ weights in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. NC vs. CPP		
							CPP	L	Q
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	3.15	3.09	3.11	3.16	3.08	0.07	NS	NS	NS
Stomach, full	2.02	2.34	2.08	2.55	2.29	0.08	NS	NS	NS
Stomach, empty	0.84	0.82	0.87	0.79	0.86	0.02	NS	NS	NS
Small intestine, full	7.09	6.88	7.29	8.01	7.06	0.21	NS	NS	NS
Small intestine, empty	4.35	4.42	4.64	4.52	4.47	0.08	NS	NS	NS
Large intestine, full	3.00	3.25	3.11	3.18	3.38	0.19	NS	NS	NS
Large intestine, empty	1.87	1.77	1.94	2.02	1.99	0.06	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

Table 35. Effect of crude potato protein (Golden valley) on small intestinal morphology in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	CPP vs. Q
Duodenum									
Villus height, μm	1,054	1,036	1,095	1,029	1,070	18.35	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	503	486	505	476	500	5.92	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	2.10	2.13	2.17	2.16	2.14	0.03	NS	NS	NS
Villus width, μm	184	194	201	174	187	3.15	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	820	761	789	770	779	24.77	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	321	283	314	324	295	12.68	NS	NS	NS
VH/CD	2.57	2.70	2.53	2.42	2.67	0.06	NS	NS	NS
Villus width, μm	177	166	173	169	163	3.04	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	577	550	614	567	571	10.73	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	207	192	223	198	186	6.89	NS	NS	NS
VH/CD	2.83	2.87	2.78	2.90	3.12	0.07	NS	NS	NS
Villus width, μm	174	163	170	152	168	4.49	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

⁴Villus height: crypt depth ration.

Table 36. Effect of crude potato protein (Golden valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	CPP vs. Q
Liver CP, %	19.97	19.81	19.65	20.03	19.99	0.08	NS	NS	NS
Liver moisture, %	72.46	72.39	72.16	72.36	72.28	0.09	NS	NS	NS
Muscle CP, %	19.34	19.21	19.46	19.10	18.98	0.07	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	69.89	70.01	69.99	71.06	70.28	0.19	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

4. 요약

본 실험의 결과 이유자돈에서 감자단백(골든벨리)의 급여는 항생제의 효과에는 도달하지 못하였지만 감자단백의 첨가수준이 높을 때에는 항생제와 비슷한 결과를 나타냈다. 또한, 감자단백급여는 대조구에 비하여 미생물성장을 억제하는 것으로 나타났으며 영양소 소화율을 개선하여 사양성적을 향상시키는 것으로 판단된다. 따라서 항균펩타이드(Potide-G)가 함유된 기능성 신제품 감자단백의 급여는 사료용 항생제 대체 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

실험 4. 육계 사료내 항균 peptide를 함유한 감자단백(골든밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달, 미생물 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

본 실험에서는 실험 3에서 사용된 항균펩타이드(Potide-G)가 함유된 기능성 신품종 감자인 골든밸리를 이용하여 육계에 급여하였을 때 항생제와 비교하여 항균능력, 성장, 면역 그리고 소화율 등 방면에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

본 시험에서는 실험 3에서 사용된 골든밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) 감자 품종의 감자단백을 사용하였으며 감자단백의 추출방법과 특성은 실험 3과 동일하다.

감자단백의 MIC는 1,250ppm으로 판단되었다. 본 시험에서 감자단백의 사료내 첨가수준은 고구밸리와의 비교를 위하여 같은 수준으로 설정하였다.

본 시험을 위해 체중이 44.21 ± 2.11 g인 1일령 Ross종 브로일러 600수를 공시하여 5처리 4반복, 반복당 30수씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제와의 비교와 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.05% avilamycin), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 감자단백 0.25, 0.50 및 0.75% 첨가구로 구분하였다. 사양 시험은 총 6주간(0~42일) 실시하였고 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1994)에 맞추어 Starter(0~3주)와 Finisher(3~6주)로 구분하여 배합하였으며 사료배합비는 실험 2와 같다. 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며 시험기간 동안 사료와 물은 자유채식시켰다. 사육면적은 2.0×2.0m이고 평사하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

육계의 체중측정은 시험개시, 중간시점(21일째) 및 종료일(42일째)에 측정하여 증체량, 사료섭취량을 기록하였으며 사료요구율은 사료섭취량에서 증체량을 나누어 산출하였다.

기타 조사항목의 재료 및 방법은 실험 2와 동일하다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Starter와 Finisher로 나누어 진행되었으며 사양성적 결과는 Table 37과 같다. Starter의 사양성적은 항생제 처리구와 감자단백급여구 사이에 차이를 보이지 않았으며 감자단백급여수준에 의한 변화도 나타나지 않았다. Finisher 기간에 항생제의 급여는 감자단백급여구에 비하여 증체량이 뚜렷이 개선되었으며($p<0.01$) 감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다. 전체기간으로 볼 때에도 항생제 처리구는 감자단백급여구보다 증체량이 많았으며; 감자단백급여구와 대조구를 비교하였을 때 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율에서는 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 37. Effect of crude potato protein (Golden valley) on growth performance in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. NC vs. CPP		
							CPP	L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
Weight gain, g	722	683	702	710	698	5.95	NS	NS	NS
Feed intake, g	1,195	1,159	1,179	1,203	1,162	7.06	NS	NS	NS
FCR	1.66	1.70	1.68	1.69	1.67	0.01	NS	NS	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	1,403	1,349	1,365	1,360	1,355	7.35	**	NS	NS
Feed intake, g	2,623	2,661	2,634	2,668	2,562	22.09	NS	NS	NS
FCR	1.87	1.97	1.93	1.96	1.89	0.02	NS	NS	NS
Overall (0 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	2,125	2,033	2,067	2,070	2,053	12.69	**	NS	NS
Feed intake, g	3,818	3,820	3,813	3,871	3,724	23.75	NS	NS	NS
FCR	1.80	1.88	1.85	1.87	1.82	0.02	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), ** ($p<0.01$).

영양소 소화율 시험결과는 Table 38과 같다. 항생제 처리구와 감자단백급여구를 비교하였을 때 Starter와 Finisher 기간의 건물과 조단백질 소화율은 모두 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 높았으며(p<0.05); 두 기간 모두 감자단백급여수준에 의한 개선효과는 나타나지 않았다(p>0.05). 회장의 외관상 아미노산 소화율은 Table 39와 같다. 항생제 처리구의 cystine 소화율은 감자단백급여구에 비하여 높게 나타났으며(p<0.05), 기타 아미노산의 소화율은 감자단백급여와 항생제 처리에 의한 변화가 없었다(p>0.05).

Table 38. Effect of crude potato protein (Golden valley) on digestibility in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
DM	77.59	74.52	75.70	75.62	76.55	0.34	*	NS	NS
CP	65.71	61.34	61.96	62.32	62.64	0.58	**	NS	NS
Ash	43.01	41.51	41.20	42.24	42.28	0.49	NS	NS	NS
Ca	40.31	38.07	37.22	37.78	38.74	0.52	NS	NS	NS
P	40.65	40.31	39.68	38.53	40.37	0.74	NS	NS	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
DM	76.65	74.22	75.00	74.78	75.91	0.43	*	NS	NS
CP	64.89	60.91	61.42	60.65	62.01	0.61	*	NS	NS
Ash	43.25	39.92	41.77	42.29	42.17	0.52	NS	NS	NS
Ca	40.23	38.93	37.58	39.08	39.18	0.37	NS	NS	NS
P	40.73	39.68	38.44	39.88	40.08	0.51	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

Table 39. Effect of crude potato protein (Golden valley) on apparent ileal digestibility of amino acids in broilers (d 42)

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Arginine	77.01	74.29	74.47	74.28	74.04	0.77	NS	NS	NS
Histidine	68.61	64.94	67.81	67.23	68.73	0.73	NS	NS	NS
Isoleucine	66.09	62.83	83.28	63.45	63.77	0.98	NS	NS	NS
Leucine	75.50	74.73	73.63	75.63	75.13	0.70	NS	NS	NS
Lysine	66.70	64.29	65.30	64.42	66.01	0.67	NS	NS	NS
Phenylalanine	69.18	67.43	67.20	67.70	67.33	0.53	NS	NS	NS
Threonine	45.71	44.86	45.07	44.28	46.84	0.69	NS	NS	NS
Valine	59.47	57.00	58.37	56.92	57.82	0.49	NS	NS	NS
Methionine	81.56	75.90	77.81	78.68	79.57	0.78	NS	NS	NS
Alanine	70.95	67.83	68.65	68.25	69.43	0.63	NS	NS	NS
Aspartic acid	56.19	53.59	54.94	53.12	55.76	0.53	NS	NS	NS
Cystine	56.72	50.03	51.23	51.37	53.59	0.83	*	NS	NS
Glutamic acid	75.29	75.64	74.71	74.33	74.59	0.32	NS	NS	NS
Glycine	45.11	46.47	45.97	46.04	46.11	0.58	NS	NS	NS
Serine	61.77	58.37	59.60	60.29	60.43	0.70	NS	NS	NS
Total	65.06	62.55	63.20	63.07	63.94	0.37	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05).

나. 장 및 분중 미생물

감자단백급여에 의한 분중 미생물 수치의 변화는 Table 40과 같다. 14일째의 총균수, 28일째의 *E. coli*와 *staphylococcus*수치 그리고 42일째의 총균수, *E. coli*, 및 *staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구보다 뚜렷이 적었다(p<0.01). 또한 감자단백급여수준이 높아질수록 대조구에 비하여 28일째의 *staphylococcus*수치와 42일째의 총균수 그리고 *staphylococcus*수치가 유의적으로 적어졌다(p<0.05).

Table 40. Effect of crude potato protein (Golden valley) on bacterial populations in feces of broilers

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
Initial	Total bacteria	7.80	7.85	7.83	7.82	7.86	0.01	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.20	5.30	5.22	5.23	5.32	0.02	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.42	4.47	4.37	4.41	4.46	0.02	NS	NS	NS
14	Total bacteria	7.93	8.33	8.30	8.10	8.23	0.04	*	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.17	5.31	5.37	5.24	5.26	0.03	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.16	4.36	4.47	4.34	4.25	0.04	NS	NS	NS
28	Total bacteria	7.88	8.17	8.08	8.10	7.98	0.04	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	4.94	5.28	5.25	5.19	5.06	0.04	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.93	4.35	4.22	4.22	4.03	0.04	**	*	NS
42	Total bacteria	7.71	8.34	8.44	8.15	7.95	0.07	**	**	NS
	<i>E. coli</i>	4.75	5.38	5.43	5.41	5.13	0.07	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.60	4.06	4.01	3.92	3.69	0.05	**	**	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

Table 41에서는 감자단백의 급여가 육계의 대장내 미생물(42일)에 미치는 영향을 나타냈다. 맹장에서 항생제 처리구는 감자단백급여구에 비하여 총균수가 적게 나타났으며 감자단백의 급여수준이 높을수록 대조구에 비하여 *E. coli*수치가 유의적으로 적어졌다(p<0.05). 총배설장에서 총균수와 *E. coli*수치는 항생제 처리구가 감자단백급여구에 비하여 뚜렷이 적었지만(p<0.01), 감자단백 또한 대조구에 비하여 급여수준에 따른 미생물수치의 감소효과가 나타났다(p<0.05). 따라서 육계에서도 감자단백의 급여는 대조구에 비하여 분과 장내 미생물을 효과적으로 감소하여 사양성적에 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 41. Effect of crude potato protein (Golden valley) on bacterial populations in large intestine of broilers (d 42)

Variable	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
				0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
									L	Q
Total bacteria		7.61	7.81	7.83	7.72	7.70	0.03	*	NS	NS
Caecum	<i>E. coli</i>	4.98	5.22	5.24	5.10	5.00	0.04	NS	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.00	4.14	4.17	4.11	4.02	0.03	NS	NS	NS
Cloaca	Total bacteria	7.50	8.00	8.04	7.98	7.77	0.05	**	*	NS
	<i>E. coli</i>	4.51	5.19	5.05	5.01	4.77	0.06	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.80	4.11	4.03	3.91	3.95	0.04	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

다. 면역반응과 혈액성상

육계에서 실시한 지연형 과민반응 결과와 면양혈액에 대한 항체형성능의 결과는 Table 42와 같다. 육계에서의 접종실험 결과에서 PHA-P를 접종한 부위는 빨갛게 홍반을 형성하였다. PHA-P접종 후 12시간째가 가장 높은 수치의 종창을 보이며 24시간째에는 종창정도가 12시간에 측정한 것과 유사하거나 또는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 PHS를 접종한 군에서는 전 과정에 걸쳐 어떠한 종창의 변화를 보이지 않았다. PHA1 또한 PHA2중 어느 한 결과에서 유의성을 보이면 세포매개성 면역력의 차이를 나타낸다고 할 수 있다. 그러나 본 실험의 결과에서는 항생제와 감자단백 급여구에서 높은 수치를 기록하였지만 통계적 유의차는 나타나지 않았다(p>0.05).

혈중 백혈구, 적혈구계 및 혈소판계의 조사결과는 Table 43과 같은데 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 차이는 나타나지 않았다(p>0.05)

Table 42. Effect of crude potato protein (Golden valley) on immunity test in broilers

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	CPP vs. Q
PHA									
PHA1 ⁴ (12 h)	0.40	0.50	0.31	0.64	0.46	0.06	NS	NS	NS
PHA1 (24 h)	0.27	0.45	0.23	0.66	0.30	0.06	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (12 h)	0.58	0.47	0.31	0.60	0.55	0.05	NS	NS	NS
PHA2 (24 h)	0.48	0.48	0.28	0.68	0.45	0.06	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 25	6.50	5.25	5.00	5.25	4.75	0.29	NS	NS	NS
d 29	6.25	5.50	5.50	6.00	6.50	0.25	NS	NS	NS
d 35	7.75	9.75	6.25	6.75	6.75	0.53	NS	NS	NS
d 39	9.00	10.00	7.25	7.00	7.25	0.50	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (12 h and 24 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right toe web injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (12 h and 24 h) skin thickness of left toe web measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right toe skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

라. 장기무게, 소장 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

소화장기인 간장, 전위, 위, 소장 및 대장의 체중에 대한 백분율 퍼센트로 장기무게를 조사하였는데(Table 44), 각 처리구간에는 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). 또한, 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량을 조사한 결과(Table 45) 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다(p>0.05). 비슷한 결과로, 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융모높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융모높이의 비례(VH/CD) 그리고 융모넓이(villus width, VW)를 조사한 결과(Table 46)에서도 처리구간에 변화는 나타나지 않았다.

Table 43. Effect of crude potato protein (Golden valley) on hematological status in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
d 21									
White blood cell, k/ μ l	16.28	16.22	16.46	16.00	16.18	0.14	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	4.55	4.41	4.53	4.56	4.57	0.05	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	9.91	9.81	10.04	9.57	9.66	0.11	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.38	1.45	1.42	1.37	1.40	0.04	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.35	0.42	0.37	0.38	0.41	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.11	0.13	0.10	0.12	0.14	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	2.89	2.87	2.72	2.74	2.84	0.03	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	10.07	9.97	9.72	9.77	10.05	0.08	NS	NS	NS
Hematocrit, %	29.56	29.54	29.37	28.24	29.27	0.36	NS	NS	NS
d 42									
White blood cell, k/ μ l	17.02	16.69	16.92	16.65	16.70	0.14	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	5.48	5.33	5.34	5.37	5.46	0.04	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	10.16	9.96	10.19	9.84	9.81	0.11	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.08	1.04	1.07	1.13	1.05	0.04	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.18	0.25	0.20	0.21	0.24	0.03	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.13	0.11	0.12	0.11	0.14	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	3.02	2.98	2.97	2.99	2.96	0.01	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.62	11.04	11.29	11.34	11.54	0.12	NS	NS	NS
Hematocrit, %	33.15	32.02	32.76	32.65	32.37	0.26	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 44. Effect of crude potato protein (Golden valley) on relative organ weights in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	3.46	3.14	3.51	3.36	3.33	0.08	NS	NS	NS
Proventriculus, full	0.49	0.45	0.43	0.52	0.47	0.01	NS	NS	NS
Proventriculus, empty	0.46	0.42	0.40	0.45	0.41	0.01	NS	NS	NS
Gizzard, full	2.99	2.83	2.73	3.01	2.79	0.06	NS	NS	NS
Gizzard, empty	1.90	1.85	1.81	1.87	1.86	0.04	NS	NS	NS
Small intestine, full	3.74	4.14	3.87	3.95	3.49	0.14	NS	NS	NS
Small intestine, empty	2.77	2.56	2.66	2.45	2.61	0.05	NS	NS	NS
Large intestine, full	1.28	1.07	1.20	0.99	1.04	0.06	NS	NS	NS
Large intestine, empty	0.60	0.62	0.54	0.56	0.61	0.01	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 45. Effect of crude potato protein (Golden valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. CPP	
								L	Q
Liver CP, %	18.44	18.67	18.27	18.03	18.85	0.12	NS	NS	NS
Liver moisture, %	64.57	64.10	64.84	63.65	63.47	0.21	NS	NS	NS
Muscle CP, %	19.77	19.85	19.68	20.11	20.33	0.23	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	75.85	76.19	76.54	76.10	75.74	0.17	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 46. Effect of crude potato protein (Golden valley) on small intestinal morphology in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Crude potato protein, %			SEM ²	p-value ³		
			0.25	0.50	0.75		PC vs. CPP	NC vs. L	NC vs. Q
Duodenum									
Villus height, μm	2,505	2,373	2,320	2,418	2,295	47.80	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	589	581	550	575	564	12.55	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	4.28	4.10	4.25	4.23	4.11	0.10	NS	NS	NS
Villus width, μm	280	273	281	268	271	3.12	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	1,746	1,778	1,743	1,763	1,753	9.22	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	332	334	323	325	318	4.15	NS	NS	NS
VH/CD	5.28	5.33	5.41	5.44	5.51	0.05	NS	NS	NS
Villus width, μm	173	189	170	169	174	4.63	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	806	822	796	811	809	8.65	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	185	190	180	187	186	2.77	NS	NS	NS
VH/CD	4.37	4.33	4.43	4.34	4.36	0.04	NS	NS	NS
Villus width, μm	140	138	141	143	136	1.80	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

⁴Villus height: crypt depth ration.

4. 요약

본 실험의 결과 골든밸리 감자단백을 육계에 급여하였을 때 분과 장내 미생물물 억제효과를 뚜렷이 나타냈지만 사양성적과 영양소 소화율은 감자단백의 급여수준에 따른 개선효과가 나타나지 않았다. 실험 2의 결과와 비교할 때 자돈에서는 골든밸리 감자품종의 급여가 Phase II의 건물 소화를 촉진하여 전체기간의 사효효율을 개선하였지만 육계에서는 그 효과가 나타나지 않았다. 하지만 미생물억제 능력으로 첨가수준이 향상될 때 더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

<2차년도> 검증된 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치를 평가하고 challenge study를 통한 면역반응조사

본 연구에서는 1차년도의 연구를 통하여 더 높은 항균활성을 나타낸 고구밸리를 이용하여 활성이 높도록 정제한 감자단백으로 자돈과 육계사료에 첨가하였을 때의 적정첨가수준을 조사하고, 또한 면역반응효과를 비교하기 위하여 자돈과 육계를 이용하여 2차례 challenge study를 실시하였다.

실험 5. 자돈 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

1차년도의 연구에서 4차례 실험의 결과에 의하면 신제품 감자인 고구와 골든밸리의 감자단백을 자돈과 육계에 급여하였을 때 분과 장내 미생물 성장을 억제하는 것으로 나타났으며 소화율 개선과 성장촉진작용도 있는 것으로 사료된다. 그러나 항균활성과 성장촉진효과에 있어서 고구밸리는 골든밸리 보다 더 높은 성적을 기록하였다. 이러한 항균기능과 성장촉진작용은 저분자 단백질인 항균펩타이드(Potamin-1과 Potide-G)의 작용으로 판단되며 고구밸리의 감자단백 항균능력이(MIC test) 골든밸리에 비하여 더 높기 때문에 사양시험결과에서도 더 좋은 성적을 나타낸 것으로 사료된다.

이러한 전제하에서 본 실험에서는 고구밸리를 이용하여 항균활성이 낮은 큰 단백질분자를 제거한 정제감자단백(refined potato protein, RPP)의 급여가 자돈과 육계의 성장능력, 영양소 소화율, 아미노산 회장소화율, 분과 장내 미생물, 면역반응 및 소장의 형태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2차례 사양실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 정제감자단백의 추출과 MIC test

본 시험에 사용된 감자(고구벨리; *Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)는 (주)포테이토벨리에서 제공되었으며 상대습도 90~95%, 4°C 조건에서 저온보관되었다.

정제감자단백(Refined potato protein, RPP)의 추출을 위하여 우선 감자단백(CPP) 추출과정을 통하여 선별된 감자를 세척 후 햄머밀로 분쇄작업을 거치고 원심분리(1500g, 15분)하여 전분을 제거하였으며; 수용성 단백질이 용해된 상층액은 다시 원심분리(32,000g, 30분)한 후 여과(10,000 MWCO membrane)하여 큰 분자 단백질을 제거하였으며 수거한 용액은 동결건조하여 정제감자단백을 획득하였다.

나. 시험방법과 시험설계

본 시험에서는 개시체중이 5.96 ± 0.66 kg인 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc, 23±3일령) 280두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복, 반복당 14두씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제와의 비교와 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.15% apramycin과 0.10% colistin sulfate), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 정제감자단백 200, 400 및 600ppm 첨가구로 구분하였다. 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1998)에 맞추어 Phase I(0~14일)와 Phase II(14~28일)로 구분하여 배합하였으며(Table 47과 48) 기타 시료채취와 각각 조사항목의 재료 및 방법은 실험 1과 같게 진행되었다.

면역반응조사를 위한 세포매개성면역반응시험에서는 PBS와 PHA-P를 접종한 후 6, 24 및 48시간째에 동일한 지점의 피부두께를 측정하여 비교에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. MIC 측정

본 시험에 사용된 고구벨리의 정제감자단백(RPP)의 MIC 측정결과는 Table 49와 같다. 네 가지 균주(*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinarum*, and *E. coli*)에 대한 억제 실험에서 정제감자단백의 농도가 150ppm일 때 4가지 균의 성장을 모두 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로 정제감자단백은 감자단백의 MIC 500ppm보다 항균활성이 높게 나타났으며 정제과정에서 큰분자 단백질이 제거되어 항균활성이 높은 작은 분자의 단백질 함량이 높은 것으로 판단된다. 따라서 본 시험에서는 MIC 결과에 근거하여 200, 400 및 600ppm 세 수준을 사용하였다

Table 47. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Phase I, d 0 ~ 14)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Refined potato protein ² , ppm		
			200	400	600
Ingredients, %					
Corn	33.09	33.58	33.56	33.54	33.52
Whey powder	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Lactose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Soybean meal, 48% CP	13.84	13.76	13.76	13.76	13.76
Soy protein concentrate	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Spray-dried plasma protein	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal	4.25	4.25	4.25	4.25	4.25
Soybean oil	2.20	2.04	2.04	2.04	2.04
Limestone	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Tricalcium phosphate	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
L-Lysine-HCl, 78%	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
DL-Methionine, 100%	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Tryptophan, 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride, 25%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin premix ³	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ⁴	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin, 10%	0.15	—	—	—	—
Colistin sulfate, 1%	0.10	—	—	—	—
Refined potato protein	—	—	0.02	0.04	0.06
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,400	3,400	3,400	3,400	3,400
CP, %	23.50	23.50	23.50	23.50	23.50
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65
Met + Cys, %	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Refined potato protein of Gogu valley.

³Supplied per kg diet: 9,600 IU vitamin A, 1,800 IU vitamin D₃, 24 mg vitamin E, 1.5 mg vitamin B₁, 12 mg vitamin B₂, 2.4 mg vitamin B₆, 0.045 mg vitamin B₁₂, 1.5 mg vitamin K₃, 24 mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09 mg biotin, 0.39 mg folic acid, 7.2 mg ethoxyquin.

⁴Supplied per kg diet: 150 mg Fe, 96 mg Cu, 72 mg Zn, 46.5 mg Mn, 0.9 mg I, 0.9 mg Co, 0.3 mg Se.

Table 48. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Phase II, d 14 ~ 28)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Refined potato protein ² , ppm		
			200	400	600
Ingredients, %					
Corn	42.00	42.48	42.46	42.44	42.42
Whey powder	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Lactose	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soybean meal, 48% CP	19.08	19.00	19.00	19.00	19.00
Spray-dried plasma protein	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
Soybean oil	1.90	1.75	1.75	1.75	1.75
Limestone	0.88	0.88	0.88	0.89	0.88
Tricalcium phosphate	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
L-Lysine-HCl, 78%	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
DL-Methionine, 100%	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Tryptophan, 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride, 25%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin premix ³	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ⁴	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin, 10%	0.15	—	—	—	—
Colistin sulfate, 1%	0.10	—	—	—	—
Refined potato protein	—	—	0.02	0.04	0.06
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,350	3,350	3,350	3,350	3,350
CP, %	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.43	1.43	1.43	1.43	1.43
Met + Cys, %	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Refined potato protein of Gogu valley.

³Supplied per kg diet: 9,600 IU vitamin A, 1,800 IU vitamin D₃, 24 mg vitamin E, 1.5 mg vitamin B₁, 12 mg vitamin B₂, 2.4 mg vitamin B₆, 0.045 mg vitamin B₁₂, 1.5 mg vitamin K₃, 24 mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09 mg biotin, 0.39 mg folic acid, 7.2 mg ethoxyquin.

⁴Supplied per kg diet: 150 mg Fe, 96 mg Cu, 72 mg Zn, 46.5 mg Mn, 0.9 mg I, 0.9 mg Co, 0.3 mg Se.

Table 49. MIC of refined potato protein (Gogu valley) for 4 types of bacteria

Bacteria. spp.	Concentration of refined potato protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					MIC ¹
	200	150	100	50	25	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	150
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	+	+	100
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	-	-	+	+	100
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	100

¹MIC: Minimum Inhibitory Concentration.

나. 사양성적과 영양소 소화율

본 실험은 Phase I과 Phase II로 나누어 진행하였으며 사양성적 결과는 Table 50과 같다.

Table 50. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on growth performance in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
ADG, g	287	207	192	231	236	9.28	**	NS	NS
ADFI, g	335	274	259	294	298	7.84	**	NS	NS
FCR	1.17	1.33	1.35	1.28	1.26	0.02	**	*	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
ADG, g	435	371	378	397	403	6.45	**	*	NS
ADFI, g	646	613	629	638	637	4.15	NS	NS	NS
FCR	1.49	1.65	1.67	1.61	1.58	0.02	**	NS	NS
Overall (d 0 ~ 28)									
ADG, g	361	289	285	305	320	8.11	**	NS	NS
ADFI, g	491	443	444	466	467	6.23	**	NS	NS
FCR	1.36	1.54	1.56	1.53	1.46	0.02	**	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

Phase I에서 항생제 처리구는 정제감자단백급여구에 비하여 사양성적개선효과를 나타냈다 ($p<0.01$). 정제감자단백의 급여는 대조구에 비하여 사료요구율 개선효과를 나타냈다($p<0.05$). Phase II 에서도 항생제 처리구는 정제감자단백급여구에 비하여 사양성적이 개선되었으며 전체기간으로 볼 때 항생제의 급여는 뚜렷한 개선효과를 나타냈다($p<0.01$). 또한, 정제감자단백의 급여수준이 높을수록 대조구에 비하여 Phase II의 일당증체량이 유의적으로 개선되었다($p<0.05$).

영양소 소화율 시험결과는 Table 51과 같다. 항생제 처리구와 정제감자단백급여구를 비교할 때 Phase I과 Phase II의 칼슘(Ca) 소화율은 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 높았으며($p<0.05$) 정제감자단백급여수준에 의한 영양소 소화율 개선효과는 나타나지 않았다($p>0.05$). 또한 회장의 외관상 아미노산 소화율(Table 52)에서도 항생제 처리와 정제감자단백급여에 의한 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 51. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on digestibility in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. RPP	
								L	Q
Phase I (d 0 ~ 14)									
DM	80.22	79.09	79.31	79.01	79.70	0.31	NS	NS	NS
CP	75.10	74.48	74.49	74.43	74.56	0.51	NS	NS	NS
Ash	36.43	36.41	35.94	34.41	36.07	0.75	NS	NS	NS
Ca	40.57	37.31	35.72	35.73	36.24	0.68	**	NS	NS
P	39.25	36.30	37.03	36.89	37.09	1.02	NS	NS	NS
Phase II (d 14 ~ 28)									
DM	79.03	78.54	78.67	78.38	78.50	0.23	NS	NS	NS
CP	74.65	73.31	73.40	73.49	73.26	0.40	NS	NS	NS
Ash	36.10	36.12	35.76	34.20	35.89	0.74	NS	NS	NS
Ca	40.24	36.95	37.40	35.42	35.93	0.68	*	NS	NS
P	38.65	35.92	36.63	36.75	36.80	0.98	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

Table 52. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on apparent ileal digestibility of amino acids in weanling piglets (d 28)

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
							PC vs. RPP	NC vs. RPP	
			200	400	600			L	Q
Essential amino acids									
Arginine	79.62	79.20	79.92	79.06	78.81	0.48	NS	NS	NS
Histidine	71.84	71.23	72.31	71.07	71.22	0.64	NS	NS	NS
Isoleucine	70.59	69.70	70.73	69.72	69.57	0.47	NS	NS	NS
Leucine	74.03	73.17	74.18	73.25	73.38	0.45	NS	NS	NS
Lysine	68.79	67.36	69.06	68.16	68.08	0.62	NS	NS	NS
Phenylalanine	73.64	72.73	73.84	73.02	72.89	0.43	NS	NS	NS
Threonine	65.03	63.99	65.16	64.19	64.11	0.49	NS	NS	NS
Valine	65.39	64.49	65.87	64.72	64.67	0.58	NS	NS	NS
Methionine	80.51	79.59	80.43	79.49	79.60	0.47	NS	NS	NS
Sub-mean	72.16	71.27	72.39	71.41	71.37	0.48	NS	NS	NS
Nonessential amino acids									
Alanine	65.03	63.95	65.39	64.39	64.23	0.58	NS	NS	NS
Aspartic acid	71.15	70.21	71.35	70.41	70.35	0.55	NS	NS	NS
Cystine	57.71	54.63	56.22	55.51	55.02	1.74	NS	NS	NS
Glutamic acid	74.16	73.41	74.48	73.72	73.68	0.42	NS	NS	NS
Glycine	49.49	48.06	49.79	48.19	48.13	0.85	NS	NS	NS
Serine	71.82	70.86	71.93	70.92	71.02	0.51	NS	NS	NS
Tyrosine	73.43	72.56	73.45	72.71	72.75	0.39	NS	NS	NS
Sub-mean	66.12	64.81	66.09	65.12	65.03	0.64	NS	NS	NS
Total	69.52	68.45	69.63	68.66	68.59	0.53	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

다. 장 및 분중 미생물

정제감자단백급여에 의한 분중 미생물 수치의 변화는 Table 53과 같다. 항생제 처리구와 정제감자단백급여구를 비교할 때 7, 14, 21 그리고 28일째의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*의 수치는 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 유의하게 적었다 ($p<0.01$). 또한 정제감자단백급여구는 대조구에 비하여 첨가수준이 높아질수록 7, 14, 21 그리고 28일째의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*의 수치가 적게 나타났다($p<0.05$).

Table 53. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in feces of weanling piglets

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
				ppm				PC vs. RPP	NC vs. RPP	
				200	400	600			L	Q
Initial	Total bacteria	8.08	8.09	8.13	8.06	8.11	0.04	NS	NS	NS
	<i>E. coli</i>	5.57	5.59	5.62	5.59	5.61	0.04	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.61	4.58	4.59	4.63	4.62	0.04	NS	NS	NS
7	Total bacteria	8.24	8.51	8.44	8.42	8.40	0.02	**	**	NS
	<i>E. coli</i>	5.61	6.09	6.07	6.03	5.98	0.04	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.65	5.12	5.06	5.24	5.00	0.06	**	NS	NS
14	Total bacteria	8.11	8.42	8.38	8.37	8.34	0.03	**	**	NS
	<i>E. coli</i>	5.49	6.25	6.21	6.22	6.20	0.07	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.63	5.07	5.02	5.00	4.98	0.04	**	*	NS
21	Total bacteria	7.86	8.34	8.31	8.29	8.28	0.04	**	**	NS
	<i>E. coli</i>	5.48	6.14	6.10	6.06	6.09	0.06	**	*	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.51	4.92	4.87	4.81	4.79	0.03	**	**	NS
28	Total bacteria	7.77	8.39	8.35	8.33	8.30	0.05	**	**	NS
	<i>E. coli</i>	5.55	6.14	6.11	6.08	6.06	0.05	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.36	4.76	4.69	4.65	4.62	0.03	**	**	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

Table 54는 항생제 처리와 감자단백의 급여가 자돈의 대장내 미생물(28일째)에 대한 영향을 나타냈다. 맹장, 결장 그리고 직장의 총균수, *E. coli* 그리고 *Staphylococcus*의 수치는 항생제 처리구가 정제감자단백급여구보다 적었다($p<0.01$). 또한 정제감자단백 급여수준이 높을수록 대조구에 비하여 결장의 총균수와 *Staphylococcus*수치 그리고 직장의 총균수와 *E. coli* 수치가 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 이상의 결과로부터 정제감자단백의 급여는 항생제의 효과에는 미치지 못하였지만 미생물의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다.

Table 54. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in large intestine of weanling piglets (d 28)

Items	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
				ppm				PC vs. RPP	NC vs. RPP	
				200	400	600			L	Q
	Total bacteria	7.75	8.51	8.50	8.49	8.48	0.07	**	NS	NS
Caecum	<i>E. coli</i>	5.47	6.21	6.20	6.17	6.15	0.07	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.07	4.63	4.67	4.60	4.62	0.05	**	NS	NS
	Total bacteria	7.87	8.41	8.38	8.36	8.33	0.05	**	**	NS
Colon	<i>E. coli</i>	5.47	6.10	6.08	6.07	6.06	0.06	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.08	4.65	4.65	4.62	4.59	0.05	**	*	NS
	Total bacteria	7.77	8.34	8.35	8.33	8.30	0.05	**	*	NS
Rectum	<i>E. coli</i>	5.55	6.12	6.11	6.08	6.05	0.05	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	4.36	4.67	4.69	4.65	4.61	0.03	**	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$), * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

본 시험에서도 항생제의 급여는 사양성적을 개선한다는 보고(Kendall 등, 2000; Lewis와 Southern, 2001)와 일치한 결과를 나타냈지만 영양소 소화율에서는 항생제 효과가 나타나지 않았다. 정제감자단백급여구에서도 Phase I의 사료요구율과 Phase II의 일당증체량 개선효과가 나타났지만 영양소 소화율의 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 항생제 처리와 감자단백의 급여는 자돈의 체내 유해미생물의 성장을 유의적으로 억제하여 병원성 미생물에 의한 성장지체가 나타나지 않은 것으로 사료된다. 또한 본시험의 항생제 처리구는 두 가지

항생제를 사용하였고, 정제감자단백의 첨가량은 감자단백의 MIC 측정결과와 사료내 첨가량으로 볼 때 다소 적게 사용된 것으로 판단되며 사용수준을 높여준다면 더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

라. 면역반응과 혈액성상

정제감자단백급여와 항생제 처리에 따른 면역반응 조사와 혈중 백혈구, 적혈구계 및 혈소판계 조사의 결과는 Table 55와 56과 같다. 세포매개성 측정결과에서 PHA-P를 접종한 부위는 빨갱게 홍반을 형성하였으나 PBS만 접종한 부위에는 거의 변화가 없는 것이 관찰되었다. 그러나 각 증창정도의 변화에서 항생제 처리와 정제감자단백급여에 따른 효과는 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 55. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on immunity test in weanling piglets

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. RPP	
								L	Q
PHA									
PHA1 ⁴ (6 h)	3.34	3.21	2.78	2.71	3.12	0.12	NS	NS	NS
PHA1 (24 h)	2.79	2.50	2.28	1.99	2.67	0.11	NS	NS	NS
PHA1 (48 h)	1.28	1.33	1.10	1.30	1.50	0.07	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (6 h)	3.36	2.92	2.52	2.54	3.21	0.14	NS	NS	NS
PHA2 (24 h)	2.93	2.27	2.14	1.91	2.85	0.13	NS	NS	NS
PHA2 (48 h)	1.57	1.13	1.02	1.32	1.39	0.09	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 21	1.75	2.25	1.75	2.00	2.00	0.17	NS	NS	NS
d 28	3.25	2.50	3.00	2.50	2.75	0.16	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (6 h, 24 h and 48 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right intersection injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (6 h, 24 h and 48h) skin thickness of left intersection measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right intersection skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

면양혈액(S-RBC)에 대한 항체형성능과 혈액성상조사에서도 처리구간에 차이가 나타나지 않았다. 항균펩타이드는 면역계에 영향을 준다는 보고(Hunter 등, 2002)와는 달리 본 실험에서는 면역반응에 효과를 나타내지 않는 것으로 나타나 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 56. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on hematological status in weanling piglets

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. RPP	
			200	400	600			L	Q
d 14									
White blood cell, k/ μ l	18.40	18.13	17.80	17.84	18.08	0.26	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	8.48	8.53	8.02	8.27	8.38	0.17	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	6.19	6.01	6.21	6.11	6.18	0.13	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.55	1.41	1.47	1.49	1.43	0.07	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	2.06	2.07	1.97	1.84	1.99	0.07	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.12	0.10	0.14	0.14	0.11	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	6.07	6.08	6.04	6.19	5.99	0.10	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	12.10	12.04	12.15	12.83	12.65	0.21	NS	NS	NS
Hematocrit, %	39.10	39.90	40.05	41.73	39.56	0.75	NS	NS	NS
d 28									
White blood cell, k/ μ l	18.99	18.71	18.61	18.81	18.75	0.22	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	8.23	8.11	8.13	8.25	8.28	0.11	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	7.69	7.61	7.66	7.58	7.49	0.16	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.55	1.56	1.46	1.51	1.47	0.06	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	1.43	1.35	1.25	1.40	1.42	0.13	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.10	0.09	0.12	0.08	0.10	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	6.18	5.94	6.30	5.82	6.55	0.11	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	12.23	11.33	13.08	11.58	12.10	0.22	NS	NS	NS
Hematocrit, %	39.95	36.68	40.28	36.70	39.63	0.73	NS	NS	NS

¹PC: Positive control NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

마. 장기무게, 소장의 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

소화장기인 간장, 위, 소장 그리고 대장의 체중에 대한 백분율 퍼센트로 장기무게를 조사하였는데(Table 57), 각 처리구간에는 차이가 없었다($p>0.05$). 비슷한 결과로, 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(CH:CD) 그리고 융모넓이(villus width, VW)를 조사한 결과(Table 58) 처리구간에 변화가 없었다($p>0.05$). 또한, 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량을 조사한 결과(Table 59)에서도 항생제 처리와 정제감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 57. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on relative organ weights in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
			200	400	600				
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	3.27	3.39	3.22	3.15	3.19	0.04	NS	NS	NS
Stomach, full	1.96	2.29	2.64	2.19	2.33	0.11	NS	NS	NS
Stomach, empty	0.64	0.65	0.72	0.71	0.66	0.02	NS	NS	NS
Small intestine, full	7.22	7.69	7.57	7.77	7.51	0.09	NS	NS	NS
Small intestine, empty	4.89	4.92	5.01	5.59	5.40	0.11	NS	NS	NS
Large intestine, full	3.46	3.98	3.92	3.55	3.96	0.14	NS	NS	NS
Large intestine, empty	1.82	1.78	2.34	1.76	2.11	0.09	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

Table 58. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on small intestinal morphology in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. RPP	
			200	400	600			L	Q
Duodenum									
Villus height, μm	931	954	942	940	951	8.36	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	461	443	451	442	489	7.75	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	2.03	2.16	2.10	2.13	1.95	0.04	NS	NS	NS
Villus width, μm	185	187	192	182	184	2.78	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	732	770	762	766	747	16.73	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	354	358	327	331	336	8.99	NS	NS	NS
VH/CD	2.08	2.15	2.34	2.33	2.26	0.06	NS	NS	NS
Villus width, μm	163	158	161	170	168	2.36	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	494	507	502	505	499	6.71	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	215	204	203	208	211	5.70	NS	NS	NS
VH/CD	2.33	2.51	2.48	2.44	2.42	0.06	NS	NS	NS
Villus width, μm	162	172	169	164	170	4.32	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴Villus height: crypt depth ration.

Table 59. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in weanling piglets (d 28)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. RPP	
			200	400	600			L	Q
Liver CP, %	17.49	17.38	17.35	17.04	17.72	0.22	NS	NS	NS
Liver moisture, %	76.20	76.56	76.00	76.27	75.26	0.27	NS	NS	NS
Muscle CP, %	18.23	17.82	18.89	17.65	17.88	0.23	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	78.43	79.32	78.45	79.39	78.87	0.15	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

4. 요약

Potamin-1(PT-1)은 고구벨리품종에서 추출된 항균펩타이드로서 항균효과시험에서 높은 활성을 나타냈다(Kim 등, 2005). 본 실험의 결과에서도 정제감자단백은 분과 장내미생물의 성장을 억제하는 것으로 나타났으며 사양성적 개선효과가 있는 것으로 판단된다. 또한 항생제와 비교할 때 미생물 수치의 감소와 사양성적에서 차이를 나타냈지만, 첨가량을 높여준다면 더 좋은 성적을 기대할 수 있는 것으로 판단된다. 따라서 항균펩타이드가 포함된 정제감자단백은 병원성미생물의 성장을 억제하고 사양성적을 개선하며 사료용 항생제 대체의 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

실험 6. 육계 사료내 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구밸리)의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달 및 미생물에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

본 실험에서는 실험 5에서 사용된 기능성 신제품 감자인 고구밸리의 정제단백(refined potato protein, RPP)을 이용하여 육계에 급여하였을 때 항생제와 비교하여 항균능력, 성장, 면역 그리고 소화율 등 방면에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

본 실험에서는 실험 5에서 사용된 고구밸리(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) 감자품종의 정제감자단백을 사용하였으며 감자단백의 추출방법과 특성은 실험 5와 동일하다.

본 실험을 위하여 체중이 34.71 ± 2.18 g인 1일령 Ross종 브로일러 600수를 공시하여 5처리 4반복, 반복당 30수씩 완전임의 배치하였다. 처리내용은 항생제와의 비교와 감자단백의 MIC 수준에 근거하여 항생제(PC, positive control; 기초사료+0.05% Avilamycin), 대조구(NC, negative control; 기초사료) 그리고 정제감자단백 200, 400 및 600ppm 첨가구로 구분하였다.

사양시험은 총 6주간(0~42일) 실시하였고 시험사료는 단계별 영양소 요구량(NRC, 1994)에 맞추어 Starter(0~3주)와 Finisher(3~6주)로 구분하여 배합하였으며 사료배합비는 Table 60과 61과 같다. 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며 시험기간 동안 사료와 물은 자유채식 시켰다. 사육면적은 2.0×2.0m이고 평사하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

기타 조사항목의 재료 및 방법은 실험 2와 동일하다.

Table 60. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Starter, 0 ~ 3 wk)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Refined potato protein ² , ppm		
			200	400	600
Ingredients, %					
Corn-grain	51.59	51.73	51.71	51.67	51.65
Soybean meal, 44% CP	30.32	30.29	30.29	30.27	30.25
Corn gluten meal	8.50	8.50	8.50	8.50	8.50
Animal fat	5.36	5.30	5.30	5.34	5.36
Dicalcium phosphate	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Limestone	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32
Choline chloride, 25%	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine, 50%	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
L-Lysine-HCl, 78%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ³	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ⁴	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Clinacox, 0.2%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Avilamycin, 2%	0.05	—	—	—	—
Refined potato protein	—	—	0.02	0.04	0.06
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP, %	23.10	23.10	23.10	23.10	23.10
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Av. P, %	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Lys, %	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Met + Cys, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Refined potato protein of Gogu valley.

³Vitamin premix per kg diet: 9,000 IU vit. A, 30 IU vit. E, 1800 IU vit. D, 1 mg vit. K₃, 1 mg vit. B₁, 10 mg vit. B₂, 4 mg vit. B₆, 0.02 mg vit. B₁₂, 30 mg niacin, 12 mg pantothenic acid, 0.5 mg folic acid, 0.2 mg biotin.

⁴Supplied per kg diet: 45 mg Fe, 4.25 mg Cu, 65 mg Zn, 72.5 mg Mn, 0.5 mg I, 0.2 mg Co, 0.15 mg Se, 0.5 mg Mo, 0.15 mg Cr.

Table 61. Formula and chemical composition of experimental diets (as-fed basis) for feeding trial (Finisher, 3 ~ 6 wk)

Item	PC ¹ (Antibiotics)	NC ¹ (Control)	Refined potato protein ² , ppm		
			200	400	600
Ingredients, %					
Corn-grain	60.30	60.42	60.40	60.37	60.34
Soybean meal, 44% CP	23.28	23.26	23.26	23.25	23.24
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Animal fat	4.55	4.50	4.50	4.52	4.54
Dicalcium phosphate	1.62	1.62	1.62	1.62	1.62
Limestone	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24
Choline chloride, 25%	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine, 50%	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L-Lysine-HCl, 78%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ³	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ⁴	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Monensin, 10%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin, 2%	0.05	—	—	—	—
Refined potato protein	—	—	0.02	0.04	0.06
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP, %	20.10	20.10	20.10	20.10	20.10
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Met + Cys, %	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72

¹Abbreviations: PC, positive control; NC, negative control.

²Refined potato protein of Gogu valley.

³Vitamin premix per kg diet: 9,000 IU vit. A, 30 IU vit. E, 1800 IU vit. D, 1 mg vit. K₃, 1 mg vit. B₁, 10 mg vit. B₂, 4 mg vit. B₆, 0.02 mg vit. B₁₂, 30 mg niacin, 12 mg pantothenic acid, 0.5 mg folic acid, 0.2 mg biotin.

⁴Supplied per kg diet: 45 mg Fe, 4.25 mg Cu, 65 mg Zn, 72.5 mg Mn, 0.5 mg I, 0.2 mg Co, 0.15 mg Se, 0.5 mg Mo, 0.15 mg Cr.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Starter와 Finisher로 나누어 진행되었으며 사양성적 결과는 Table 62와 같다. Starter, Finisher 그리고 전체기간에서 항생제 처리와 정제감자단백(RPP) 600ppm 처리구에서 높은 사양성적을 기록하였지만 통계적 유의차는 인정되지 않았다($p>0.05$).

Table 62. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on growth performance in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. RPP	
								L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
Weight gain, g	572	555	559	570	578	4.99	NS	NS	NS
Feed intake, g	914	912	917	942	937	8.07	NS	NS	NS
FCR	1.60	1.65	1.64	1.65	1.62	0.02	NS	NS	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	1,371	1,346	1,370	1,340	1,335	12.84	NS	NS	NS
Feed intake, g	2,704	2,729	2,748	2,747	2,659	33.77	NS	NS	NS
FCR	1.97	2.03	2.01	2.05	1.99	0.02	NS	NS	NS
Overall (0 ~ 6 wk)									
Weight gain, g	1,943	1,900	1,929	1,910	1,913	14.79	NS	NS	NS
Feed intake, g	3,618	3,641	3,666	3,689	3,596	37.15	NS	NS	NS
FCR	1.86	1.92	1.90	1.93	1.88	0.02	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

또한 영양소 소화율(Table 63)과 외관상 회장 아미노산 소화율(Table 64)에서도 항생제 처리와 감자단백급여에 의한 효과가 나타나지 않았다($p>0.05$). 이러한 원인은 가능하게 실험을 실시한 농장은 육계를 전혀 사육하지 않았던 새로 설립된 농장으로서 성장능력과 소화력에 영향을 줄 수 있는 나쁜 사육환경요소가 배제되었기 때문에 항생제와 감자단백급여에 의한 효과가 적게 나타난 것으로 사료된다.

Table 63. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on digestibility in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs.	NC vs.	RPP
							RPP	L	Q
Starter (0 ~ 3 wk)									
DM	78.67	77.26	78.34	77.31	77.55	0.36	NS	NS	NS
CP	70.11	71.08	67.12	71.17	67.73	0.76	NS	NS	NS
Ash	44.26	40.53	42.50	43.15	44.19	1.20	NS	NS	NS
Ca	31.84	26.11	31.70	29.44	29.15	0.80	NS	NS	NS
P	36.92	34.35	33.51	32.30	33.16	0.95	NS	NS	NS
Finisher (3 ~ 6 wk)									
DM	77.27	76.86	77.90	76.73	76.54	0.29	NS	NS	NS
CP	69.16	68.46	68.74	68.35	66.54	0.53	NS	NS	NS
Ash	43.85	40.13	41.83	41.71	43.35	1.24	NS	NS	NS
Ca	30.35	25.28	31.72	28.80	27.77	0.89	NS	NS	NS
P	35.72	31.25	33.17	31.07	31.83	0.92	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

Table 64. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in broilers (d 42)

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
							PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
			200	400	600				
Arginine	79.50	78.96	79.05	78.92	79.02	0.25	NS	NS	NS
Histidine	75.15	74.18	74.64	74.24	73.98	0.30	NS	NS	NS
Isoleucine	69.68	69.34	69.79	69.27	68.72	0.32	NS	NS	NS
Leucine	79.15	78.92	79.08	78.82	78.77	0.23	NS	NS	NS
Lysine	70.84	70.65	70.83	70.35	69.88	0.34	NS	NS	NS
Phenylalanine	75.99	74.76	75.54	74.89	74.30	0.34	NS	NS	NS
Threonine	47.12	47.40	47.54	47.64	47.19	0.51	NS	NS	NS
Valine	60.02	59.79	60.24	59.49	59.81	0.35	NS	NS	NS
Methionine	78.06	76.10	77.47	75.83	74.60	0.71	NS	NS	NS
Alanine	71.77	72.19	72.13	72.33	72.10	0.31	NS	NS	NS
Aspartic acid	62.91	62.33	62.85	62.23	62.53	0.45	NS	NS	NS
Cystine	40.74	39.35	41.25	39.22	38.88	0.94	NS	NS	NS
Glutamic acid	80.25	79.91	80.31	80.08	79.99	0.19	NS	NS	NS
Glycine	55.57	54.55	55.38	54.50	53.62	0.53	NS	NS	NS
Serine	64.26	63.45	63.66	62.60	63.47	0.44	NS	NS	NS
Total	67.40	66.79	67.32	66.69	66.46	0.37	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

나. 장 및 분중 미생물

정제감자단백급여에 의한 분중 미생물 수치의 변화는 Table 65와 같다. 항생제 처리구와 정제감자단백급여구를 비교할 때 21일과 42일째의 총균수, *E. coli* 및 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 정제감자단백급여구보다 뚜렷이 감소하였다($p < 0.01$). 또한 정제감자단백급여수준이 높아질수록 대조구에 비하여 21일째의 총균수, *E. coli* 및 *Staphylococcus*수치와 42일째의 *E. coli*수치가 유의적으로 적었다($p < 0.05$).

Table 66에서는 정제감자단백의 급여가 육계의 대장내 미생물(42일)에 미치는 영향을 나타냈다. 맹장과 총배설장의 총균수, *E. coli* 및 *Staphylococcus*수치는 항생제 처리구가 정제감자단백급여구에 비하여 뚜렷이 감소되었다($p < 0.01$). 또한, 정제감자단백의 급여수준이 향상할수록 맹장의 총균수와 *Staphylococcus*수치 그리고 총배설장의 *E. coli*수치는 대조구에 비하여 뚜렷이 적게 나타났다($p < 0.01$).

다. 면역반응과 혈액성상

육계에서 실시한 지연형 과민반응 결과와 면양혈액에 대한 항체형성능의 결과는 Table 67과 같다. 모든 결과에서 항생제 처리와 정제감자단백(RPP)의 급여가 수치상으로 개선경향을 나타냈지만 통계적 유의차는 인정되지 않았다($p > 0.05$). 또한 혈중 백혈구, 적혈구계 및 혈소판계의 조사(Table 68)에서도 항생제 처리와 정제감자단백급여에 의한 효과는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

라. 장기무게, 소장의 형태 및 간과 근육의 단백질과 수분함량

소화장기인 간장, 전위, 위, 소장 및 대장의 체중에 대한 백분율 퍼센트로 장기무게를 조사한 결과는 Table 69와 같은데 각 처리구간에는 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 간과 뒷다리 근육의 조단백질과 수분함량을 조사한 결과(Table 70)에서도 처리구간에 차이는 없었다($p > 0.05$). 또한 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(VH/CD) 그리고 융모넓이(villus width, VW)를 조사한 결과(Table 71)에서도 항생제 처리와 정제감자단백급여에 의한 영향은 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 65. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in feces of broilers

Day	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
				ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP Q
				200	400	600				
	Total bacteria	7.19	7.18	7.14	7.15	7.18	0.01	NS	NS	NS
Initial	<i>E. coli</i>	4.82	4.84	4.88	4.80	4.81	0.01	NS	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.20	3.21	3.21	3.17	3.18	0.01	NS	NS	NS
21	Total bacteria	7.44	8.16	8.16	8.15	8.10	0.06	**	*	NS
	<i>E. coli</i>	4.57	5.26	5.26	5.18	5.12	0.06	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.71	4.32	4.31	4.22	4.20	0.05	**	**	NS
42	Total bacteria	7.25	8.19	8.18	8.14	8.13	0.08	**	NS	NS
	<i>E. coli</i>	4.43	5.02	4.78	4.71	4.70	0.05	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.58	4.17	4.18	4.19	4.11	0.05	**	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01).

Table 66. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on bacterial populations in large intestine of broilers (d 42)

Items	Bacteria spp. (Log ₁₀ CFU/g)	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
				ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP Q
				200	400	600				
	Total bacteria	7.44	8.31	8.23	8.19	8.18	0.07	**	**	NS
Caecum	<i>E. coli</i>	4.75	5.29	5.28	5.26	5.25	0.05	**	NS	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.64	4.34	4.30	4.21	4.19	0.06	**	**	NS
Cloaca	Total bacteria	7.25	8.19	8.18	8.14	8.13	0.08	**	NS	NS
	<i>E. coli</i>	4.43	5.02	4.78	4.71	4.70	0.05	**	**	NS
	<i>Staphylococcus</i>	3.58	4.17	4.18	4.20	4.16	0.06	**	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05), ** (p<0.01).

Table 67. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on immunity test in broilers

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. RPP	
								L	Q
PHA									
PHA1 ⁴ (12 h)	0.51	0.39	0.34	0.42	0.46	0.05	NS	NS	NS
PHA1 (24 h)	0.32	0.32	0.22	0.26	0.29	0.04	NS	NS	NS
PHA2 ⁵ (12 h)	0.48	0.29	0.18	0.31	0.31	0.06	NS	NS	NS
PHA2 (24 h)	0.37	0.30	0.13	0.17	0.27	0.04	NS	NS	NS
HA titer (log ₂ base)									
d 25	5.00	8.25	7.50	5.75	5.50	0.53	NS	NS	NS
d 29	5.50	5.25	5.50	5.50	6.25	0.24	NS	NS	NS
d 35	10.75	7.00	9.75	9.00	8.75	0.59	NS	NS	NS
d 39	7.00	7.50	8.50	9.75	8.75	0.55	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

⁴PHA1 was calculated by subtracting preinjection skin thickness from postinjection (12 h and 24 h) skin thickness, measured in millimeters, of the right toe web injected with PHA-P/PBS solution.

⁵PHA2 was calculated by subtracting postinjection (12 h and 24 h) skin thickness of left toe web measured in millimeters, injected with PBS solution, from the right toe skin thickness, injected with PHA-P/PBS solution.

Table 68. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on hematological status in broilers

Item	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
			200	400	600				
d 21									
White blood cell, k/ μ l	16.42	16.22	15.97	16.15	16.34	0.21	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	4.03	4.08	3.82	4.07	4.18	0.13	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	10.39	10.21	10.41	10.31	10.38	0.13	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.15	1.13	1.01	0.94	1.00	0.05	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.75	0.71	0.62	0.72	0.70	0.04	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.10	0.08	0.11	0.12	0.09	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	2.94	2.88	2.84	2.91	3.08	0.04	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	10.88	10.54	10.65	10.83	11.15	0.14	NS	NS	NS
Hematocrit, %	30.40	30.60	31.00	31.43	32.75	0.44	NS	NS	NS
d 42									
White blood cell, k/ μ l	16.88	16.81	16.84	16.86	16.77	0.22	NS	NS	NS
Neutrophil, k/ μ l	4.72	4.55	4.57	4.69	4.82	0.11	NS	NS	NS
Lymphocyte, k/ μ l	10.73	10.85	10.90	10.82	10.63	0.17	NS	NS	NS
Monocyte, k/ μ l	1.27	1.28	1.18	1.23	1.19	0.06	NS	NS	NS
Eosinophil, k/ μ l	0.11	0.09	0.12	0.08	0.10	0.01	NS	NS	NS
Basophil, k/ μ l	0.06	0.04	0.08	0.04	0.05	0.01	NS	NS	NS
Red blood cell, 10 ⁶ / μ l	2.93	2.86	2.92	2.97	2.96	0.03	NS	NS	NS
Hemoglobin, g/dl	11.18	10.53	11.03	10.78	11.15	0.13	NS	NS	NS
Hematocrit, %	33.40	31.38	32.28	32.90	33.33	0.36	NS	NS	NS

¹PC: Positive control NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 69. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on relative organ weights in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
			200	400	600				
(Organ wt/live BW)•100, %									
Liver	2.84	2.85	2.34	3.06	2.86	0.11	NS	NS	NS
Proventriculus, full	0.49	0.44	0.47	0.46	0.43	0.02	NS	NS	NS
Proventriculus, empty	0.49	0.38	0.48	0.42	0.43	0.02	NS	NS	NS
Gizzard, full	2.96	3.17	3.02	2.79	2.87	0.09	NS	NS	NS
Gizzard, empty	2.00	2.02	2.27	1.65	1.79	0.07	NS	NS	NS
Small intestine, full	6.28	5.70	5.42	6.21	6.12	0.13	NS	NS	NS
Small intestine, empty	4.18	3.72	3.49	4.23	4.20	0.12	NS	NS	NS
Large intestine, full	1.13	1.08	1.26	0.93	0.87	0.06	NS	NS	NS
Large intestine, empty	0.79	0.69	0.72	0.65	0.64	0.03	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 70. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on CP and moisture concentration of liver and muscle in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein,			SEM ²	p-value ³		
			ppm				PC vs. RPP	NC vs. L	RPP vs. Q
			200	400	600				
Liver CP, %	17.90	17.39	17.98	15.54	16.31	0.32	NS	NS	NS
Liver moisture, %	74.60	73.90	74.83	74.41	74.61	0.35	NS	NS	NS
Muscle CP, %	21.18	20.95	20.14	20.33	21.40	0.24	NS	NS	NS
Muscle moisture, %	75.02	75.84	75.21	76.64	75.39	0.37	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant (p>0.05).

Table 71. Effect of refined potato protein (Gogu valley) on small intestinal morphology in broilers (d 42)

Items	PC ¹	NC ¹	Refined potato protein, ppm			SEM ²	p-value ³		
			200	400	600		PC vs. RPP	NC vs. RPP	
								L	Q
Duodenum									
Villus height, μm	2,383	2,306	2,293	2,311	2342	56.01	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	579	565	577	558	576	9.28	NS	NS	NS
VH/CD ⁴	4.13	4.09	4.00	4.14	4.08	0.10	NS	NS	NS
Villus width, μm	264	253	255	243	248	5.21	NS	NS	NS
Jejunum									
Villus height, μm	1,754	1,726	1,738	1,731	1,760	8.39	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	308	295	298	303	312	5.29	NS	NS	NS
VH/CD	5.71	5.88	5.87	5.74	5.67	0.10	NS	NS	NS
Villus width, μm	189	171	175	170	185	5.13	NS	NS	NS
Ileum									
Villus height, μm	754	770	756	778	780	8.71	NS	NS	NS
Crypt depth, μm	184	177	171	181	179	3.00	NS	NS	NS
VH/CD	4.12	4.37	4.44	4.31	4.38	0.07	NS	NS	NS
Villus width, μm	146	143	141	147	139	1.33	NS	NS	NS

¹PC: Positive control; NC: Negative control.

²SEM: Standard error mean.

³L: Linear; Q: Quadratic; NS: Not significant ($p>0.05$).

⁴Villus height: crypt depth ration.

4. 요약

실험 5의 결과와 비교할 때 육계에서도 정제감자단백(RPP)의 첨가는 항생제의 효과와는 차이를 나타냈지만 분과 장내 미생물의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 사양성적 과 영양소 소화율에서 정제감자단백과 항생제의 차이가 나타나지 않았으며 대조구와 비교할 때에도 개선효과가 나타나지 않았다. 이러한 원인은 나쁜 사육환경요소가 배제되었기 때문에 항생제와 정제감자단백급여에 의한 효과가 적게 나타난 것으로 사료된다. 실험 5의 결과와 미생물 성장을 억제하는 효과로 미루어 보아 정제감자단백의 첨가량을 높이면 더 우수한 성적을 나타내어 항생제 대체 가능성을 나타낼 것으로 판단된다.

실험 7. 자돈에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역반응 조사

1. 실험방법: 감자단백을 투여한 자돈에서의 살모넬라에 감염에 대한 효과

강병원성의 Nalidixic acid 저항성이 있는 *Salmonella* Typhimurium(IVKB01199)을 nutrient broth(DIFCO, USA)에 넣고 37°C incubator에서 16-24시간 동안 배양하였다. 배양액을 OD₆₅₀ 값을 측정하고 배양액을 10⁻¹부터 10⁻¹⁰까지 10진씩 희석하여 100μl씩 각 희석별로 nutrient agar에 도말한 후 배양하며 CFU를 측정하였다.

3주령 자돈을 한 군당 3마리씩 대조군, 항생제가 첨가된 사료를 급여한 군, 정제감자단백 (Refined potato Protein, RPP)을 각각 200, 400, 600ppm을 첨가한 사료를 급여한 군 등 모두 5군으로 나눈 뒤 1주동안 해당군에 맞게 사료를 급여하였다(Table 72). 이때 대조군의 경우 항생제가 첨가되지 않은 사료를 충분히 급여하였고 항생제 첨가군의 경우 apramycin 0.15%와 colistin 0.10%가 함유된 사료를 급여하였다. 해당 사료를 1주동안 충분히 급여시킨 후 각 자돈당 3×10⁹CFU/ml(OD 값 0.7)의 *S. Typhimurium*을 1.2% NaHCO₃(pH7.8) nutrient broth 10ml에 혼합하여 경구로 접종하였다. 접종 후 매일 임상증상 (설사유무를 중심으로 하여)과 폐사정도를 관찰하였다.

공격접종 후 분변내의 *S. Typhimurium*의 집락수의 변화를 관찰하기 위해 1, 2, 3주에 각 자돈에서 분변을 채취하여 분변 1g을 Tetrathionate broth(TT broth) 10ml에 넣고 충분히 혼합하여 42°C에서 진탕하면서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양 후 nalidixid acid가 첨가된 MacConkey agar, XLT4 agar에 도말하여 37°C에서 16-24시간 동안 배양하였고 집락수를 측정하였다. 배양 후 의심된 colony는 API 20E kit로 *S. Typhimurium*인지를 확인하였다.

Table 72. Experimental design of challenge study with *Salmonella* Typhimurium in weaning piglets

	Antibiotic	Control	Refined potato protein, ppm		
			200	400	600
Number of piglets	3	3	3	3	3

2. 결과 및 고찰

3주령 자돈을 5개의 군으로 나눈 뒤 각 군에 맞게 감자단백 또는 항생제를 첨가한 사료를 급여하였다. 대조군에는 항생제가 첨가가 되지 않은 동일한 사료를 급여하였다. 사료를 1주간 급여한 후 *S. Typhimurium*을 경구로 접종한 후 공격접종 후 3주동안 매일 임상증상(설사를 중심으로 관찰)의 유무를 관찰하였고 폐사되는 수를 관찰하였다. 또한 공격접종전, 접종후 1주, 2주, 3주후에 분변으로부터 *S. Typhimurium*의 개수를 측정하였다. 폐사된 돼지에서는 바로 대장내용물을 수거한 후 *S. Typhimurium*의 집락수를 측정하였다. 임상증상의 발현은 항생제를 첨가한 사료를 급여한 군을 제외하고는 모든 군에서 나타났다. 특히 대조군, 감자단백 200과 400ppm을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 *S. Typhimurium*를 접종한 다음 날부터 설사증상이 관찰되기 시작하였다. 감자단백을 600ppm을 첨가한 사료를 첨가한 군에서는 공격접종 4일 후부터 설사증상이 관찰되었다. 이 경우 감자단백이 어느 정도 살모넬라의 임상증상 발현을 억제시키는 것으로 판단된다. 그러나 항생제를 첨가한 사료를 급여한 군에서는 설사증상은 관찰되지 않았다. 임상증상의 발현 기간을 관찰해 보면 대조군의 경우 접종 1일 후부터 시작하여 접종 15일까지 진행되었고 그 이후부터는 설사증상이 관찰되지 않았다. 감자단백을 200ppm 첨가한 사료를 급여한 군의 경우 공격접종 1일부터 시작해서 접종 14일까지 설사증상이 관찰되었다. 또한 감자단백 400ppm을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 임상증상이 공격접종 1일부터 관찰되기 시작하여 접종12일까지 모두 폐사하여 이후에는 임상증상을 관찰할 수가 없었다. 감자단백 600ppm을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 임상증상이 공격접종 4일 후부터 관찰되기 시작하여 접종 14일 이후에는 관찰되지 않아 항생제를 첨가한 사료를 급여한 군을 제외하고는 발현지속기간에 별다른 차이를 보이지 않았다 (Data not shown).

폐사율을 보면 대조군과 항생제를 첨가한 군의 경우 전혀 나타나지 않았으나 감자단백 200ppm을 첨가한 군에서 1마리, 400ppm을 접종한 군에서는 3마리 모두, 감자단백 600ppm을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 2마리가 폐사하여 오히려 대조군보다 폐사율이 높았다 (Table 73).

대조군에서는 폐사가 나타나지 않았으나 감자단백을 첨가한 사료에서 폐사가 나온 것은 지금까지의 수집된 자료로는 설명이 되지 않는다. 그러나 첨가한 군에서 폐사한 이유를 군이 유추해 본다면 감자단백의 첨가한 사료를 첨가한 급여군에서 사료를 먹지 않는 것을 볼 때 임상증상이 나타나는 돼지가 절식의 정도가 대조군보다 더 심한 것으로 추정된다. 비록

사료 섭취량을 정확히 측정하지는 않았으나 매일 임상증상을 관찰할 때 사료의 섭취정도가 대조군에 비해 확연히 줄어들었다. 돼지가 *S. Typhimurium*에 감염되면 설사와 동시에 사료의 절식 또는 사료섭취가 줄어들는데 이때 감자단백을 첨가한 사료를 급여하는 군에서 절식정도가 심하기에 제대로 영양소가 공급이 되지 않아 폐사로 이어지지 않았는가로 추정할 수 있다. 그런 측면에서 본다면 감자단백을 첨가한 사료를 급여한 군사이에서의 폐사율의 차이는 중요한 의미를 지닐 수도 있다. 본 연구에서는 공격접종군의 군수가 비교적 많은 것으로 판명되었을 때 일단 감자단백 200ppm을 첨가한 군에서 폐사율이 적은 것으로 보아 감자단백 200ppm에서 살모넬라에 대한 방어효과가 있는 것으로 판명되었다. 그러나 항생제 보다는 덜 효과적인 것으로 나타났다.

Table 73. Effects of Potato peptide on clinical sign (diarrhea) and mortality of weaning pigs after oral *Salmonella* Typhimurium challenge

	Antibiotic	Control	Refined potato protein, ppm		
			200	400	600
Clinical sign (degree)	0/3	3/3 (+++)	3/3 (+++)	3/3 (+++)	3/3 (+++)
Dead/Total (Mortality)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	3/3 (100%)	2/3 (67%)

공격접종전, 접종후 1, 2, 3주에 분변 또는 대장 내용물에서 공격접종한 *S. Typhimurium*균수의 감소효과를 측정하였다. 공격접종전 분변에서는 *Salmonella*가 모든 군에서 검출이 되지 않았다. 그러나 공격접종 후 7일 후에 분변에서 g당 살모넬라의 집락수를 측정한 결과 항생제 투여군에서는 3.11을 나타낸 반면, 대조군은 7.55를 그리고 감자단백을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 각각 6.92, 6.88, 6.58로 감자단백이 첨가량이 높을수록 반비례해서 검출되는 것으로 나타났다(Table 74). 또한 감자단백을 투여한 군은 대조군보다 약 0.5-1.0정도 낮은 것으로 나타났다. 그러나 공격접종후 2주후에는 항생제 첨가군의 경우 전혀 검출되지 않았고 대조군과 감자단백을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 별 차이가 없이 6.55-6.77정도로 측정되었다. 이러한 결과가 살모넬라에 감염된 자돈들이 섭취가 감소되어 사료내에 첨가된 감자단백을 충분히 섭취하지 못한 이유로 사료된다. 따라서 본 연구의 결과 감자단백은 예방적인 효과가 있는 것으로 나타났고 경도의 감염시 효과적일 것으로 추측된다.

Table 74. Effect of potato protein on colony numbers of *Salmonella* Typhimurium in piglets after challenge

Item	Count (Log ₁₀ CFU/g)				
	Antibiotic	Control	Refined potato protein, ppm		
			200	400	600
Days post challenge					
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
7	3.11±0.07	7.55±0.07	6.92±0.14	6.88±0.02	6.58±0.13
14	0±0	6.55±0.05	6.74±0.02	6.77±0.00	6.67±0.03
21	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

실험 8. 육계에서 항균 펩타이드(정제단백, 고구벨리)와 항생제간의 challenge study를 통한 면역반응 조사

1. 실험방법: 감자단백을 첨가한 사료를 급여한 육계에서의 살모넬라 공격집중에 대한 방어 효과

강병원성의 Nalidixic acid 저항성이 있는 *Salmonella Gallinarum*을 nutrient broth(DIFCO, USA)에 넣고 37°C incubator에서 16-24시간 동안 배양하였다. 배양액을 OD₆₅₀ 값을 측정하고 배양액을 10⁻¹부터 10⁻¹⁰까지 10진씩 희석하여 100μl씩 각 희석별로 nutrient agar에 도말한 후 배양하며 CFU를 측정하였다.

부화된 병아리를 군당 10마리씩 대조군, 항생제가 첨가된 사료를 급여한 군, 정제감자단백(Refined potato Protein, RPP)을 각각 200, 400, 600ppm을 첨가한 사료를 급여한 군 등 모두 5군으로 나눈 뒤 3주 동안 해당 군에 맞게 사료를 급여하였다(Table 75). 이때 대조군의 경우 항생제가 첨가되지 않은 사료를 충분히 급여하였고 항생제 첨가군의 경우 avilamycin 0.05%가 함유된 사료를 급여하였다. 해당 사료를 충분히 급여 시킨 후 병아리 당 3×10⁸CFU/ml의 *S. Gallinarum*을 1.2% NaHCO₃(pH7.8) nutrient broth 10ml에 혼합하여 경구로 접종하였다. 접종 후 매일 임상증상 (설사유무를 중심으로 하여)과 폐사정도를 관찰하였다.

공격접종 후 분변내의 *S. Gallinarum*의 집락수의 변화를 관찰하기 위해 접종 후 1, 2, 3주에 각 병아리에서 분변을 채취하여 분변 1g을 Tetrathionate broth(TT broth) 10ml에 넣고 충분히 혼합하여 42°C에서 진탕하면서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양 후 nalidixic acid가 첨가된 MacConkey agar, XLT4 agar에 도말하여 37°C에서 16-24시간 동안 배양하였고 집락수를 측정하였다. 배양 후 의심된 colony는 API 20E kit로 *S. Gallinarum*인지를 확인하였다.

Table 75. Experimental design of challenge study with *Salmonella Typhimurium* in chickens

	Antibiotic	Control	Refined potato Protein, ppm		
			200	400	600
Number of chicks	10	10	10	10	10

2. 결과 및 고찰

감자단백 또는 항생제를 첨가한 사료 및 대조군은 항생제가 첨가가 되지 않은 동일한 사료를 급여하였다. 3주령의 육계를 5개의 군으로 나눈 뒤 각 군당 *S. Gallinarum*을 경구로 접종한 후 공격접종 후 3주 동안 매일 임상증상(설사를 중심으로 관찰)의 유무를 관찰하였고 폐사되는 수를 관찰하였다. 또한 공격접종 전, 접종 후 1주, 2주, 3주후에 분변으로부터 *S. Gallinarum*의 집락수를 측정하였다. 임상증상의 발현은 항생제를 첨가한 사료를 급여한 군을 제외하고는 모든 군에서 나타났다. 대조군에서는 접종 1일 후부터 설사 나타나며 공격접종후 7일째 전부 설사증상이 관찰되었다 (Table 76). 감자단백을 첨가한 사료를 급여한 군에서는 접종 후 1일 후부터 설사가 나타나며 7일후에 감자단백을 200ppm에서 60%설사 나타나며 400ppm에서 30%, 600ppm에서 10% 설사 나타났다. 항생제를 첨가한 사료를 급여한 군에서는 설사증상은 관찰되지 않았다. 접종 2주 후부터 설사증상을 관찰할 수가 없었다. 접종 3주까지 폐사는 전혀 나타나지 않았다. 폐사가 나타나지 않았으나 감자단백을 첨가한 사료의 비율을 따라서 설사증상은 감소되는 것으로 나타났다.

따라서 본 연구의 결과 감자단백은 예방적인 효과가 있는 것으로 나타났고 경도의 감염시 효과적일 것으로 추측된다.

Table 76. Effects of potato peptide on clinical sign and mortality of broiler after oral *Salmonella Gallinarum* challenge

	Antibiotic	Control	Refined potato Protein, ppm		
			200	400	600
Clinical sign (degree)	0/10	10/10	6/10	3/10	1/10
Dead/Total (Mortality)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

제 2 절 제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식

<1차년도> 감자유전자원 특성분석평가 및 선발

- 항생작용 있는 감자 유전자원 확보 및 평가
- 항생작용 물질을 함유한 감자재배 특성 분석 및 선발

1. 다양한 벨리 품종 및 계통의 포장시험을 통한 선발



2. 육성된 실험 품종 특성 조사표

강원대학교 육성 유망 대상으로 UPOV의 특성조사항목에 의거하여 괴경에 대한 특성조사를 실시하였다.

선별된 감자품종의 특성평가

- 품종의 명칭 : 고구밸리 (Gogu valley)
- 특성 조사 년도 : 2005년
- 특성 조사 장소 : 대관령 지역
- 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 수미
- 병해충 및 생리장해에 대한 저항성 : 더듬이 병 (창가병)에 대한 저항성이 높으며 지역에 따라서 약간의 차이는 있지만 기존 품종 중 강한 것으로 알려진 수미 정도나 수미와 비슷한 저항성을 지닌다. 역병 및 바이러스병에 대한 저항성도 수미 보다 높은 경향을 보여 주었다. 중심공동 및 내부갈색반점 같은 생리적 장해 현상이 거의 발견되지 않았다 (Figure 1).



Figure 1. 고구밸리

Table 77. 항균성 감자품종 고구벨리와 대조품종 수미와의 특성평가표

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
1	감자썩 : 크기			작다		중간		크다			3	3	5	7.5
2	감자썩 : 모양	둥근형	계란형	원추형	넓은원통	좁은원통					5		3	
3	감자썩 : 기부의 안토시아닌 색깔	적보라	청보라								1		1	
4	감자썩 : 기부의 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	5		5	
5	감자썩 : 기부의 털	매우적다		적다		중간		많다		매우많다	3		3	
6	감자썩 : 정단부크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	3	0.5	5	0.8
7	감자썩 : 정단부습성			달혀있다		중간		열려있다			3		5	
8	감자썩 : 정단부의 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다			1		5	
9	감자썩 : 정단부의 털	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다	1		3	
10	감자썩 : 뿌리원기의 수			적다		중간		많다			3		5	

(Table 77. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
11	감자싹 : 숨구멍의 돌출성			약 하다		중 간		심 하다			5		5	
12	감자싹 : 측지 길이			짧 다		중 간		길 다					5	4.6
13	식물체 : 키	매 우 작 다		작 다		중 간		크 다		매 우 크 다	3	50	6	72
14	식물체 : 형태	열 려 있 다	중 간	닫 혀 있 다							1		2	
15	식물체 : 성장습성			직 립		반 직 립		개 장			3		5	
16	줄기 : 주지의 굵기			가 늘 다		중 간		굵 다			5	18	5	15
16.1	줄기 : 날개	없 다							있 다		1		9	
16.2	줄기 : 날개주름의 물결모양	없 다							있 다		9		9	
17	줄기 : 안토시아닌 착색정도	없 거 나 매 우 연 하 다		연 하 다		중 간		진 하 다		매 우 진 하 다	7		3	

(Table 77. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
18	앞 : 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	5	35/24	5	
19	앞 : 겹침정도			겹쳐있다		중간		열려있다			7		5	
20	앞 : 녹색의 정도			연하다		중간		진하다			7		5	
21	앞 : 주맥의 안토시아닌 퍼진정도	없거나 매우연하다		연하다		중간		심하다		매우심하다	7		1	
22	소엽: 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	5	10.7	5	10.5
23	소엽: 너비			좁다		중간		넓다			5	6.7	5	6.5
24	소엽: 병합의 빈도			낮다		중간		높다			3		5	
25	소엽 : 가장자리 물결 모양	없거나 매우약하다		약하다		중간		심하다		매우심하다	3		7	
26	소엽 : 엽맥의 깊이			얕다		중간		깊다			5		5	
27	소엽 : 정부에 있는어린엽신의 안토시아닌의 착색유무	없다								있다	9		1	

(Table 77. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
28	소엽 : 윗부분의 광택의 정도			적다		중간		많다			3		3	
29	잎 : 2차소엽의 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	7	12	5	
30	정단소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	3		5	
31	측소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	5	6	5	
32	측소엽 : 2차소엽의 크기			작다		중간		크다			9	10/4.5	5	7.6/5.5
33	화서 : 크기			작다		중간		크다			5	11	5	
34	화서 : 안토시아닌 착색정도	없거나 매우연함		연하다		중간		진하다		매우진하다	3		1	

(Table 77. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
35	식물체 : 꽃의 수	없거나 매우 적다		적다		중간		많다		매우 많다	5	9	3	
36	꽃 : 꽃눈의 안토시아닌	없거나 매우 연함		연하다		중간		진하다		매우 진하다			3	
37	화관 : 크기	매우 작다		작다		중간		크다		매우 크다	7	2.4	7	
38	화관 : 안쪽부분의 색깔	백색	적보라	청보라							3		3	
39	화관 : 꽃 안쪽부분의 색깔정도	매우 연함		연하다		중간		진하다		매우 진함	7		3	
40	화관 : 흰꽃 바깥부분의 안토시아닌	없다								있다			1	
41	화관 : 흰색 끝부분의 크기			작다		중간		크다					3	
42	식물체 : 열매의 수	없거나 매우 적다		적다		중간		많다		매우 많다			1	
43	식물체 : 성숙시기	매우 빠름		빠르다		중간		늦다		매우 늦다	5		3	

(Table 77. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치	
44	괴경 : 모양	둥근형	짧은계란	계란형	긴계란	긴형	매우긴형					5	12/5	2	8/7
45	괴경 : 눈의 깊이	매우얕다		얕다		중간		깊다		매우깊다		5		7	
46	괴경 : 표피의 매끄러운 정도			매끄럽다		중간		거칠다				3		5	
47	괴경 : 표피의 색깔	황색	적색	자색	부분적색	부분자색						2		1	
48	괴경 : 눈 기부의 색깔	황색	적색	자색								2		1	
49	괴경 : 육색	백색	유백색	담황색	노랑	농황색	적색	자주색				2		2	
50	노란색 표피 괴경 : 괴경표피 안토시아닌 색소	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다				1	

- 실측치의 단위는 cm임

- 출원품종의 명칭 : 골 든 벨 리(Golden valley)
- 특성 조사 년도 : 2005년
- 특성 조사 장소 : 대관령 지역
- 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 수미
- 병해충 및 생리장애에 대한 저항성 : 더덩이병(창가병)에 대한 저항성이 수미 정도 또는 이상으로 높았고, 중심공동과 내부갈색반점에 대한 저항성도 높았다(Figure 2).



Figure 2. 골든벨리

Table 78. 항균성 감자 골든벨리와 대조품종의 특성 평가표

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
1	감자싹 : 크기			작다		중간		크다			3	4	5	7.5
2	감자싹 : 모양	둥근형	계란형	원추형	넓은원통	좁은원통					4		3	
3	감자싹 : 기부의 안토시아닌 색깔	적보라	청보라								2		1	
4	감자싹 : 기부의 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	3		5	
5	감자싹 : 기부의 털	매우적다		적다		중간		많다		매우많다	5		3	
6	감자싹 : 정단부크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	5	0.8	5	0.8
7	감자싹 : 정단부습성			달혀있다		중간		열려있다					5	
8	감자싹 : 정단부의 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다			1		5	
9	감자싹 : 정단부의 털	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다	3		3	
10	감자싹 : 뿌리원기의 수			적다		중간		많다			3		5	

(Table 78. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
11	감자썩 : 숨구멍의 돌출성			약 하다		중 간		심 하다			5		5	
12	감자썩 : 측지 길이			짧 다		중 간		길 다			3		6	4.6
13	식물체 : 키	매 우 작 다		작 다		중 간		크 다		매 우 크 다	5	66	6	72
14	식물체 : 형태	열 려 있 다	중 간	달 혀 있 다							1		2	
15	식물체 : 생장습성			직 립		반 직 립		개 장			5		5	
16	줄기 : 주지의 굵기			가 늘 다		중 간		굵 다			3	13.4	5	15
16.1	줄기 : 날개	없 다								있 다	9		9	
16.2	줄기 : 날개주름의 물결모양	없 다								있 다	1		9	
17	줄기 : 안토시아닌 착색정도	없 거나 매 우 연 하 다		연 하 다		중 간		진 하 다		매 우 진 하 다	5		3	
18	잎 : 크기	매 우 작 다		작 다		중 간		크 다		매 우 크 다	5	34/23	5	
19	잎 : 겹침정도			겹 쳐 있 다		중 간		열 려 있 다			7		5	
20	잎 : 녹색의 정도			연 하 다		중 간		진 하 다			5		5	

(Table 78. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
21	앞 : 주맥의 안토시아닌 퍼진정도	없거나 매우연하다		연하다		중간		심하다		매우심하다	3		1	
22	소엽: 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	5	10	5	10.5
23	소엽: 너비			좁다		중간		넓다			5	6.5	5	6.5
24	소엽: 병합의 빈도			낮다		중간		높다			1		5	
25	소엽 : 가장자리 물결 모양	없거나 매우약하다		약하다		중간		심하다		매우심하다	3		7	
26	소엽 : 엽맥의 깊이			얕다		중간		깊다			5		5	
27	소엽 : 정부에 있는어린엽신의 안토시아닌의 착색유무	없다								있다	9		1	
28	소엽 : 윗부분의 광택의 정도			적다		중간		많다			5		3	
29	앞 : 2차소엽의 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	5	13	5	11

(Table 78. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
30	정단소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	5		5	
31	측소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다	5	6	5	6
32	측소엽 : 2차소엽의 크기			작다		중간		크다			7	8.5/5.5	5	7.6/4.5
33	화서 : 크기			작다		중간		크다			5	11	5	8
34	화서 : 안토시아닌 착색정도	없거나 매우연함		연하다		중간		진하다		매우진하다	5		1	
35	식물체 : 꽃의 수	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다	5	14	3	
36	꽃 : 꽃눈의 안토시아닌	없거나 매우연함		연하다		중간		진하다		매우진하다			3	
37	화관 : 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다	3	1.4	7	1.2

(Table 78. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
38	화관 : 안쪽부분의 색깔	백색	적보라	청보라							3		3	
39	화관 : 꽃 안쪽부분의 색깔정도	매우연함		연하다		중간		진하다		매우진함	7		3	
40	화관 : 흰꽃 바깥부분의 안토시아닌	없다								있다			1	
41	화관 : 흰색 끝부분의 크기			작다		중간		크다					3	
42	식물체 : 열매의 수	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다			1	
43	식물체 : 성숙시기	매우빠름		빠르다		중간		늦다		매우늦다	3		3	
44	괴경 : 모양	둥근형	짧은계란	계란형	긴계란	긴형	매우긴형				3	9/7	2	8/7
45	괴경 : 눈의 깊이	매우얕다		얕다		중간		깊다		매우깊다	5		7	
46	괴경 : 표피의 매끄러운 정도			매끄럽다		중간		거칠다			3		5	
47	괴경 : 표피의 색깔	황색	적색	자색	부분적색	부분자색					1		1	
48	괴경 : 눈 기부의 색깔	황색	적색	자색							2		1	

(Table 78. 계속)

No.	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실 측 치	No.	실 측 치
49	괴경 : 육색	백색	유백색	담황색	노랑	농황색	적색	자주색			4		2	
50	노란색 표피 괴경 : 괴경표피 안토시아닌 색소	없거나 매우 연하다		연하다		중간		진하다		매우 진하다	1		1	

-실측치 단위는 cm임

<2차년도> 유망 감자유전자원 대량생산체계 확립 및 육성

○ 다양한 유전자원으로부터 우수 감자 품종 및 계통스크리닝

한국 감자 육종 소개은행에서 보유하고 있는 벨리계통 감자의 향미생물 활성을 측정하였고, 또한 고바야시(Kobayashi, et al. Biosci. Biotech. Biochem., 58: 133-134, 1994)등의 방법에 따라 조사하며 현미경으로 포자발아가 저해되는 활성을 측정하거나 세균의 현탁도를 기준으로 세균 성장저해 활성을 측정하여, 지속적인 유전자원의 평가 및 향균성 계통 육성.

본 연구팀이 개발한 감자계통/품종



품종명	기능성(μ l) 항산화활성 (RC50)	당도mg/100g (sucrose, radical sugar)	환원당함량mg/100g (glucose, fructose)	용도	비중	맛
고구 밸리	125	130.8	95.8	프렌치 프라이 식 용	1.067	아주 좋음
쥬스 밸리	92	104.9	71.8	생 즈 용 식 용	1.065	아주 좋음
피플 밸리	110	92.9	31.9	식 용	1.062	보 통
골든 밸리	100	117.3	117.3	식 용	1.045	아주 좋음
보라 밸리	74	138.3	26	샐 러 드 칩 용	1.077	중 음
얼리 밸리	82	109.9	44.1	식 용 칩 용	1.055	아주 좋음
쌈머 밸리	120	94	94	식 용	1.058	중 음
알칩 밸리	70	62.6	30.5	칩 용	1.072	아주 좋음
강심 밸리	100	38.2	15.1	칩 용 식 용	1.063	중 음
태동 밸리	230	67.9	22.8	칩 용 식 용	1.081	중 음
윈터 밸리	110	57.9	33.4	식 용	1.076	중 음
수미 (대조품중)	92	115.6	61.2	식 용	1.066	중 음

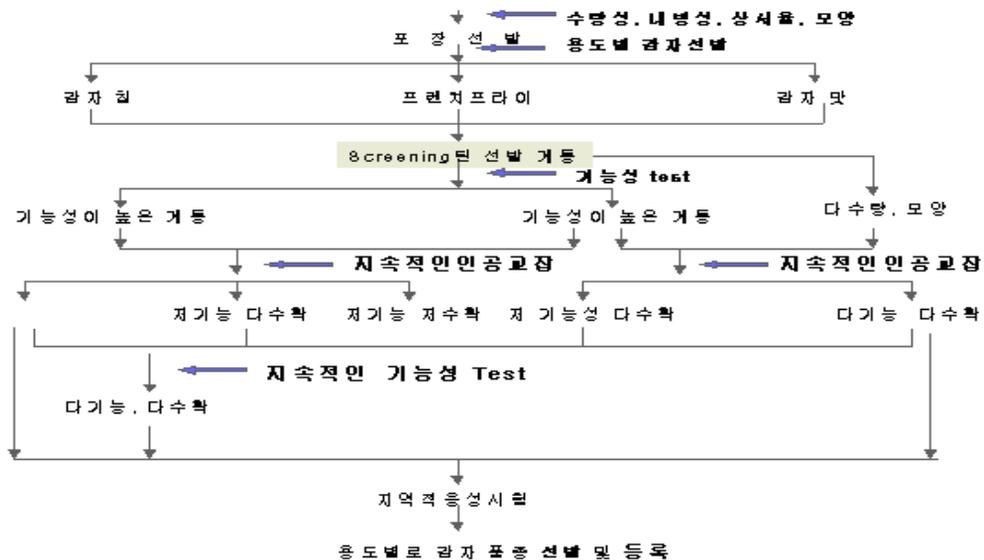
○ 유망 계통의 재배적 특성변화 검정 및 분석

확인된 항균성 감자유전 자원의 김제, 제주, 대관령, 춘천에서 재배하여 지역간 수량 성 및 생육특성 등을 조사하여 재배적응성 검토를 통한 포장 특성조사를 하여 지역 에서 나타나는 특수성을 찾아 지역에 맞는 항균성 감자 품종을 선발·보급한다.

지역적응성 검정 (김제,대관령,제주,춘천)



(기능성 품종 육성 모식도)



○ 선발된 감자 계통 및 품종의 기내도입 및 증식

생장점 배양으로 기내로 도입한 감자 무병주를 계대배양을 통해 유지·대량 증식한다. 그 순화를 통해 바이러스에 free한 식물체를 필드로 도입. (효율적인 씨감자 생산기술 확립)



○ 우수 감자품종 및 계통의 대량생산체계 확립

항균성 물질 함유량이 높은 감자 품종이 선발되면 기내에서 조직배양을 통해 대량 증식한 후 기내에서 대량 증식된 조직배양묘를 순화시켜 대량 생산을 위하여 겨울하우스와 망실에 재배하여 바이러스에 감염되지 않은 괴경을 얻어내어 대량 증식시킨다.



○ 감자의 무병주 대량증식 및 씨감자 대량생산과 상품화

선발된 항균성 감자중 우수 계통의 품종 출원 및 특허 출원하였고 (주)포테이토밸리를 통해 판매를 위한 활발한 마케팅 및 대량 생산을 하였다.

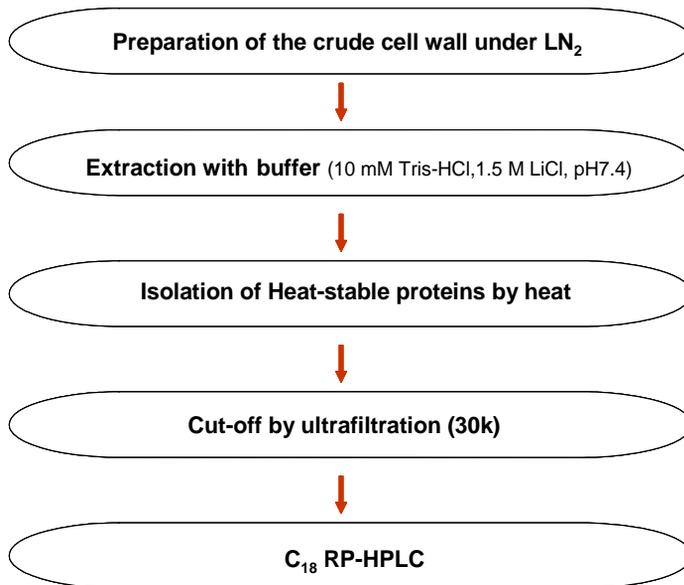
제 3 절 협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성화 조사(천연항균물질 탐색)

<1차년도> 신품종 감자의 괴경, 잎 및 줄기를 이용한 병원성 미생물에 대한 항생 작용 탐색

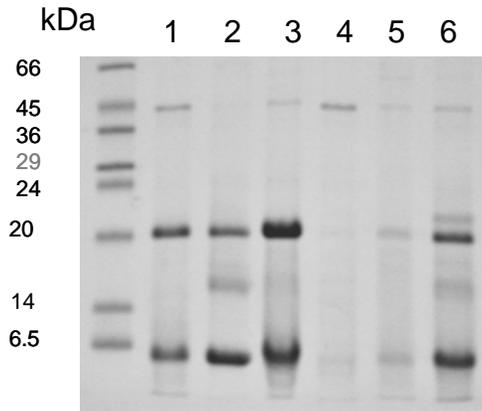
○ 감자의 괴경, 잎 및 줄기로부터 단백질 추출 및 분리

(1) 단백질의 추출 과정

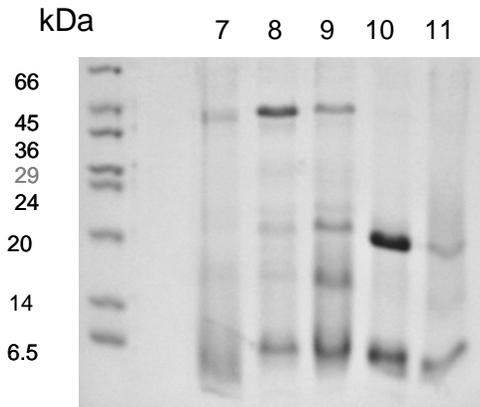
Purification procedures



(2) 각종 신품종 감자로부터 추출한 단백질의 전기영동 사진



1. 태복
2. 씬머
3. 알칩
4. 얼리
5. 윈터
6. 골든
7. 고구
8. 쥬스
9. 퍼플
10. 보라



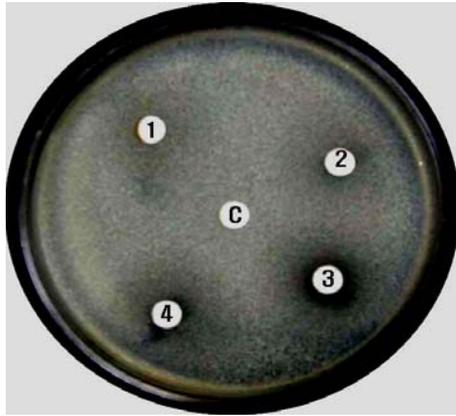
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of extracted protien(20 μ g)

○ 1차 천연 항생제 작용 검색

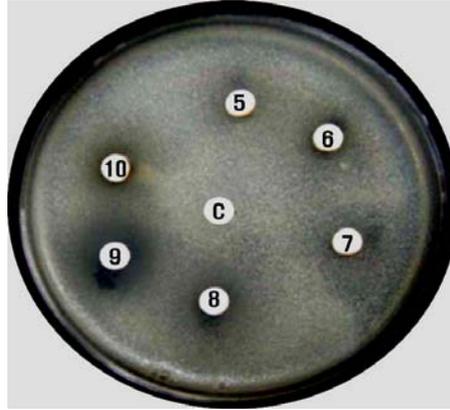
(1) 30여종의 감자로부터 단백질 추출 및 1차 항균 작용 검색

30여종 감자의 괴경, 잎 및 줄기로부터 total 단백질을 추출하였고, 이 추출물을 원심분리 후, 상층액만을 모아 투석(Dialysis)을 시행하였다. 단백질의 항균활성측정을 위해 *E. coli* O157과 *S. aureus*를 사용하여 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)를 결정하였다. 그리고 병원성 진균인 *C. albicans*와 *T. beigeli*를 사용하여 항진균 활성을 측정하여 30여종의 신품종 감자 중 고구벨리와 골든벨리를 선별하였다.

A



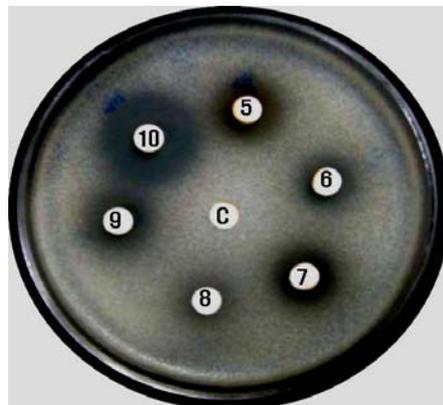
B



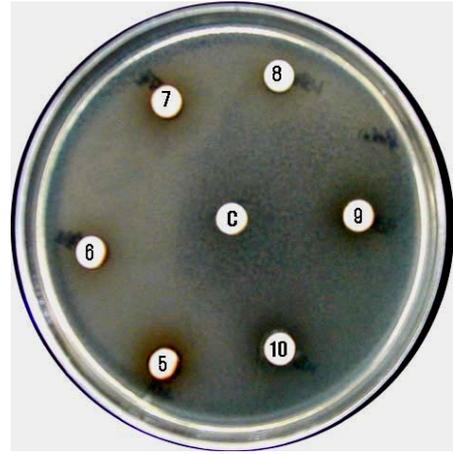
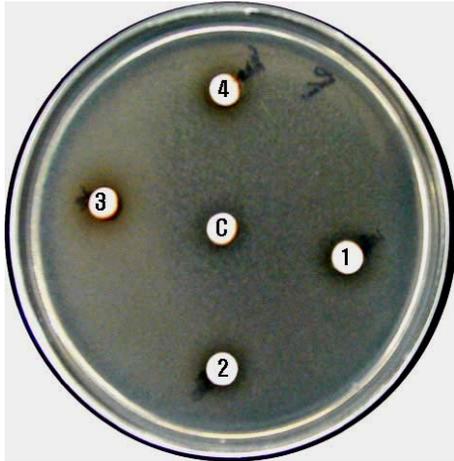
C



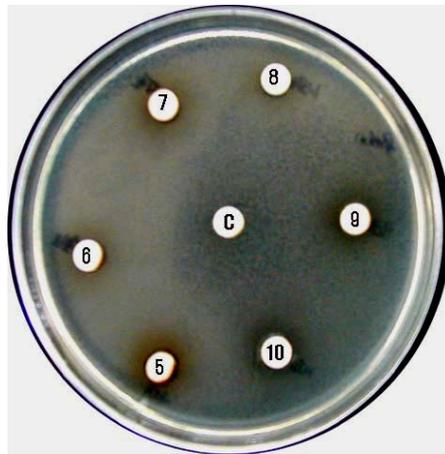
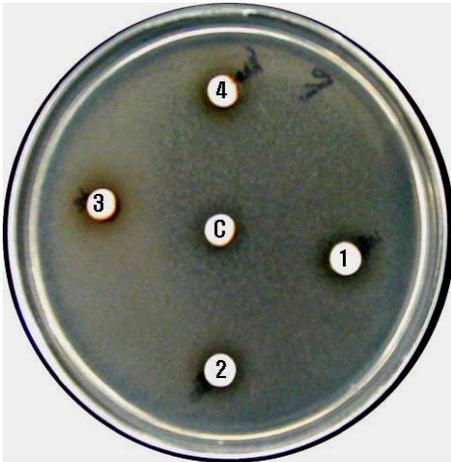
D



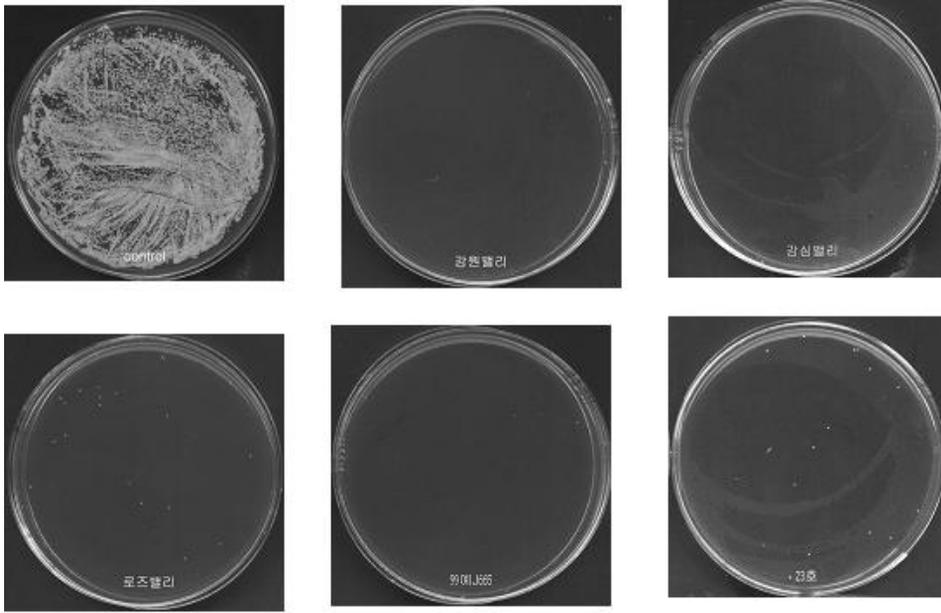
Antifungal Assay with *Candida albicans*. A: Protein (50 μ g); ①썸머, ②태동, ③고구, ④태복, ⑤퍼플, ⑥쥬스, ⑦윈터, ⑧알칩, ⑨얼리, ⑩보라. B: Protein (100 μ g); ①고구, ②태복, ③썸머, ④보라, ⑤퍼플, ⑥쥬스, ⑦윈터, ⑧알칩, ⑨얼리, ⑩태동



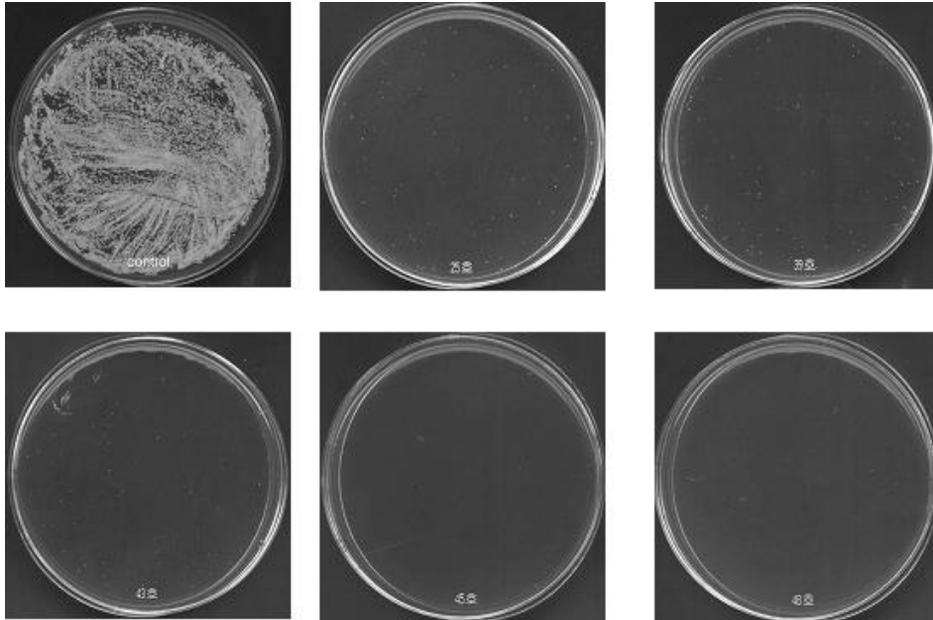
Antibacterial Assay with *Staphylococcus aureus*. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 1. 씬머, 2. 태동, 3. 고구, 4. 태복, 5. 보라, 6. 퍼플, 7. 쥬스, 8. 윈터, 9. 알칩, 10. 얼리



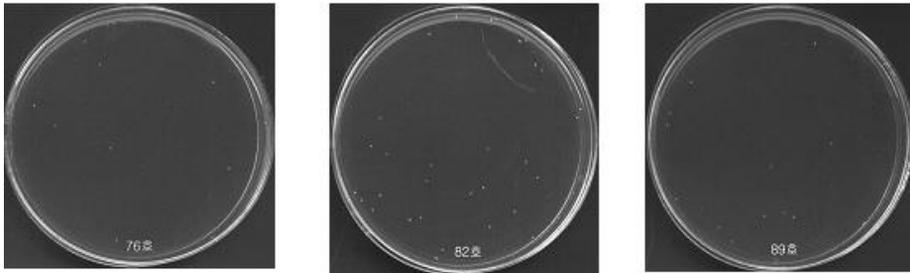
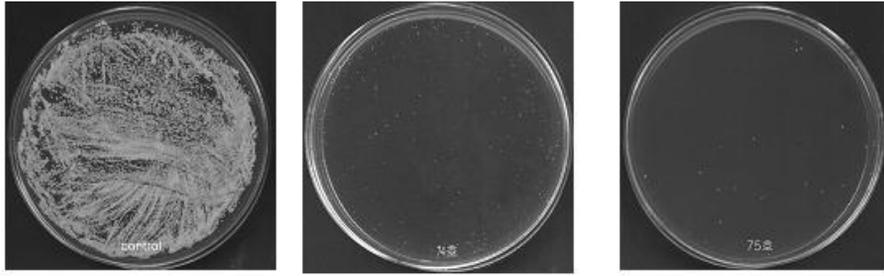
Antibacterial Assay with *Escherichia coli* O157. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 1. 씬머, 2. 태동, 3. 고구, 4. 태복, 5. 보라, 6. 퍼플, 7. 쥬스, 8. 윈터, 9. 알칩, 10. 얼리



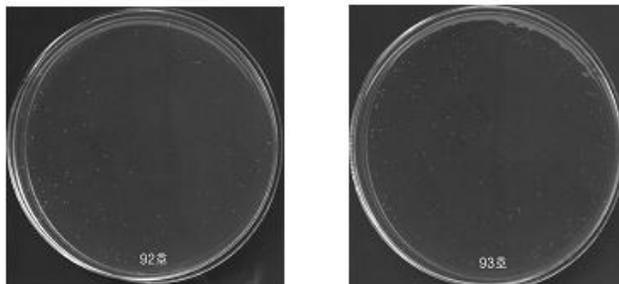
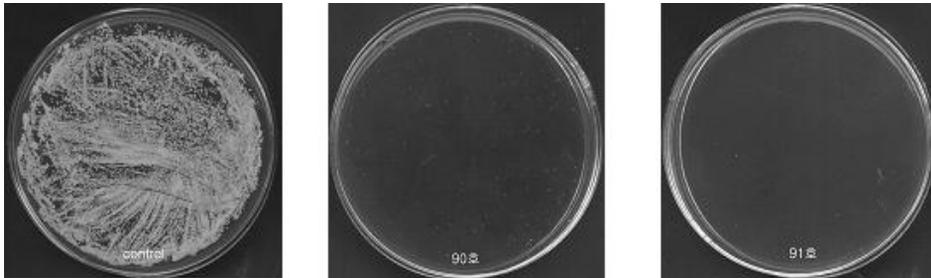
Antifungal Assay with *C. albicans*. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 강원밸리, 강심밸리, 로즈밸리, 99예J665, 23호



Antifungal Assay with *C. albicans*. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 25호, 39호, 43호, 45호, 48호.



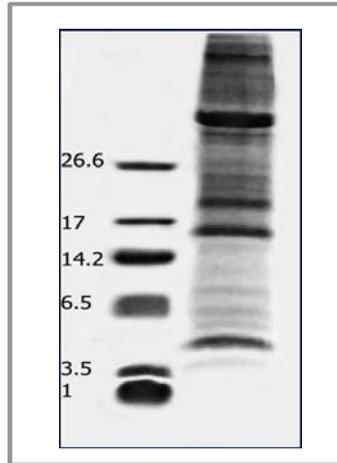
Antifungal Assay with *C. albicans*. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 74호, 75호, 76호, 82호, 89호.



Antifungal Assay with *C. albicans*. C. 비교군(단백질을 처리하지 않은 sample), 90호, 91호, 92호, 93호.

- 항생제 기능성 단백질을 함유한 감자인 고구벨리와 골든벨리로부터 crude 단백질(펩타이드)의 분리

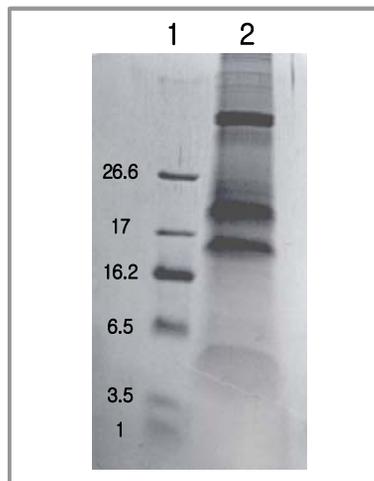
(1) 고구벨리 crude 단백질 전기영동 사진



SDS-PAGE of extracted proteins from potato.

Lane1: molecular weight marker, Lane2: extracted proteins from potato

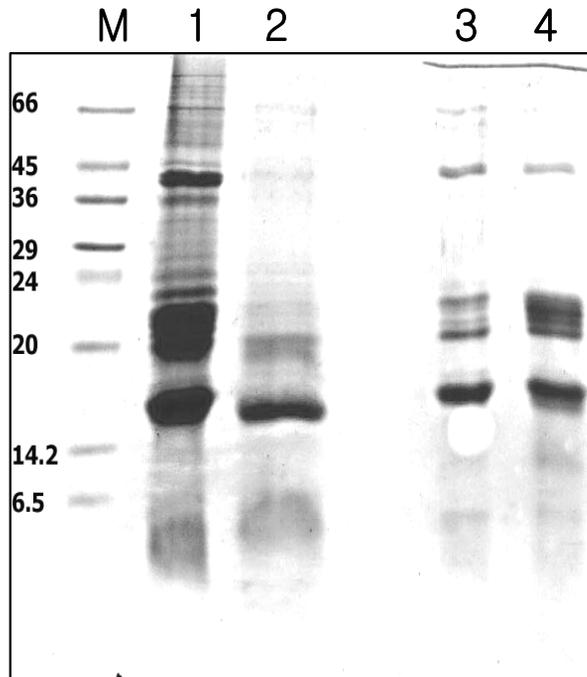
(2) 고구벨리 crude 단백질의 열처리 후 전기영동 사진



SDS-PAGE of supernatants obtained from heat treatment at 70 °C for 20 min.

Lane1: molecular weight marker, Lane2: heat-stable proteins.

(3) 골든벨리 crude 단백질의 전기영동(A)과 열처리 후 단백질 전기영동 사진



1,2 : Extraction with buffer [No Heat(1), Heat(2)]

3,4 : Extraction with 1.5M LiCl [No Heat(3), Heat(4)]

<2차년도> 신품종 감자를 이용한 항균활성 단백질의 대량분리 및 가축 병원성 박테리아 및 진균에서 항생활성작용 검색

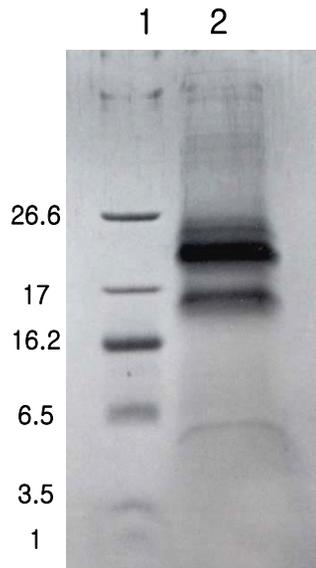
고구(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)는 단백질 분리용 buffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH7.5)에서 가볍게 단백질을 행귀준 후, 1.5M LiCl를 이용하여 단백질을 분리하였다. 그 후 단백질의 크기별로 10,000, 3,000-10,000 그리고 3,000kDa 이하로 나누어 위에서 언급한 세균과 진균으로 항균 활성을 측정하였으며, 활성이 가장 높은 부위를 C₁₈ RP-HPLC를 이용하여 단백질(펩타이드)을 정제하였다. C₁₈ RP-HPLC로부터 정제된 각각의 peak를 모아서 항균 활성을 다시 측정하였다.

그로부터 활성이 있는 peak를 찾을 수 있었고, 고구(*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley)로부터 분리한 단백질(펩타이드)을 "Potamin-1"과 "Potamin-2"로 명명하였다.

고구벨리로부터 분리된 펩타이드 Potamin-1와 Potamin-2는 농작물과 식중독에서 유해한 세균 및 곰팡이에서 강한 항생제 활성을 나타냈으며, 특히 Potamin-1의 경우 아미노산 서열 분석을 통하여 단백질분해효소 저해 작용을 갖음으로써 항생제 기능을 나타냄을 짐작할 수 있었고 이를 증명하기 위하여 단백질 분해효소인 trypsin, chymotrypsin과 함께 Potamin-1을 작용시킴으로써 단백질분해효소를 100% 저해함을 확인함으로써 항생제 기능을 나타냄을 확인하였다.

○ 사료 실험을 위한 refined 단백질(고구벨리)의 대량 분리

(1) Amicon을 이용하여 30 kD이상의 단백질을 분리

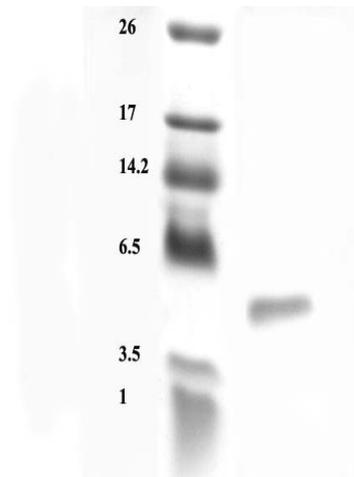


Tricine PAGE of ultrafiltrated proteins.

Lane1: molecular weight marker, Lane2: proteins with <30KD

○ Amicon을 이용한 단백질(펩타이드)의 크기별 절단

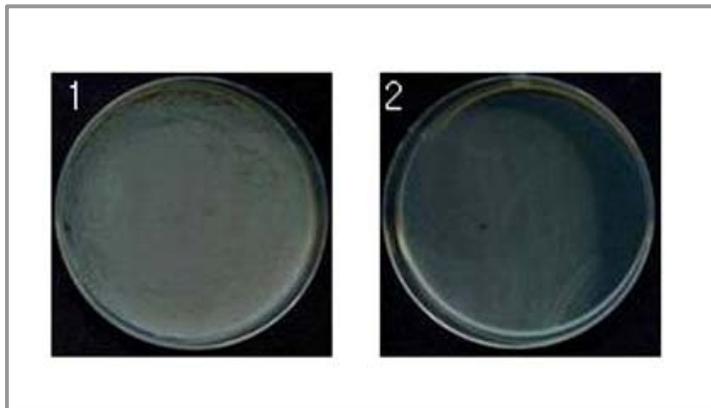
Amicon을 이용하여 30 kD 이하의 단백질을 분리



Tricine PAGE of purified PT-1. Lane1: molecular weight marker, Lane2: purified PT-1 (20 μ g).

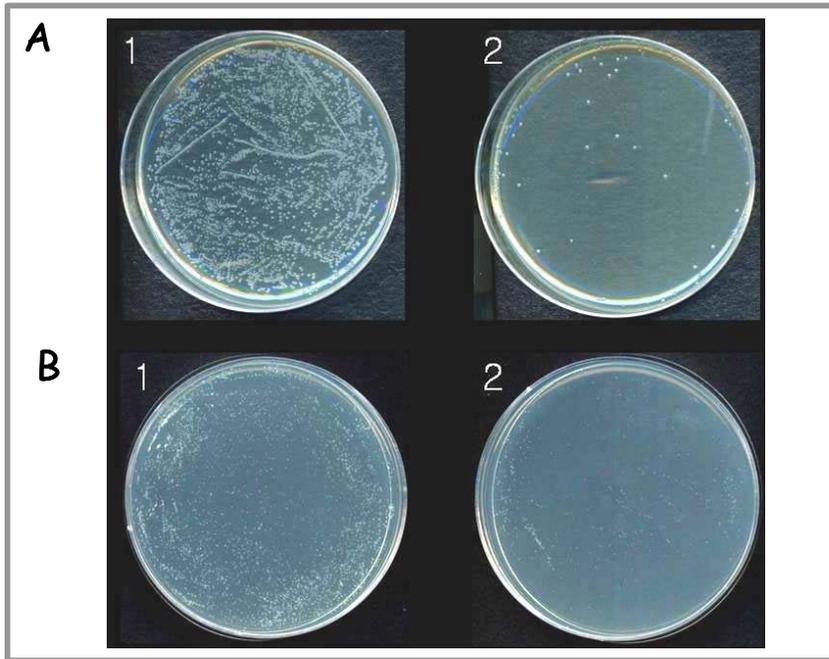
○ 단백질(펩타이드)의 활성부위 1차 탐색

(1) Amicon을 이용하여 30 kD이상의 단백질을 항생제 기능 실험 수행
(항균활성 실험 수행)



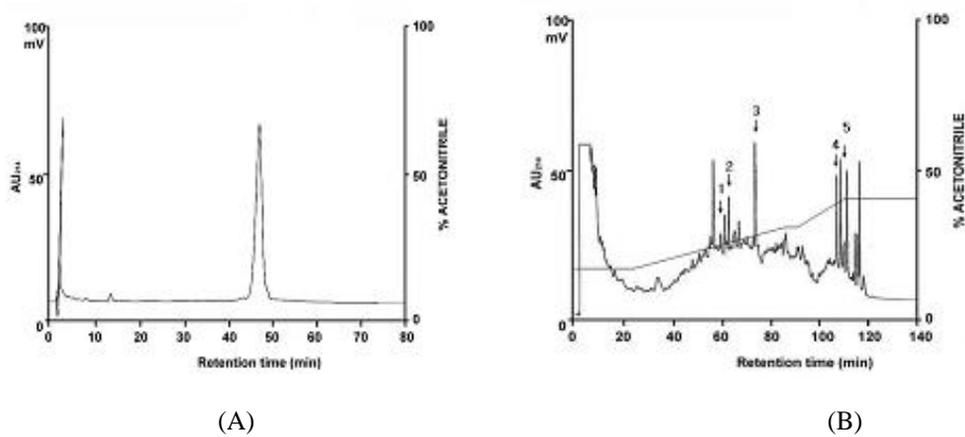
Antimicrobial assay against *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* of ultrafiltrated proteins.
1; untreated cell 2; treated cell (100 μ g).

(2) Amicon을 이용하여 30 kD 이하의 단백질을 항생제 기능 실험 수행
(항균 및 항진균활성 실험)



Antimicrobial assay of PT-1 against bacterial and fungal strains. Panel A: *Clavibacter michiganense* subsp. *Michiganense*, 1; untreated, 2; PT-1 (50 μM), Panel B: *Candida albicans*, 1; untreated, 2; PT-1 (100 μM).

○ Reverse-Phase HPLC에 의한 refined 단백질(고구벨리)의 분리



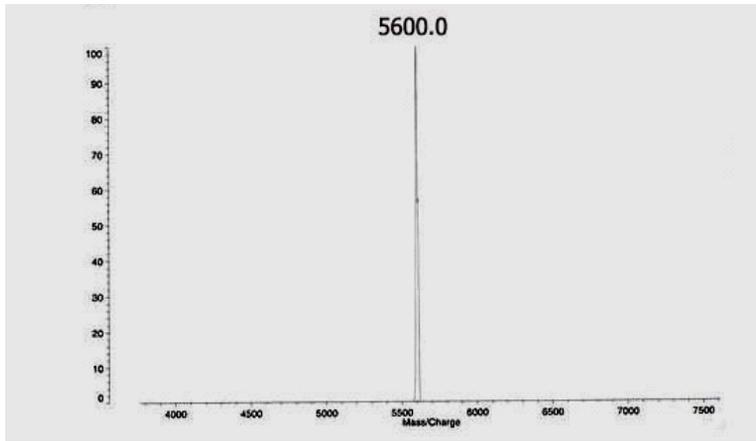
Elution profile of PT-1. (A) The fraction containing the major retained peak was separated by reversed-phase HPLC using a C18 column. (B) The purified antimicrobial peptide was then subjected again to C18 reversed-phase HPLC. In (A) and (B), the peptides were eluted using a gradient of solvent B (acetonitrile with 0.1% TFA) in solvent A as follows: 0 to 25 min, 15% solvent B; 25 to 85 min, 30% solvent B; 85 to 90 min, 30% solvent B; 90 to 110 min, 40% solvent B; and 110 to 120 min, 40% solvent B. The effluent from the column was monitored by measuring the absorbance at 214 nm.

○ 단백질(펩타이드) 서열분석



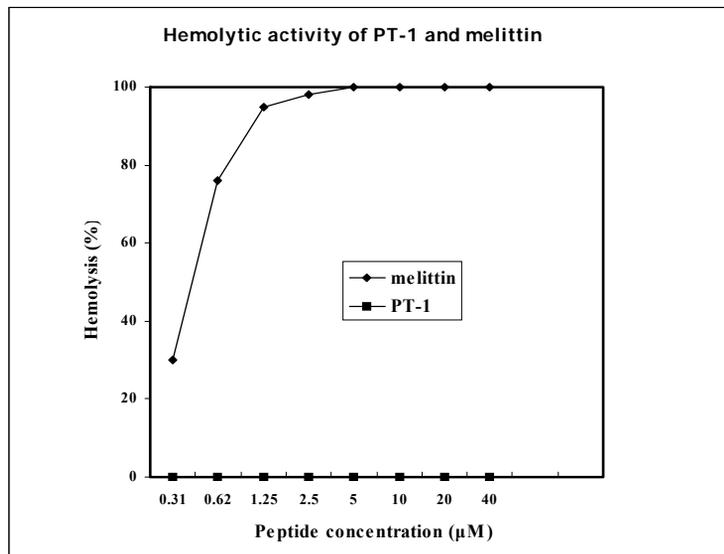
N-terminal amino acid sequence of PT-1. Amino acids identical to those of the protease inhibitor *Solanum melongena* are indicated by boxes.

○ 항생제 활성 단백질의 분자량 확인



MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry) determination of PT-1.

○ 세포독성에 대한 검사



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 제1세부과제: 천연항균 펩타이드(peptide)를 이용한 항생제 대체 사료 개발

구분	연구개발 목표	달성내용	달성도 (%)
1차년도 (2005)	항균 peptide를 함유한 감자단백의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치평가	○ 자돈에서 항균펩타이드가 포함된 감자단백(고구벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하고 성장을 촉진하며 적정첨가수준은 0.75%보다 조금 높은 것으로 검증되었다.	100
		○ 육계에서 항균펩타이드가 포함된 감자단백(고구벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하고 성장을 촉진하며 적정첨가수준은 0.75%보다 조금 높은 것으로 검증되었다.	100
		○ 자돈에서 항균펩타이드가 포함된 감자단백(골든벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하고 사료요구율을 개선하며 적정첨가수준은 0.75%보다 조금 높은 것으로 검증되었다.	100
		○ 육계에서 항균펩타이드가 포함된 감자단백(골든벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하고 성장촉진효과는 나타나지 않았지만 급여수준이 높을수록 성장개선경향은 나타났다.	100

2차년도 (2006)	<p>검증된 항균 펩타이드를 함유한 정제감자단백(고구벨리)의 적정첨가수준과 항생제 사료와의 비교를 통한 영양학적 가치를 평가하고 challenge study를 통한 면역반응조사</p>	<p>○ 자돈에서 항균펩타이드가 포함된 정제감자단백(고구벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하고 생산성을 촉진하였으며 항생제의 효과와는 차이를 나타냈으나 높은 수준에서는 더 좋은 성적을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.</p>	100
		<p>○ 육계에서 항균펩타이드가 포함된 정제감자단백(고구벨리)의 급여는 미생물의 성장을 억제하였으며 항생제의 효과와는 차이를 나타냈으나 높은 수준에서는 더 좋은 성적을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.</p>	100
		<p>○ 정제감자단백을 자돈에게 급여하면 병원성 미생물의 감염에 예방적인 효과가 있는 것으로 나타났고 경도의 감염시 효과적일 것으로 추측된다.</p>	100
		<p>○ 정제감자단백을 육계에게 급여하면 병원성 미생물의 감염에 예방적인 효과가 있는 것으로 나타났고 경도의 감염시 효과적일 것으로 추측된다.</p>	100

2. 제2세부과제: 항생제대체 사료용 감자선발 및 증식

○ 감자유전자원 특성분석평가 및 선발

본연구실은 이러한 감자가 가진 항균적·항암적 역할을 증대시킬 수 있는 신품종 감자를 육종소재은행을 통해 보유한 다양한 품종을 이용하여 개발 중이다. 감자에서의 생리활성 물질을 탐색 하고 분석하고 스크린하여 감자 육종소재은행 중에서 생리활성이 높은 감자계통을 찾는 것은 기능성 감자 육종에 있어서 특히 친본의 선정에 있어서 아주 중요한 일이다. 한국 육종소재은행에서는 매년마다 3만여 립의 감자를 과종하고 매년마다 20%씩 3년간 실생선발을 거친 후 예비검정과 본 검정 단계에 들어간다. 이렇게 선발된 계통은 생산성이 뛰어나고 저항성이 강한 등 농업적 형질을 가지고 있으며 또한 이러한 계통들에 대하여 기능성을 검정하여 기능성 친본 을 선정한다. 교잡육종은 농업형질이 뛰어난 계통과 기능성이 높은 계통사이 혹은 서로 다른 기능성 물질을 함유하고 있는 계통들 사이에서 진행하여 다양한 기능성을 지닌 고품질의 감자품종 육성을 동시에 시도하고 있다.

○ 유망 감자유전자원 대량생산체계 확립 및 육성

생장점 배양으로 기내로 도입한 감자 무병주를 계대배양을 통해 유지·대량 증식한 다 음, 순화, 기내소괴경, 경삽목, 양액재배를 통해 대량의 MT(mini tuber, 소괴경)을 획득 하였 고, 획득한 소괴경은 망실재배로 들어가서 대량의 보급종으로 생산을 하였다. 마케팅 및 판매는 씨감자 회사인 (주)포테이토밸리를 통해서 이루어지고 있다.

3. 협동연구과제: 감자에서 천연항균제의 탐색 및 활성조사(천연항균물질 탐색)

구분	연구개발 목표	달성내용	달성도 (%)
1차년도 (2005)	신품종 감자의 괴경, 잎 및 줄 기를 이용한 병 원성 미생물에 대한 항생 작용 탐색	1) 감자의 괴경, 잎 및 줄기로부터 단백질 추출, 및 분리: 강원대학교와 (주)포테이토밸리로부터 30여종의 신품종 감자를 받아 이들 감자의 괴경을 이용하여 전체 단백질(Total protein)을 추출하였으며, 이들의 항생제 기능 여부를 확인하기 위하여 1차적으로 세균과 곰팡이에 대해 활성 정도를 검사하였다.	100
		2) 1차 천연 항생제 작용 검색: 감자의 괴경으로부터 항균 활성을 갖는 단백질(펩타이드)을 함유하는 신 품종 감자 중 고구밸리와 골든밸리가 강력한 항생제 단백질(펩타이드)임을 확인하였다.	100
		3) 항생제 기능성 단백질을 함유한 감자인 고구밸리와 골든밸리로부터 crude 단백질(펩타이드)의 분리: 고구밸리와 골든밸리 감자로부터 물추출법을 이용 하여 대량의 crude 단백질을 분리하였다.	100
2차년도 (2006)	신품종 감자를 이용한 항균활 성 단백질의 대 량분리 및 가축 병원성 박테리 아 및 진균에서 항생 활성 작용 검색	○ 사료 실험을 위한 refined 단백질(고구밸리)의 대량 분리	100
		○ Amicon을 이용한 단백질(펩타이드)의 크기별 절단 및 단백질 전기영동: 항균 활성 부위를 갖는 단백질 (펩타이드)을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였 고 활성 단백질의 분자량을 가식화 하였다.	100
		○ 단백질(펩타이드)의 활성부위 1차 탐색	100

구 분	연구개발 목표	달성내용	달성도 (%)
2차년도 (2006)	신품종 감자를 이용한 항균활성 단백질의 대량분리 및 가축 병원성 박테리아 및 진균에서 항생활성 작용 검색	○ Reverse-Phase HPLC에 의한 refined 단백질(고구벨리)의 분리	100
		○ 항균활성의 측정: 고구벨리로부터 분리한 단백질(펩타이드)의 항균 활성 측정을 위해 식중독 유발 세균인 <i>E. coli</i> O157과 <i>S. aureus</i> 를 이용하여 항균 활성 여부와 활성 정도를 측정하였고, 반대로 사람에게 유익한 세균인 <i>Lactobacillus</i> 균주에 대해서도 활성이 있는지 측정함으로써 이들 분리한 단백질(펩타이드)이 유익균에 대해서는 작용하지 않음을 확인할 수 있었다.	100
		○ 항진균 활성의 측정: 분리한 단백질(펩타이드)의 항진균 활성 측정을 위해 여성의 질염을 유발하는 진균인 <i>C. albicans</i> , 비듬을 유발 시키는 <i>T. beigelii</i> 등의 진균을 사용하였고, MTT assay의 방법을 이용하여 항진균 활성을 측정한 결과 분리한 단백질(펩타이드, PT-1)이 강한 항진균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.	100
		○ 단백질(펩타이드) 서열분석	100
		○ 항생제 활성 단백질의 분자량 확인	100
		○ 세포독성에 대한 검사: 분리한 단백질(펩타이드)이 세포독성을 갖는지의 여부를 측정하기 위하여 사람의 적혈구 세포만을 분리한 후 Potamin-1, Potamin-2, Potide-J 및 AFP-J를 농도별로 처리하여 사람의 적혈구 세포에서 이들 단백질(펩타이드)이 세포독성을 나타내는지의 여부를 확인한 결과 이들 단백질(펩타이드) 모두가 고농도에서도 전혀 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.	100

제 2 절 관련 산업에의 기여도

생명과학 기술분야 중 고부가가치성 생물소재로서의 기능성 펩타이드가 바이오텍 산업의 새로운 분야로 각광을 받고 있다. 펩타이드는 호르몬, 세포증식, 혈압조절, 신경전달 등의 다양한 생체기능조절 활성을 가지고 있는바, 이를 이용한 기능성 펩타이드 제품의 개발은 세균 (특히 최근 큰 문제가 되고 있는 다중류 약물저항성 박테리아) 및 진균에 대한 항생제, 무공해 방부제, 무공해 식품보전제, 사료첨가제, 항바이러스제 및 항암제 등으로 그 이용 범위가 넓어 향후 세계적으로 대단히 큰 시장을 형성할 것으로 예상된다. 이와 같은 이유로 최근 펩타이드와 관련된 벤처창업이 증가하고 있으며 세계 굴지의 생명공학 회사들이 바이오텍기술을 이용한 기능성 펩타이드의 연구·개발에 관심을 기울이고 있다. 이에 본 연구과제에서는 산업, 경제적으로 큰 부가가치를 창출할 수 있는 항생제 기능성 펩타이드를 생산하는 신제품 감자를 선별하여 단백질생화학의 집중연구를 수행하고 펩타이드공학 기술의 노하우를 축적함으로써 펩타이드 공학의 발전에 세계 시장을 겨냥한 신기능성 펩타이드 제제를 개발하여 국가경제 및 산업발전에 기여하리라 여겨진다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 타연구에의 응용

- 펩타이드 분리, 정제 및 구조 분석기술의 발달
- 펩타이드성 항생제 및 항암제의 개발
- 기존 항생제에 내성이 있는 세균을 치료할 수 있는 항균제 개발
- 항바이러스 제재 연구에 대한 기반기술 개발
- 각종 병원균에 의한 농산물의 오염을 방지하는 펩타이드성 농약의 개발
- 기존 항생제에 내성을 갖는 가축병에 대한 항생제 기능성 사료 개발
- 펩타이드 이용기술을 통한 미래의 항균제, 식품보전제, 화장품첨가제 개발
- 펩타이드 설계, 합성 및 이와 연관되는 기술을 통한 생명공학 기술 발전에 기여
- 펩타이드 공학을 이용한 약리 효능 증진에 이용
- 기존 항생제에 대한 내성균을 제거하기 위한 새로운 개념의 항균제 및 항암제 개발을 통한 신개념의 대량생산 방법 응용으로 원가 절감 가능
- 국내외 감자 가공업체와의 공동연구를 통하여 감자단백생산체계를 개발할 수 있음.

제 2절 기업화 추진방안

본 과제를 통하여 밝혀진 우량 품종과 여기에서 추출되는 항생 펩타이드를 이용하여 현재 웰빙(Well-Being)시대를 맞이하여 폭넓은 소비자의 욕구 충족을 위한 음료, 식품등 새로운 기능성 식품개발에 다양하게 응용할 수 있다. 또한 현대사회에 있어서 사람을 포함하여 동식물 모두 질병예방 및 치료 목적으로 항생제 사용이 불가피하고 현 항생제의 대부분이 각종 부작용과 사용규제가 늘고있는 실정이다. 그래서 인체와 가축, 식물 및 환경에 까지 무해한 항생제의 개발이 필수적인 상황에서, 개발된 항생 펩타이드를 사용한다면 가축 및 어류의 사료사업이나 생활용품 및 의약계등 다양한 분야에서의 응용이 가능할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 개발된 항생 펩타이드를 포함한 제품으로는 인슐린, vancomycin, oxytocin, cyclosporin 등 40종이 제품화되어 있으며, 현재 270여종의 펩타이드 소재가 임상시험 중에 있음.
- 펩타이드 항생제인 Cubicin (Cubist 제약회사)은 2004년도 판매액이 약 6천만 달러에 이릅니다.
- 그러나 국외에서도 아직까지 감자를 이용한 항생 펩타이드 이용 기술 및 가축의 사료, 식중독 유발세균이나 화장품에 여드름 등의 미생물을 목표로 하여 기능성 제품을 생산하는 경우는 없었습니다.
- 신개념 펩타이드 항생소재의 개발[사료첨가제, 화장품첨가제, 식품첨가제(Russell, 1991)]은 5억달러 이상의 세계시장 점유효과 및 이에 따른 수출효과/수입대체효과가 기대됩니다.

제 7 장 참고문헌

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Bark Y. G., Lee D. G., Kim Y. H. and Kang S. C. 1996. Antibiotic Properties of an Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*, on *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. Korea J. Plant Pathol. 12:245-250.
- Berrocal-Lobo, M., A. Segura, M. Moreno, G. Lopez, F. Garcia-Olmedo, and A. Molina. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. Plant Physiol. 128:951-961.
- Boman H. G. and Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. Annu. Rev. Microbiol. 41:103-126.
- Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H., Lee J. Y. and Lidholm D. A. 1991. Cell free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. Eur. J. Biochem. 201:23-31.
- Bosi, P., C. Gremkolini, and P. Trevisi. 2003. Dietary regulations of the intestinal barrier function at weaning. Asian Aust. J. Anim. Sci. 16:596-608.
- Broekaert W., Terras F., Cammue, B. P. A. and Osborne R. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. 108:1353-1358.
- Cera, K. R., D. C. Mahan, R. F. Cross, G. A. Reinhart, and R. E. Whitmoyer. 1988. Effect of age, weaning and post weaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. J. Anim. Sci. 66:574-584.
- De Lucca A. J. and Walsh T. J. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1-11.
- Dial, E. J., L. R. Hall, H. Serna, J. J. Romero, J. G. Fox and L. M. Lichtenberger. 1998. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. Dig. Dis. Sci. 43:2750-2756.

- Do, J. R., S. N. Kang, K. J. Kim, H. J. Jo, and S. W. Lee. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* 13:640-645.
- Doyle, M. E. 2001. Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Briefings Food Research Institute. University of Wisconsin-Madison.
- Ganz T. and Lehrer R. I. 1994. Defensins. *Curr. Opin. Immunol.* 6:584-589.
- Gazit E., Lee W. J., Brae P. T. and Shai Y. 1994. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33:12416-12423.
- Han, C. K., B. H. Lee, K. S. Song, N. H. Lee, and C. S. Yoon. 1996. Effects of hypersensitive diets mainly consisting of buckwheat, potato, and perilla seed on blood pressures and plasma lipids in normotensive and spontaneously hypersensitive rats. *Korean J. Nutr.* 29:1087-1095.
- Henzler W. K. A., Lee D. K. and Ramamoorthy A. 2003. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42: 6545-6558
- Hoffmann J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* 7:4-10.
- Hunter, H. N., D. B. Fulton, T. Ganz and H. J. Vogel. 2002. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J. Biol. Chem.* 277:37597.
- Kendall, D. C., B. T. Richert, T. E. Weber, K. A. Bowers, S. A. Decamp, A. P. Schionckel, and P. Matzat. 2000. Evaluation of genotype, strategic use of antibiotics and grow-finish management effects on lean growth rate and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 78 (Suppl. 2):39 (Abstr.)
- Kim, J. Y., S. C. Park, M. H. Kim, H. T. Lim, Y. K. Park and K. S. Hahm. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:921-927.
- Kim, M. H., S. C. Park, J. Y. Kim, S. Y. Lee, H. T. Lim, H. S. Cheong, K. S. Hahm and Y. K. Park. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden valley". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:681-686.

- Koch A. L. 1981. Evolution of Antibiotic Resistance Gene Function. *Microbiol. Rev.* 45:355-378.
- Lee D. G., Shin S. Y., Maeng C-Y., Jin Z. Z., Kim K. L. and Hahm K-S. 1999. Isolation and Characterization of a Novel Antifungal Peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263:646-651.
- Lee D. K., Kim B. S., Kim D. -H. Kim S., Chun J. H., Han D. M., Lee B. L. and Lee Y. 1995. Expression of an insect antifungal protein of *Tenebrio molitor* in *Escherichia coli*. *Cells* 5:429-435.
- Lewis, A. J., and L. L. Southern. 2001. Swine Nutrition. 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton London. New Your. Washington, D.C.
- Mitscher L. A., Darke S., Gollapudi S. R. and Okwute S. K. 1987. A modern look ar folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 50:1025-1040.
- Moore, S. 1963. On the determination of cystine as cysteric acid. *J. Biol. Sci.* 38:235-237.
- NRC, 1998. Nutrient Requirements of Swine. (10th Ed.)National Academy Press, Washington, DC.
- Ogawara H. 1981. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria, with special reference to âlactam antibiotics. *Microbiol. Rev.* 45:591-619.
- Plate, N. A., L. I. Valuev, T. A. Valueva, and V. V. Chupov. 1993. Biospecific haemosorbents based on proteinase inhibitor. I. Synthesis and properties. *Biomaterials.* 14:51-56.
- Pouvreau, L. H. Gruppen, S. R. Piersma, L. A. M. van den Brock, G.M. van Koningsveld, and A. G. J. Voragen. 2001. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2864-2874.
- Pyong, W. P., B. P. Gerald, T. H. Michael and M. Bernfield. 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature.* 411:98-102.
- Quang K. H., Cathy M. H., Elaine B. L., Christine E. S., Jeffry R. B. and Dilip M. S. 1992. Antifungal proteins from Plants. *The Journal of Biological Chemistry.* 267:6635-6640.
- Russell A. D. 1991. Mechanism of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 71:191-201.
- Saberwal G. and Nagaraj R. 1994. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function

- correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1197:109-131.
- SAS. 1988. SAS/STAT[®] Users guide (Release 6.03 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Skerlavaj B., Benincasa M., Risso A., Zanetti M. and Gennaro R. 1999. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett.* 463:58-62.
- Smits, C. H. M., J. Veeling, A. Veldman, and G. J. Borggreve. 1991. Het gebruik van melk eiwitten en alternatieven voor melk eiwit in biggenvoeders. (VOA-28, VOA-30 en VPA-30). CLO-Institute for Animal Nutrition, "De Schothorst", Lelystad, The Netherlands. Trial Rep. No. 298. p 12.
- Steiner H., Andreu D. and Merrifield R. B. 1998. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: Antibacterial peptides from insects. *Biochem. Biophys. Acta.* 939:260-266.
- Taniguchi M. and Kubo I. 1993. Ethnobotanical drugs discovery based on medicine mens trials in the African savanna: screening of East African plants for antimicrobial activity. *J. Nat. Prod.* 56:1539-1546.
- Wang, Y. Z., T. Z. Shan, Z. R. Xu, J. Feng, and Z. Q. Wang. 2006. Effects of the lactoferrin (LF) on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.07.013
- Zaslloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5449-5453.