

최 종 보 고 서

(뒷면)		(앞면)
<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 30px; margin: 0 auto; text-align: center; padding: 5px;"> 주 의 (편집순서 8) </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> (15 포인트 고딕계열) ↑ 6cm ↓ </div>	과제번호 사료 첨가제로서 항균펩타이드를 지닌 생균제 개발 농림수산식품부 ↑ 3cm ↓	<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> 과제번호 5cm </div> <div style="border: 2px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px; text-align: center;"> 발 간 등 록 번 호 </div> <div style="border: 2px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px; text-align: center;"> 11-1541000-000518-01 </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> ↓ </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> 사료 첨가제로서 항균 펩타이드를 지닌 생균제 개발 (18 포인트 고딕계열) </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> (Development of probiotics containing antimicrobial peptides as a novel alternative to antibiotics) (17 포인트 명조계열) </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <제1세부과제> 항균 펩타이드 개발 및 항균 펩타이드를 지닌 락토바실러스 생균제의 대량생 산 </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <협동과제 1> 항균 펩타이드 함유 생균제의 표면발현을 통한 항생능력 검증 </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <협동과제 2> 항균 펩타이드 함유 생균제의 효능 검증을 통한 항생제 대체 첨가제로서의 가치 평 가 (17 포인트 고딕계열) </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> 조선대학교 산학협력단 (17 포인트 명조계열) </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> ↑ 9cm ↓ </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> 농 림 수 산 식 품 부 (17포인트 명조계열) </div> <div style="text-align: center;"> ↑ 4cm ↓ </div>

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “사료 첨가제로서 항균 펩타이드를 지닌 생균제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 일

주관연구기관명 : 조선대학교
주관연구책임자 : 박 윤 경
협동연구기관명 : 강원대학교
협동연구책임자 : 채 병 조
협동연구기관명 : (주)바이오리더스
협동연구책임자 : 홍 승 표

요 약 문

I. 제 목

사료 첨가제로서 항균 펩타이드를 지닌 생균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

페니실린 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 사용되어왔다. 그러나 요즈음에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 과거와는 달리 빠른 속도로 등장(Koch, 1981)하고 있고 따라서 이들 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메카니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 천연에 존재하는 항균 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되고 있다. 자연계에 존재하는 항균 펩타이드들을 그대로 이용하거나 유사체들을 설계하여 이용하고자 하는 시도들이 있었으나 항균활성과 동시에 세포독성의 척도인 적혈구 용혈활성도 동시에 증가하는 경우가 많기에 실제적인 응용에 많은 제약을 받고 있다. 따라서 본 연구팀에서는 항균활성이 높으며 세포독성이 없는 항균펩타이드의 개발을 위한 연구가 진행 중이다.

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

인류는 수 세기동안 개구리를 병원균 감염에 대처하기 위한 치료의 수단으로 이용해왔으며 남미 국가들에서는 오늘날에도 민간요법으로써 이를 사용하고 있다. 1962년에 *Bombina variegata* 라는 개구리의 표피분비액에서 항균력 및 용혈력을 지닌 펩타이드의 존재를 처음 확인하였고, 이 후 24개의 아미노산으로 구성된 bombinin이란 항균 펩타이드가 최초로 분리

되었다. 1971년에는 벌의 독소(bee venom)로부터 melittin이란 펩타이드가 정제되어 항균 peptides의 구조와 작용기전에 대한 연구가 본격적으로 수행되는 계기가 되었다. 그러나 melittin은 우수한 항균활성을 지니고 있음에도 불구하고 강력한 용혈력(적혈구에 대한 파괴력)을 갖고 있음으로 인해 신규 항생제로의 개발을 위한 더 이상의 연구를 진행시킬 수가 없었다. 따라서 melittin의 발견 이 후, 용혈력이 없으며 항균활성이 우수한 천연 펩타이드의 발견을 위한 많은 연구들이 뒤따르게 되었다.

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

- 선행 연구결과를 통하여 개발된 펩타이드 항생물질은 종래의 항생제들과는 다른 항생기작에 의하여 항균 및 항진균 활성을 나타내기 때문에, 항생제 내성을 유발할 가능성이 매우 적다는 장점을 가지고 있음
- 펩타이드 항생물질을 이용한 제약 및 식품 분야 등에서의 산업적 응용 가능성은 매우 높지만, 펩타이드 항생물질의 다양한 산업적 이용이 가능함에도 불구하고, 현재까지 개발된 기술의 가장 큰 장애요인의 하나는 이들을 값싸게 대량으로 생산하는데 어려움이 있음
- 예를 들면, 화학합성에 의하여 펩타이드 항생물질을 대량생산하는 경우에는 경제성이 낮다는 문제가 있고, 미생물을 이용한 유전공학적 기법으로 펩타이드 항생물질을 생산하고자 하는 경우에도 펩타이드 항생물질의 발현율이 매우 낮아 정제의 어려움과 펩타이드를 발현하는 숙주가 발현되는 펩타이드에 의해 사멸되는 문제점이 있음.
- 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 펩타이드의 숙주내 독성을 중화시키는 유전자를 이용한 펩타이드 발현, 정제 및 생산 시도가 있으나 이 또한 정제효율의 감소 및 경제적 생산의 어려움이 있음
- 따라서, 펩타이드 항생물질을 보다 간편한 방법으로 대량생산할 수 있으며, 정제가 간단하거나 불필요하여 펩타이드 항생물질을 산업적으로 이용할 수 있는 기술개발이 절실하게 요구되고 있음
- 본 연구 수행에서는 유용 펩타이드성 항생물질을 선별하고, 선별된 펩타이드 항생물질을 세포표면에 발현함으로써 간편하고 안전하게 대량생산할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 (주)바이오리더스에서 개발중인 바실러스 균주 유래의 세포외막 단백질을 새로운 표면발현 모체로 이용하여 항생물질 펩타이드를 표면발현한 유산균을 개발하고, 이를 이용한 산업동물에 사용가능한 사료첨가제를 개발하고자 함

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

(1) 1차년도

구분	세부과제별	연구개발 내용	연구개발의 범위
1차년도	제1세부과제 조선대	<ul style="list-style-type: none"> ◦항균 peptide 개발 및 항생제 기능 효과검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◦기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 지닌 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색 ◦기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행 ◦항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체재 실험을 위한 대량 생산 ◦기존에 개발된 항균 펩타이드보다 우수한 새로운 항생 펩타이드(신규 펩타이드)의 설계
	협동 (주)바이오 리더스	<ul style="list-style-type: none"> ◦유용 펩타이드 항생물질의 선별(P5) ◦유산균 표면발현 시스템 확립 ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ◦최적의 유산균 표면 발현 모체 선정 및 고효율 항시적 프로모터의 선정 ◦펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종) ◦숙주 유산균의 동정, 선별 ◦펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 유산균 형질 전환법 확립 ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인
	협동 강원대	<ul style="list-style-type: none"> ◦생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5의 항생제 대체 효과 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ◦자돈을 이용한 효능검증 ◦육계를 이용한 효능검증

(2) 2차년도

구분	세부과제별	연구개발 내용	연구개발의 범위
2차년도	제1세부과제 조선대	<ul style="list-style-type: none"> ◦P5 항균 peptide, 생균제 배양 및 효과검증 ◦신규 항균 peptide 선발 및 생균제 배양 및 효과검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◦항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체제 실험을 위한 대량 생산 ◦신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색 ◦신규 펩타이드의 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행 ◦신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체제 실험을 위한 대량 생산 ◦최종 선정된 2종의 항생 펩타이드에 대한 각종 동물세포주를 이용하여 세포독성 여부 검토 ◦장내세균 및 식중독 유발 세균에 대한 독성 검토
	협동 (주)바이오 리더스	<ul style="list-style-type: none"> ◦신규 유용 펩타이드 항생물질의 선별(A3) ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 최적화 조건 확립 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 효능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦신규 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종) ◦신규 펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인 ◦펩타이드 항생물질의 항시적 유산균 표면발현을 위한 조건의 최적화 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균 효능 확인
	협동 강원대	<ul style="list-style-type: none"> ◦생균제 배지에서 배양된 새로운 항균 펩타이드 A3의 항생제 대체효과 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ◦자돈과 육계 사료내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(3) 3차년도

구분	세부과제별	연구개발 내용	연구개발의 범위
3차년도	제1세부과제 조선대	<ul style="list-style-type: none"> ◦항균 peptide 대량생산 및 분리 기술의 단순화 	<ul style="list-style-type: none"> ◦항생제 활성 단백질의 분자량 확인 ◦분리 단백질(펩타이드)의 분리 효율 검증 ◦최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량생산 기술의 단순화 ◦최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량분리기술의 단순화
	협동 (주)바이오리더스	<ul style="list-style-type: none"> ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 최적화 조건 확립 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 효능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦펩타이드 항생물질의 항시적 유산균 표면발현을 위한 조건의 최적화 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균 효능 확인
	협동 강원대	<ul style="list-style-type: none"> ◦생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5와 A3의 효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◦자돈과 육계 사료내 새로운 항균 펩타이드와 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3의 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

(1) 1차년도

- 항균 peptide 개발, 항생제 기능 효과검증 및 유용 펩타이드 항생물질의 선별(P5)
 - 기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 지닌 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색
 - 기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행
 - 항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체제 실험을 위한 대량 생산
 - 기존에 개발된 항균 펩타이드보다 우수한 새로운 항생 펩타이드(신규 펩타이드)의 설계

- 유산균 표면발현 시스템 확립
 - 최적의 유산균 표면 발현 모체 선정 및 고효율 항시적 프로모터의 선정
 - 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종)

- 펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 기술 확립
 - 숙주 유산균의 동정, 선별
 - 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 유산균 형질 전환법 확립
 - 펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인

- 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5의 항생제 대체효과 규명
 - 자돈을 이용한 효능검증
 - 육계를 이용한 효능검증

(2) 2차년도

- P5 항균 peptide, 생균제 배양 및 효과검증
 - 1차년도 결과물인 항균 peptide(P5)를 락토바실러스에서 표면 발현하여 항생제 대체제 실험을 위한 생산
 - 신규 펩타이드의 병원성 박테리아와 곰팡이에 대한 항생제 기능 탐색
 - 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행
 - 최종 선정된 2종의 항생 펩타이드에 대한 세포독성 여부 검토

- 항균 펩타이드 함유 생균제의 표면발현을 통한 항생능력 검증
 - 신규 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종, A3)
 - Western blot 이용 펩타이드 발현 확인
 - 항진균 활성 평가

- 항균 펩타이드 함유 생균제의 효능 검증을 통한 항생제 대체 첨가제로서의 가치 평가
 - 새로운 항균 펩타이드 A3의 항생제 대체효과 확인

(3) 3차년도

- 항균 peptide 대량생산 및 분리 기술의 단순화
 - 항생제 활성 단백질의 분자량 확인
 - 분리 단백질(펩타이드)의 분리 효율 검증
 - 최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량분리기술의 단순화

- 펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 최적화 조건 확립 및 효능 분석
 - 펩타이드 항생물질의 항시적 유산균 표면발현을 위한 조건의 최적화
 - 펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균 효능 확인

- 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5와 A3의 효과 검증
 - 자돈과 육계 사료내 새로운 항균 펩타이드와 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3의 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

(1) 연구성과

- 항균 peptide 개발 및 항생제 기능 효과검증
- P5 항균 peptide, 생균제 배양 및 효과검증
- 신규 항균 peptide 선발 및 생균제 배양 및 효과검증
- 항균 peptide 대량생산 및 분리 기술의 단순화
- 항생제 대체제로서 항균 펩타이드 P5의 가치 평가
- 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제의 항생제 대체효과 구명
- 새로운 항균 펩타이드 A3의 가치 평가
- 생균제 배지에서 배양된 새로운 항균 펩타이드 A3 함유 생균제의 항생제 대체제로서의 가치 평가

(2) 성과활용 계획

본 연구 결과로 분리된 항생 활성이 우수하다고 사료되는 유산균 표면 발현 펩타이드는 항생제 대체제, 화장품 첨가제, 농약 대체품, 사료 첨가제 등의 상품화를 위한 산업화 등에 활용 가능할 것이며, 아미노산의 일부를 절단함으로써 펩타이드의 길이는 짧으면서 항균 활성은 모델 펩타이드보다 우수한 펩타이드를 개량하는데 활용가능하다.

특히, 본 연구에서 정제한 A3와 P5는 펩타이드 합성을 통하여 아미노산 치환, 항균, 항암, 항진균 작용의 기작을 이해하는데 정보를 제공할 수 있으며, 이들을 data base화하여 펩타이드 공학 연구에 활용 가능할뿐더러 새로운 항생제 개발, 특히 병원성 내성 균주에 대한 항생제 기능의 기초 자료로 제공할 수 있다. 또 본 연구에서 분리된 강력한 항균 펩타이드를 생산 비용이 적으면서 대량생산할 수 있는 시스템을 개발하는데 정보로 활용 가능하다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of probiotics containing antimicrobial peptides as a novel alternative to antibiotics

II. Goal and importance

The discovery and development of antibiotics has led to dramatic improvements in treating infectious diseases and has significantly increased food-animal production. However, the attention was drawn to the risk of bacterial resistance to certain antibiotics and the potential harm to both human and animal health. 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.

These peptides have been known to play an important roles in insect immunity and host defense. Most of them have a common feature of being highly basic due to multiple basic amino acid residues, and forming amphipathic structures in phospholipid bilayers. Their basic natures are related to the interaction with negatively charged membranes of the target cells and their amphipathic character which allow them to be

incorporated into the membrane, ultimately disrupting membrane potential and/or structure, and cell death.

Cecropins isolated from cecropia moths are very active against Gram-negative bacteria, but less active against Gram-positive bacteria. Magainin-2 (MA) purified from frog skin have weak antibacterial activity against both Gram-positive and negative bacteria. A notable exceptions are the CA-MA hybrid peptide composed from the N-terminal sequences of CA and MA. In order to design highly potent antimicrobial peptides with lowered or no side effects, we have investigated that the structure and antimicrobial activity relationships. In particular, CA-MA analogue P5 (P5), designed by flexible region (GIGP)-substitution, Lys-(positions 4, 8, 14, 15) and Leu- (positions 5, 6, 12, 13, 16, 17, 20) substitutions, showed an enhanced antimicrobial and antitumor activity without hemolysis.

HP (2-20) (AKKVFKRLEKLFSKIQNDK) is the antimicrobial sequence derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* Ribosomal Protein L1 (RPL1). In order to develop novel antibiotic peptides useful as therapeutic agents, potent antibiotic activities against bacteria, fungi and cancer cells without a cytotoxic effect are essential. To this end, several analogues with aminoacid substitutions were designed to increase or decrease only the net hydrophobicity. In particular, the substitution of Trp for the hydrophobic amino acid, Gln and Asp at position 17 and 19 of HP (2-20) (Anal 3) caused a dramatic increase in antibiotic activity without a hemolytic effect.

So these new peptides not only can be applied in domestic livestock production, but also this kind of natural substance can to be used as an alternative to antibiotics. It will solve the problem of antibiotics resistance, and reduce the cost during importing the antibiotics.

III. Contents and Scope

1. In this study, novel analogue peptides by chain length deletion and increasing net positive charge and hydrophobicity were designed and synthesized from the sequence of CA-MA. In order to investigate the correlation between antibiotic activity and the Leu-Lys rich model peptide the antimicrobial and anticancer activity were measured against bacterial, fungal and cancer cells.

2. In order to obtain peptides having improved antibiotic activity with lowered or no cytotoxicity, in this study, novel analogue peptides with amino acid substitutions were designed and synthesized based on the sequence and α -helical wheel diagram of HP (2-20). Several modifications of these analogues have been designed. In the present study, the antibiotic effect of synthetic peptides against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and pathogenic fungal cells were measured.
3. The hybrid and analogue peptides were synthesized by the solid phase method using Fmoc-chemistry.
4. In this study, effect of feeding antimicrobial peptide P5 was investigated in weaning pigs and broilers, respectively. P5 antimicrobial peptide was produced by using specially designed *L. casei* expressing P5 on their surface.
5. In this study, effects of antimicrobial peptide A3 on performance, ATTD, fecal and intestinal microflora, intestinal morphology and serum immunoglobulins of weanling pig and broilers were evaluated when used as a substitute to antibiotics, respectively.
6. In this study, antimicrobial peptide-A3 was used as an alternative to antibiotic in broiler diets and performance, nutrient metabolizability, intestinal morphology, serum immunoglobulins, excreta and intestinal microflora were evaluated.
7. Antimicrobial peptides P5 and A3 were compared with antibiotic on performance, nutrient digestibility, serum immunoglobulins, intestinal morphology, excreta and intestinal microflora in weanling pigs and broiler.

IV. Results

1. The appropriate flexibility of the central hinge region and the hydrophobicity at position 16 of CA-ME and CA-MA hybrid peptides, respectively, are important in designing novel antimicrobial peptides with antibiotic activity but no hemolytic activity.

2. The peptides, A¹⁶-CA(1-8)-MA(1-12), V¹⁶-CA(1-8)-MA(1-12) synthesized in this study displayed a similar antibacterial and antitumor activity compared to L-CA-MA while displaying low or no hemolytic activity at a high peptide concentration of 100 μ M. Therefore features of these synthetic peptides having cell membrane selectivity may aid in the design of better antimicrobial peptides.

3. CA-MA and CA-ME hybrid peptides were necessary of appropriate bend structure for maintain the antimicrobial activity.

4. The analogues of CA(1-8)-MA(1-12), with Ala and Leu substitution of at position 2 in CA(1-8)-MA(1-12) were synthesized and investigated antitumor activity. The results showed that the Trp residues t position 2 in CA(1-8)-MA(1-12) was important of antitumor activity.

5. The analogues of PMAP-23, Ala substitution of Pro or Trp in PMAP-23 were synthesized and investigated the relationships between the structure, antibacterial activity. The results showed that the Trp at position 21 in PMAP-23 has play an important role in interaction of cell membrane and α -helical structure was detected in TFE condition.

6. The α -helicity of Brevinin 1 and Thanatin hybrid peptides were important to antimicrobial activity.

7. There were no noticeable differences in performance, intestinal and fecal microflora among pigs fed P5 antimicrobial peptide and P5 diets. However, dietary

treatments had no effect on the serum immunoglobulins and intestinal morphology.

8. P5 was more effective than positive control in reducing excreta coliforms and cecal *Clostridium* in birds. However, dietary treatments had no effect on the serum immunoglobulins and intestinal morphology.

9. Pigs fed 90 ppm A3 antimicrobial peptide diet had lesser fecal coliforms, total anaerobic bacteria and *Clostridium* spp. than pigs fed NC (without any antimicrobial) diet.

10. There were no differences in the variables measured in birds fed positive control and 90 ppm A3 diet, except for positive control being more effective in reducing excreta coliforms and total anaerobic bacteria.

11. Less *Clostridium* spp. were present in the feces of pigs fed antimicrobial peptide A3 and P5 when compared with pigs fed NC diets, while pigs fed NC diet had the highest number of fecal coliforms.

12. All of bacterial population in experiment of treatment NC was significant changed; apart from this in treatment A3 is only coliforms that significantly increased.

V. Application

1. The analogue peptide (P5) derived from CA-MA and peptide (A3) derived from HP (2-20), possessing the higher antimicrobial activity but lower cellular toxicity. We will apply these results to the developments of the antimicrobial peptides as therapeutic antibiotics.

2. These analogue peptides synthesized in this study could be applied in understanding the structure-antibiotic function relationships of antibacterial peptides.

3. These analogue peptides As hybrid and analogue peptides expressed on the lactobacillus surface in our study acted on Gram-positive and negative bacteria, fungi

and human blood red cells, respectively, these peptides could be applied in elucidating the details of target cell specificity

4. Moreover, it will establish the techniques for peptide's design, surface expression on lactobacillus, and mass production. In order to evaluate these antimicrobial peptides substituting for antibiotics in feed industry.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of research development	17
Section 1. Research importance in economics and industry	17
Section 2. Necessity of the research development	18
Chapter 2. Literature Review and Information	20
Chapter 3. Contents and results of the research	22
Section 1. Experimental methods	22
Section 2. Contents of the research	29
Section 3. Results of the research	30
Chapter 4. Achievement and contribution to related industry	145
Section 1. Achievement of the study	145
Section 2. Contribution to related industry	147
Chapter 5. Practical use and field application	149
Section 1. Plan of commercialization	149
Section 2. Plan of patent and papers	149
Section 3. Plan of application to other researches	149
Chapter 6. Overseas gathering of information & technology	151
Chapter 7. References	152

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 1 절 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성	17
제 2 절 연구개발의 필요성	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 이론적, 실험적 접근방법	22
제 2 절 연구내용	29
제 3 절 연구 결과를 기술	30
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	145
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	145
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	147
제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용계획	149
제 1 절 실용화, 산업화 계획 (기술실시 등)	149
제 2 절 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	149
제 3 절 추가연구, 타연구에 활용계획 등	149
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	151
제 7 장 참고문헌	152

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성

생체는 생명활동의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여 매우 정교한 많은 조절제어 기구를 가지고 있으며, 이 기구는 생체내를 중환으로 연결하는 신호에 의하여 조절되고 있다. 그리고 펩타이드가 생체내에서의 조절제어 및 정보전달에 중요한 역할을 담당하는 인자로서 작용하고 있다. 이와 같은 내인성의 펩타이드를 생체기능조절 펩타이드(regulatory peptide)라고 부른다. 현재까지 많은 생체내에서의 기능이 밝혀져 오고 있으며, 이들의 생체기능조절 펩타이드는 호르몬, 세포증식, 혈압조절, 신경전달, 혹은 항균들의 다양한 생물활성을 가진다. 생체기능조절 펩타이드 중에서 곤충(Boman et al 1987), 양서류(Boman et al 1991) 및 포유동물(Skerlavaj et al, 1999)에서 분리된 항균 펩타이드는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 종양 세포 및 원생생물에 항생 활성을 나타낸다는 것이 보고되고 있다. 항균 펩타이드는 분자내에 소수성 잔기 및 염기성의 친수성 잔기가 포함된 양쪽 친매성(amphipathicity)의 공통의 구조적 성질을 가지고 있다. 이들 항균 펩타이드와 세균 지질과의 상호작용 및 구조-항생활성 상관관계 연구로부터 기존의 항균 펩타이드의 항생 활성을 증진시키며, 세포독성을 없애는 연구로부터 세포독성이 없으며, 강한 항생 활성을 갖는 약물을 제조하려고 하고 있다. 이와 같이 연구를 수행하기 위해서는 고도의 펩타이드 공학 기술이 필요하다. 펩타이드 공학의 이용기술은 펩타이드 약물 뿐만 아니라 peptidomimetic 약물의 개발에 이용할 수 있는 핵심기술이다. 따라서 본 연구에서는 수행하고자 하는 항균 펩타이드의 항생 활성이 증진된 새로운 항균 펩타이드의 개발연구 및 대량생산 연구는 펩타이드 공학을 위한 핵심 기술이다. 또한 본 연구에 주된 목표로 하는 항균 펩타이드의 생물종 표적의 선택성 즉 세균 및 진균에 대한 항생 활성을 유지하고 천연형의 펩타이드보다 강한 항생 활성을 갖는 항생물질의 개발은 임상적 치료용(De Lucca et al, 1999) 특히, 항생제 내성 세균 및 진균에 대한 항생제 대체제, 펩타이드성 농약 및 화장품 첨가제로도 적용 가능할 것으로 사료된다.

항생제의 중요성을 강조하자면, 항생제는 세계적으로 대단히 넓은 시장을 가지고 있다(Kendall et al, 2000). 현재 기존의 항생제에 대하여 내성을 가지는 강한 균주의 발생 및 기존 항생제의 인체 부작용 등으로 인하여 새로운 항생제의 개발이 요구된다. 펩타이드 항생제는 다른 항생제보다 비교적 인체 부작용이 없으므로 항생제로 개발 필요성이 큰 물질이며, 국내 뿐 아니라 세계적으로도 넓은 시장성을 가질 것이다. 따라서 본 연구는 경제, 산업적인 측면에서 그 중요성이 대단히 크며 각종 항생제의 수입대체 및 수출 증대에도 이바지 할 수 있다고 생각된다.

제2 절 연구개발의 필요성

페니실린 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 사용되어왔다. 그러나 요즈음에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주(Ogawara, 1981)들이 과거와는 달리 빠른 속도로 등장하고 있고 따라서 이들 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메카니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이다(Doyle, 2001). 그러므로 천연에 존재하는 항균 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되고 있다. 자연계에 존재하는 항균 펩타이드들을 그대로 이용하거나 유사체들을 설계하여 이용하고자 하는 시도들이 있었으나 항균활성과 동시에 세포독성의 척도인 적혈구 용혈활성도 동시에 증가하는 경우가 많기에 실제적인 응용에 많은 제약을 받고 있다(Taniguchi et al, 1993). 따라서 본 연구팀에서는 항균활성이 높으며 세포독성이 없는 항균펩타이드의 개발을 위한 연구가 진행 중이다.

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

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

그리고 이렇게 발견된 항균 펩타이드를 활성이 증진된 펩타이드로 설계하기 위하여 α -helical wheel diagram을 기초로 아미노산을 치환한다든지, 펩타이드의 삼차원 구조와 항생 활성의 상관관계(Hunter et al, 2002)를 기초로 하여 세포독성이 없고 기능이 증진된 항생 펩타이드를 설계, 개발하고 있으며, 컴퓨터를 이용하여 펩타이드 구조를 예측하고, 이 구조로부

터 고부가가치 유용 펩타이드들을 설계하고 있다. 또한 최근에는 peptidomimetics 기술의 도입을 적극적으로 추진함으로써 효과적인 신약 개발을 모색하고 있다.

- 선행 연구결과를 통하여 개발된 펩타이드 항생물질은 종래의 항생제들과는 다른 항생기작에 의하여 항균 및 항진균 활성을 나타내기 때문에, 항생제 내성을 유발할 가능성이 매우 적다는 장점을 가지고 있음.
- 펩타이드 항생물질을 이용한 제약 및 식품 분야 등에서의 산업적 응용 가능성은 매우 높지만, 펩타이드 항생물질의 다양한 산업적 이용이 가능함에도 불구하고, 현재까지 개발된 기술의 가장 큰 장애요인의 하나는 이들을 값싸게 대량으로 생산하는데 어려움이 있음.
- 예를 들면, 화학합성에 의하여 펩타이드 항생물질을 대량생산하는 경우에는 경제성이 낮다는 문제가 있고, 미생물을 이용한 유전공학적 기법으로 펩타이드 항생물질을 생산하고자 하는 경우에도 펩타이드 항생물질의 발현율이 매우 낮아 정제의 어려움과 펩타이드를 발현하는 숙주가 발현되는 펩타이드에 의해 사멸되는 문제점이 있음.
- 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 펩타이드의 숙주내 독성을 중화시키는 유전자를 이용한 펩타이드 발현, 정제 및 생산 시도가 있으나 이 또한 정제효율의 감소 및 경제적 생산의 어려움이 있음.
- 따라서, 펩타이드 항생물질을 보다 간편한 방법으로 대량생산할 수 있으며, 정제가 간단하거나 불필요하여 펩타이드 항생물질을 산업적으로 이용할 수 있는 기술개발이 절실하게 요구되고 있음.
- 본 연구 수행에서는 유용 펩타이드성 항생물질을 선별하고, 선별된 펩타이드 항생물질을 세포표면에 발현함으로써 간편하고 안전하게 대량생산할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 (주)바이오리더스에서 개발중인 바실러스 균주 유래의 세포외막 단백질을 새로운 표면발현 모체로 이용하여 항생물질 펩타이드를 표면발현한 유산균을 개발하고, 이를 이용한 산업동물에 사용가능한 사료첨가제를 개발하고자 함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 분자생물학의 발달과 게놈 프로젝트의 전개 등에 의해 인간 유전자들이 속속 밝혀짐에 따라 의학, 화학, 농업, 환경 산업에 응용할 수 있는 단백질 소재의 개발이 전 세계적으로 가속화되고 있다. 항생제 연구분야의 경우 분자 동력학적 시뮬레이션을 이용한 펩타이드 삼차원구조의 변경으로 기존의 항균 펩타이드 활성을 증진시키면서 독성은 감소시킬 수 있는 새로운 항균 펩타이드 약물을 제조하려는 연구들이 시도되고 있다. 이러한 펩타이드성 항균제 대량생산의 매개체로서 최근에 개발된 lactoferricin을 대체할 수 있는 새로운 매개체의 개발이 시도되고 있다.

단백질 및 펩타이드를 이용한 의약품 개발 분야의 경우, 항생 펩타이드의 구조-활성 상관 연구를 통한 세포막에 작용하는 펩타이드 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 항균 펩타이드 약물 개발의 국내 현황은 천연물로부터 항균 펩타이드를 분리하려는 연구가 단편적으로 시도되고 있으나 기존의 항균 펩타이드 활성을 증진시키면서 세포 독성을 감소시킬 수 있는 새로운 항균 펩타이드 약물을 제조하려는 연구들은 아직 미미하다. 또한 펩타이드의 삼차원구조를 변경하는 새로운 개발 분야에서는 일부 기업 및 정부 출연 연구소에서 삼차원 구조에 기초한 신약개발이 응용되기 시작하였으나, 아직 항균성 펩타이드의 삼차원구조에 기초한 신약개발 및 합성이 이용된 결과는 보고된 적이 없다.

항생 펩타이드 개발의 경우 이 분야의 중요성에 대한 인식은 있으나 펩타이드의 합성, 고차구조 결정 등에 의한 작용기작 해석 등의 기술적 난이성 및 이 분야에 대한 다학제적 연구인식의 결핍에 기인하여 연구개발이 거의 전무한 상태이다.

최근 항균 펩타이드에 관한 연구가 국내외에서 다양한 항균 펩타이드들을 대상으로 진행 중이며 생물체로부터 새로운 항균 펩타이드에 대한 분리(Berrocal-Lobo et al, 2002) 및 동정(Dial et al, 1998)에 관한 연구도 같이 진행 중이다. 특히, 부산대의 이복률 교수팀은 풍뎅이로부터 항균 펩타이드 분리, 정제 및 cloning하는 연구들을 수행중이며, 강신원 교수, 부경대의 박남규 교수팀이 mastoparan에 관한 연구를 진행하고 있고, 한국과학기술원 김선창 교수팀 및 서울대학교 이봉진 교수팀이 새로운 항균 펩타이드에 대한 분리 및 동정에 관한 연구를 하고 있으나 전체적으로 국내에서의 항균 펩타이드의 연구는 아직 미진한 상태라 할 수 있다. 그리고 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 동물이 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. 이러한 결과는 과잉 처방됨으로써 각종 항생제에 내성을 획득한 세균의 새로운 사멸 물질 개발의 희망을 열어놓은 셈이라 할 수 있다. 그리고 UCLA 토마스 갠즈 박사는 이번 연구에 대해 앞으로 새로운 항생제를 찾는 데 커다란 기여가 기대되는 놀랄만한 진보라고 평가하고 앞으로 세균의 세포벽에 구멍을 뚫는 환상의 단백질 연구가 항생제 개발의 새로운 탈출구

가 될 것으로 예상하고 있다.

그리고 본 연구 결과가 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 효과는 세포 독성이 없고, 항생제 활성이 높은 단백질(펩타이드)을 탐색하였다는 점과 항균제, 항진균제, 항바이러스제 및 항암제로써 가치를 갖는 증진된 항생 활성을 나타내는 펩타이드를 개발하였다고 할 수 있고 특히, 다종류 약물에 저항성을 지닌 박테리아 출현에 대한 항생제, 무공해 방부제, 무공해 식품보전제, 항진균제, 항바이러스제 및 항암제 등으로 개발이 가능하고, 작용 메카니즘의 연구를 통한 세균, 진균, 바이러스는 물론 암세포까지 동시에 사멸을 할 수 있는 새로운 다기능성 항균 펩타이드의 개발이 가능해졌다고 할 수 있다. 또한 체내에서 보다 안정하고, 무독성이며, 강력한 항생제의 개발에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적, 실험적 접근방법

<제1세부과제, 조선대>

가. 펩타이드의 설계 및 합성

펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노산의 N_{α} -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상법(solid phase method)으로 합성한다. 본 연구에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 Rink Amide MBHA-Resin을 출발물질로 사용하며, 카르복실말단이 $-OH$ 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용한다. Fmoc-아미노산의 coupling에 의한 펩타이드 chain의 연장(elongation)은 *N*-hydroxybenzotriazole (HOBT)-dicyclo-hexylcarbodiimide (DCC)법에 의한다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 coupling 시킨 후, 20% piperidine /*N*-methylpyrrolidone (NMP)용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 dichloromethane (DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 말린다. 여기에 TFA (trifluoroacetic acid)-phenol-thioanisole- H_2O -triisopropylsilane (85: 5: 5: 2.5: 2.5, vol./vol.) 용액을 가하고 2-3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 resin으로 부터 펩타이드를 분리시킨 다음, diethylether로 펩타이드를 침전화 시킨다. 이렇게 하여 얻은 crude 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 acetonitrile gradient로 하여 정제형 reverse phase(RP)-HPLC column (Delta Pak, C_{18} 300Å, 15 μ , 19.0 mm×30 cm, Waters)을 이용하여 정제한다. 각 합성 펩타이드를 6N-HCl로 110°C에서 24시간 가수분해 시킨 후 잔사를 감압농축 한 뒤, 0.02N-HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정한다. 펩타이드의 농도는 Ile을 기준으로한 아미노산 분석의 결과로 부터 계산한다.

나. 단백질 전기영동

항균 활성 부위를 갖는 단백질(펩타이드)의 분리를 확인하기 위한 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(Laemmli *et al.* 1972)의 방법에 따라 slab gel을 이용하여 수행하며, 시료와 표준단백질은 15% acrylamide gel에 loading한다. 전기영동 후, gel을 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고, destaining buffer(MeOH: glacial acetic acid: distilled water = 30: 10: 60)로 탈색하여 단백질의 band를 확인한다. 분자량 표준 단백질로는 Low Molecular Weight Range인 Bovine Serum Albumin(66 kDa), Chicken Egg Ovalbumin(45 kDa), Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase(36 kDa), Bovine Erythrocytes Carbonic Anhydrase(29 kDa), Bovine Pancreas Trypsinogen(24 kDa), Soybean Trypsin

Inhibitor(20 kDa), Bovine Milk α -Lactalbumin(14.2 kDa), Bovine Lung Aprotinin(6.5 kDa)을 이용하여 단백질의 분자량을 확인한다.

다. 항균활성의 측정

Escherichia coli (KCTC 1682), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1926), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637), *Bacillus subtilis* (KCTC 1918), *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3096) 및 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621)는 생명공학연구소 Korean Collection for Type Culture (KCTC)로부터 분양받고, 각 bacterial cells는 LB에서 mid-log phase까지 배양하여 96웰 microtiter plate (Nunc)에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 100 μ l씩 넣고, 여기에 bacterial cells이 포함된 배지를 100 μ l씩 가한 후, 37°C에서 하룻밤 방치한다. 620nm에서 흡광도를 측정하고, 흡광도가 나타나지 않는 농도를 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)로 결정한다(Kim et al, 2005).

라. 항진균활성의 측정

병원성 곰팡이인 *Candida albicans* (KCTC 7121), *Aspergillus flavus* (KCTC 1375) 및 *Aspergillus fumigatus* (KCTC 6145)를 사용하고 곰팡이 수는 각 웰당 2×10^3 cell가 되도록 곰팡이를 포함한 YM배지 100 μ l 분주한 후, 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 10 μ l씩 넣고, 30°C 배양기에서 24시간 방치한다. MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 용액 [5mg of MTT/ml of PBS (pH 7.4)]을 각각의 웰에 넣고 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하고 각 웰의 흡광도를 ELISA reader (Molecular Devices Emax, USA)로 570nm에서 측정 한다 (Lee et al, 1999).

마. 적혈구 용혈활성의 측정

펩타이드의 세포독성은 사람의 적혈구 용혈 활성으로 측정한다. 사람의 적혈구 (human erythrocytes)를 phosphate-buffered saline (PBS: 35mM phosphate buffer/0.15M NaCl, pH 7.0)로 세 번 세척하고, Phosphate-buffered saline으로 희석한 8.0% 적혈구 용액을 96-well microtiter plate에 100 μ l씩 loading한 후, 여기에 펩타이드 용액을 100 μ l씩 섞어 준 후, 37°C에서 1시간 배양한 후 414nm에서 흡광도 측정한다(11). 0.1% Triton X-100로 처리하였을 경우의 값을 100% 용혈도로 계산하고 펩타이드의 % hemolysis는 다음의 식에 의하여 계산 한다(Kim et al, 2006).

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{(\text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in the peptide solution} - \text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in PBS})}{(\text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in } 0.1 \% \text{ Triton X-100} - \text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in PBS})} \times 100$$

바. 동물 세포배양

급성 골수성 백혈병 세포주를 37°C, 5% CO₂와 습윤화된 배양기내에서 α -MEM 배양액 (5 6°C에서 30분간 열처리한 FBS 10%와 1x antibiotic-antimycotic 항생제를 포함)을 함유한 배양플라스크에서 부유 배양한다.

사. Cyto toxicity test (LDH assay)

분리된 단백질을 처리한 후 LDH assay를 시행하며, 적당량의 NADH solution, pyruvate solution, enzyme control을 준비하여 plate의 배지를 천천히 흔들어 섞은 후 각 well당 25 μ l씩 96 well palte에 옮긴다. 이때, enzyme control도 25 μ l씩 96 well palte에 넣는다. NADH solution을 eppendorf 8-delivery repeat pipetter를 이용해서 각 well 당 100 μ l씩 넣는다. pyruvate solution을 eppendorf 8-delivery repeat pipetter를 이용해서 각 well 당 25 μ l씩 넣는다. pyruvate solution을 넣는 즉시 반응은 시작되므로 바로 microplate reader를 이용해서 340nm에서 3분동안 흡광도를 측정한다. MTT 방법을 이용하여 AML-2/WT과 내성세포주 AML-2/D100, AML-2/DX100에서 여러 펩타이드에 대한 세포독성을 각각 측정한다.

<협동연구기관, (주) 바이오리더스>

가. 표면발현 항원 확인 방법

1) 전기 영동법

일차원 전기 영동은 Laemmli의 방법에 의해서 수행할 예정이다. 표준 크기30ml의 separating gel에 10ml of stacking gel을 사용하며 SDS-sample buffer는 0.125M Tris(pH 6.8) buffer, 2% SDS, 5% Sucrose, 5% β -mercaptoethanol 그리고 0.0025% bromophenol blue 로 이루어져 있으며, 각각 well당 100 μ g의 total protein을 loading할 예정이다. 전기 영동이 끝난 후 acrylamide gel은 Coomassie blue 염색법이나 Silver staining을 실시한다.

2) Western blot

SDS 전기 영동법에 의해 분리한 단백질은 NC paper로 옮긴 다음 2% 분말 우유액으로 blocking시킴. PBS로 30분동안 세척한 다음 단항체 상등액에서 1-2시간 정도 처리한 다음 alkaline phosphate가 연결된 이차 항체에 처리한다. 다시 PBS로 30분간 세척한 다음 NBT 와 BCIP를 시료로 하여 발색 반응을 실시한다.

<협동연구기관, 강원대학교>

가. 자돈 사료내 항균 펩타이드 P5의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구 방법

이유자돈 160두를 공시하여 (4처리 4반복, 반복당 10두) Phase I 과 phase II로 나누어 사양실험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 1두씩 (총 16두) 도축하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC	AMPT I	
			L 1	L 2
Replicate	4	4	4	4
Heads/Rep.	10	10	10	10
Sub-total	40	40	40	40
Grand total				160

* NC: Negative Control, PC: Positive Control(Antibiotics), AMPT I: Antimicrobial Peptide type I, L(1, 2): Supplemental Level

1) 조사항목

- Phase I 과 Phase II의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 소화관과 장기 발달조사
- 분 및 장내 미생물
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

나. 육계 사료내 항균 펩타이드 P5의 적정첨가수준과 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구방법

육계 240수를 공시하여 (4처리 4반복, 반복당 15수) Starter와 Finisher로 나누어 사양실험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 2수씩 (총 32수) 도계하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC	AMPT I	
			L 1	L 2
Replicate	4	4	4	4
Heads/Rep.	15	15	15	15
Sub-total	60	60	60	60
Grand total				240

* NC: Negative Control, PC: Positive Control(Antibiotics), AMPT I: Antimicrobial Peptide type I, L(1, 2): Supplemental Level

1) 조사항목

- Phase I 과 Phase II 의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 도체성장
- 소화관과 장기 발달조사
- 장내 미생물
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

다. 자돈 사료내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구방법

이유자돈 160두를 공시하여 (4처리 4반복, 반복당 10두) Phase I 과 phase II 로 나누어 사양실험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 1두씩 (총 16두) 도축하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC I	PC II	AMPT I + P
Replicate	4	4	4	4
Heads/Rep.	10	10	10	10
Sub-total	40	40	40	40
Grand total				160

* NC: Negative Control, PC I: Positive Control(Antibiotics), PC II: Positive Control(Probiotics), AMPT I + P: Antimicrobial Peptide type I + Probiotics

1) 조사항목

- Phase I 과 Phase II 의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 소화관과 장기 발달조사
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

라. 육계 사료내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구방법

육계 240수를 공시하여 (4처리 4반복, 반복당 15두) Starter와 Finisher로 나누어 사양실

험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 2수씩 (총 32수) 도축하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC I	PC II	AMPT I + P
Replicate	4	4	4	4
Heads/Rep.	15	15	15	15
Sub-total	60	60	60	60
Grand total				240

* NC: Negative Control, PC I: Positive Control(Antibiotics), PC II: Positive Control(Probiotics), AMPT I + P: Antimicrobial Peptide type I + Probiotics

1) 조사항목

- Phase I 과 Phase II 의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 도체성상
- 소화관과 장기 발달조사
- 장내 미생물
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

마. 자돈 사료내 새로운 항균 펩타이드와 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3의 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구방법

이유자돈 200두를 공시하여 (5처리 4반복, 반복당 10두) Phase I 과 phase II 로 나누어 사양실험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 1두씩 (총 20두) 도축하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC I	PC II	AMPT II	AMPT II + P
Replicate	4	4	4	4	4
Heads/Rep.	10	10	10	10	10
Sub-total	40	40	40	40	40
Grand total					200

* NC: Negative Control, PC I: Positive Control(Antibiotics), PC II: Positive Control(Probiotics), AMPT II: Antimicrobial Peptide type II, AMPT II + P: Antimicrobial Peptide type II + Probiotics

1) 조사항목

- Phase I 과 Phase II 의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 소화관과 장기 발달조사
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

바. 육계 사료내 새로운 항균 펩타이드와 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3의 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구방법

육계 300수를 공시하여 (5처리 4반복, 반복당 20수) Starter와 Finisher로 나누어 사양실험을 실시한다. 실험종료 시 반복별로 2수씩 (총 40수) 도축하여 소장의 형태학적인 발달과 장기발달 등 각 항목을 조사한다.

	NC	PC I	PC II	AMPT II	AMPT II+P
Replicate	4	4	4	4	4
Heads/Rep.	15	15	15	15	15
Sub-total	60	60	60	60	60
Grand total					300

* NC: Negative Control, PC I: Positive Control(Antibiotics), PC II: Positive Control(Probiotics), AMPT II: Antimicrobial Peptide type II, AMPT II+P: Antimicrobial Peptide type II+Probiotics

3) 조사항목

- Phase I 과 Phase II 의 성장률(증체량, 사료섭취량, 사료요구율)
- Total tract nutrient digestibility
- Apparent ileal digestibility
- 도체성상
- 소화관과 장기 발달조사
- 장내 미생물
- 소장 morphology 상태조사
- 면역반응

제 2 절 연구내용

<제1세부과제, 조선대>

- 항균 peptide 개발 및 항생제 기능 효과검증
- 기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 지닌 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아를 대상으로 항생제 기능 탐색
- 기존에 개발된 항균 펩타이드를 지닌 락토바실러스 생균제의 병원성 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색
- 기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행
- 기존에 개발된 항균 펩타이드보다 우수한 새로운 항생 펩타이드(신규 펩타이드)의 설계

<협동과제, (주)바이오리더스>

- 최적의 유산균 표면 발현 모체 선정 및 고효율 항시적 프로모터의 선정
- 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(2종)
- 숙주 유산균의 동정, 선별
- 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 유산균 형질 전환법 확립
- 펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인

<협동과제, 강원대>

- 항생제 대체제로서 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5의 항생제 대체 규명
- 자돈을 이용한 효능검증
- 육계를 이용한 효능검증

제 3 절 연구결과를 기술

<제 1 세부과제-조선대>

가. 1차년도

1. 생물체 유래 항균펩타이드의 활성 및 유사체 펩타이드의 설계, 합성 및 항생 활성 측정

(1) Cecropin A(1-8)-Magainin 2(1-12)의 소수성 증가 및 +전극의 변화가 항균 활성에 미치는 영향

Cecropin A(1-8)-Magainin 2(1-12) 접합 펩타이드의 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20을 Lysine과 Leucine으로 치환하여 +전극과 소수성 부위를 증가시킨 Cecropin A(1-8)-Magainin 2(1-12) 유사체 펩타이드를 주형으로하여 C-말단(HSAKKF) deletion, N-말단(KKK), C-말단(KKK) addition, Hinge region GIG를 Pro으로 치환 시켜 이들의 항균활성을 측정하였으며, CA-MA의 유사체 펩타이드인 P5가 세균과 진균에 대해 각각 주형보다 4배까지 높은 항균활성(MIC :minimal Inhibitory concentration)을 나타내었다. 또한 hinge region으로 알려진 GIG를 pro으로 치환시켜도 항균활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 보아 hinge region을 pro으로 치환시킴으로서 펩타이드의 size를 줄일 수 있으며 항균활성도 유지되는 것으로 나타났다.

1) Antimicrobial effect of CA-MA and its analogues

Table 1. Amino acid sequence of CA(1-8)-MA(1-12) hybrid peptide and its analogues

Peptides	Amino acid sequence	Remarks
CA-MA	KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF- NH ₂	Parents peptide
P1	KWKLFKKIGIGKFL-NH ₂	CA-MA : C-terminal deletion (HSAKKF)
P2	KKKKWKLFKKIGIGKFL-NH ₂	P1 : N-terminal addition (KKK)
P3	KWKLFKKIGIGKFLKKK-NH ₂	P1 : C-terminal addition (KKK)
P4	KWKKKKKKPKFL-NH ₂	CA-MA : C-terminal deletion (HSAKKF) and substitution of GIG→Pro L ₄ →K ₄ , F ₅ →K ₅ , I ₈ →K ₈
P5	KWKKLLKKPLLKLLKKL-NH ₂	CA-MA : substitution of GIG→Pro L ₄ →K ₄ , F ₅ →L ₅ , K ₆ →L ₆ , I ₈ →K ₈ , K ₁₂ →L ₁₂ , F ₁₃ →L ₁₃ , L ₁₄ →K ₁₄ , H ₁₅ →K ₁₅ , S ₁₆ →L ₁₆ , A ₁₇ →L ₁₇ , F ₂₀ →L ₂₀

Table 2. Molecular weight of CA(1-8) MA (1-12) hybrid peptide and its analogues determined by MALDI-MS

Peptides	Calculated values	Observed values	Retention time
CA-MA	2402.48	2403	17,453
P1	1704.10	1706	17.825
P2	2088.30	2090	16.970
P3	2088.38	2090	15.854
P4	1585.07	1586	11.430
P5	2244.60	2246	16.822

Table 3. Antimicrobial activity of CA(1-8) MA (1-12) hybrid peptide and its analogues

Peptides	MIC : μM					
	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria		Fungal cells	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>T. beigelii</i>
CA-MA	3.125	1.56-3.125	1.56	0.19	12.5	3.25-6.25
P1	3.125	6.25	3.125	0.19	12.5	12.5
P2	3.125	1.56-3.125	1.56	0.19	12.5	3.125-6.25
P3	3.125	6.25	3.125	0.19	12.5	12.5
P4	6.25	12.5	3.125	1.56-3.125	25	25
P5	0.78	1.56	0.78-1.56	0.097	6.25	3.25

Table 4. Hemolytic activity of CA(1-8)-MA(1-12) hybrid peptide and its analogues

Peptides	% Hemolysis (μM)							
	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195
CA-MA	0	0	0	0	0	0	0	0
P1	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	0	0	0	0	0	0	0	0
P3	0	0	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0	0
Melittin	100	100	100	95	93	31	0	0

2. 개발 펩타이드의 작용 메카니즘 연구

CA-MA 유사체 펩타이드의 작용 메카니즘을 탐색하기 위하여 세포에 펩타이드를 처리한 후 형광물질인 propidiumiodide를 이용하여 그 발색정도의 흡광도를 합성펩타이드의 작용 범위 또는 어떤 형태로 항균 활성을 가지는가를 FACScan analysis를 통하여 확인하였고, 그러한 현상을 가시화시키기 위하여 Confocal laser scanning microscopy를 사용하여 펩타이드의 작용 부위를 확인하였다. 그리고 펩타이드가 세포막과의 상관관계를 확인하기 위해 막재생 효율, Potassium efflux, Trehalose 양측정, 세포막 표지물질인 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)를 이용하여 메카니즘을 탐색(Saberwal et al, 1994)하였고, 펩타이드를 처리했을 때 그 작용을 전자 현미경하에서 관찰하였다.

이들 CA-MA 및 유사체 펩타이드의 작용은 모두 세포의 막에서 영향을 받아 항생활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었으며, 특히 Confocal laser scanning microscopy를 이용한 실험의 결과에서는 펩타이드에 표지시킨 형광 물질인 FITC가 세포의 막에서 관찰된 결과 이들 펩타이드 모두가 세포의 막에서 작용하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

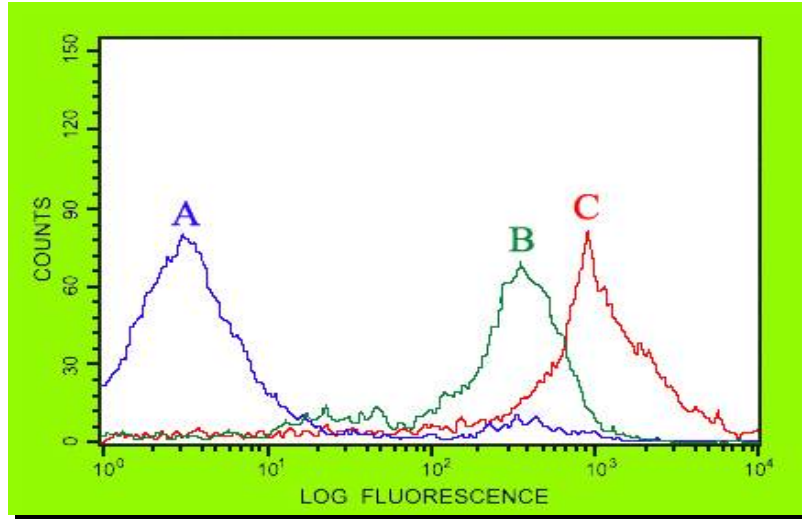


Figure 1. FACScan analysis of propidium iodide staining in *C. albicans*. *C. albicans* (2×10^5 cells in YPD media) were mixed with peptides at a concentration of 20 μM and incubated at 28°C for 30 min under constant shaking. A, control staining without any peptide treatment; B, PI staining of cells treated with CA-MA ; C, staining of cells treated with analogue P5

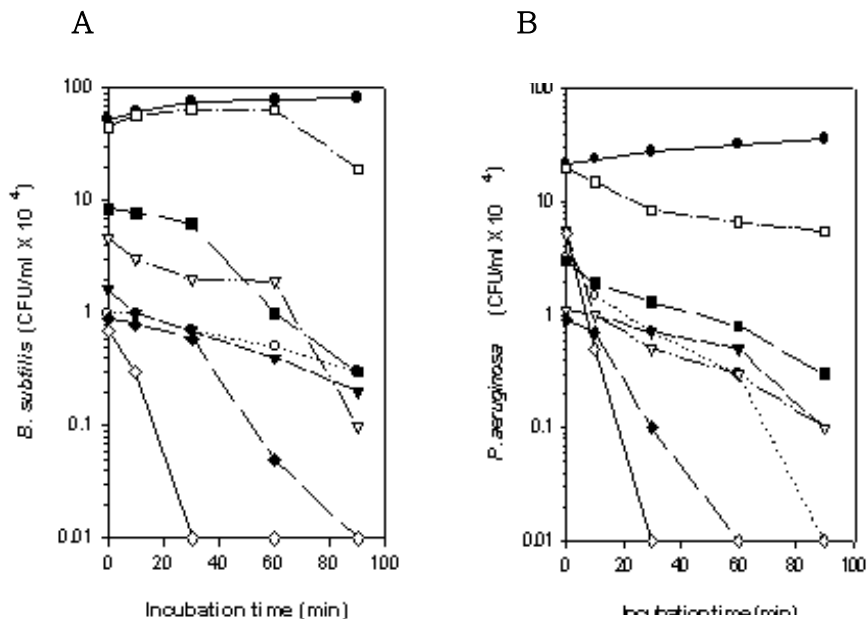


Figure 2. Measurement of fluorescence by DPH labeling in *in vivo* membrane. A : *B. subtilis*, B : *P. aeruginosa*. CA-MA (●), P1 (○), P2 (▼), P3 (▽), P4 (■), P5 (◇)

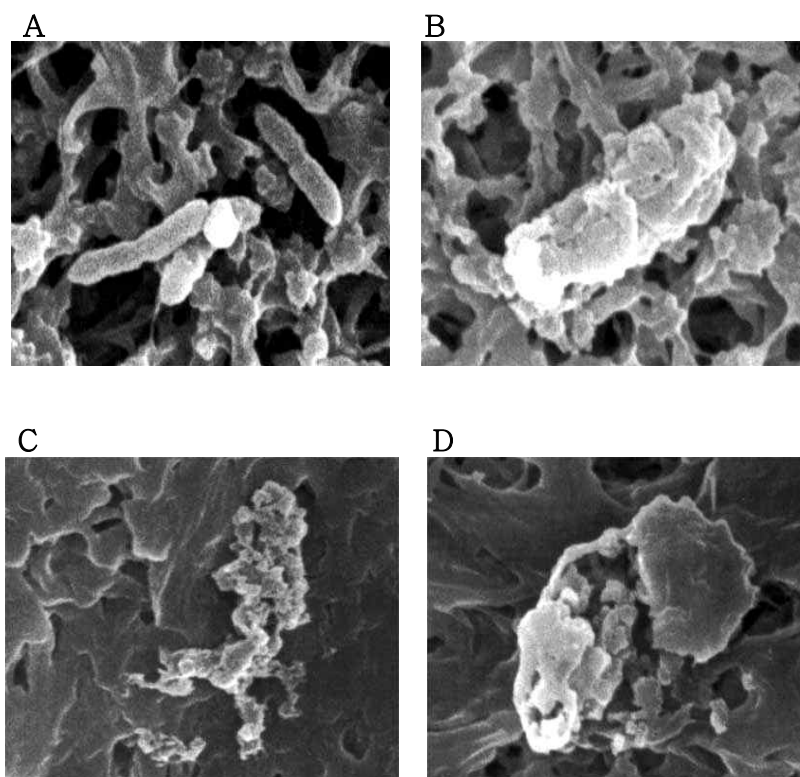


Figure 3. Scanning electron micrographs of untreated (A) and after treatment for 30 min at 37°C with 1.56 M peptides of *P. aeruginosa*. A; No treated peptide, B; CA(1-8) - MA(1-12), C; analogue P5, D; Melittin

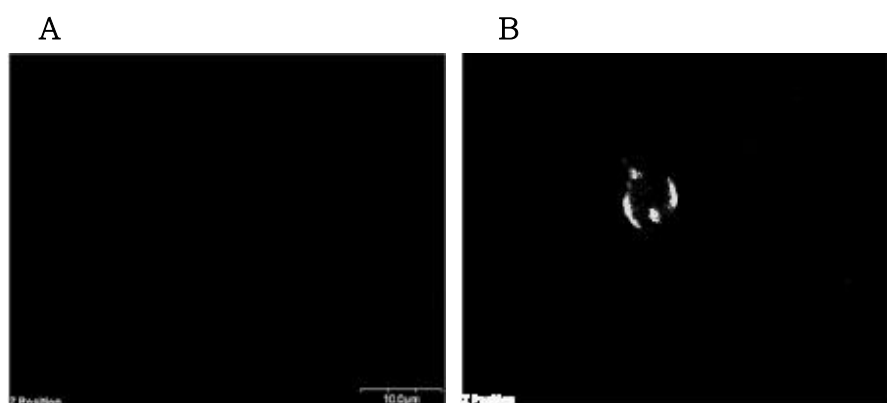


Figure 4. Confocal fluorescence microscopy of *C. albicans* cells treated with FITC-analogue P5. Exponential phase *C. albicans* cells were incubated for 15 min at 30°C with 3.125 M of FITC-labeled CA(1-8) MA(1-12) analogue P5. A; No treated peptide, B; FITC-anal P5.

3. 개발 펩타이드의 국제 학술지(SCI급) 게재

- * 학술지명: Protein & Peptide Letters, 15(20) 188-192
- * 논문명: Influence of the N- and C-terminal Regions of Leu-Lys Rich Antimicrobial Peptide on Antimicrobial Activity
- * 교신저자: 박윤경
- * 주저자: 박해균
- * 공동저자: 채병조

188

Protein & Peptide Letters, 2008, 15, 188-192

Influence of the N- and C-Terminal Regions of Leu-Lys Rich Antimicrobial Peptide on Antimicrobial Activity

Hae Kyun Park¹, Hak-Tae Lim², Byung Jo Chae³, Kyung-Soo Hahm^{1,4,*} and Yoonkyung Park^{1,5,*}

¹Research Center for Proteinoous Materials, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea; ²Division of Biotechnology, Kangwon National University, 192-1, Hyoja2-Dong, Chunchon, Kangwon-Do, 200-701, Korea; ³Dept. of Animal Resource Science, Kangwon National University, 192-1, Hyoja2-Dong, Chunchon, Kangwon-Do, 200-701, Korea; ⁴Dept. of Cellular & Molecular Medicine, School of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea; ⁵Dept. of Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity Control, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract: P5 (KWKKLLKKPLKLLKLLKLL-NH₂) is an antibacterial 18-mer Leu-Lys rich peptide from CA (1-8)-MA (1-12) hybrid peptide (CA-MA). Here we show that decreasing the net hydrophobicity and charge of CA-MA by deleting Leu- or Lys- of the N- or C-terminal regions of P5 (P10 or P11). The antimicrobial activity of the peptides was measured by their growth inhibitory effect upon *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *T. beigelii* and *C. albicans*. Antimicrobial activity required a full length C-terminus. Confocal microscopy showed that P11 was located in the plasma membrane. In this study, P11, K³K⁴L⁵L⁶-deleted peptide, acted independent on the ionic environment. Furthermore, P11 causes significant morphological alterations of the fungal surfaces as shown by scanning electron microscopy.

Keywords: Antimicrobial activity, Leu-Lys rich peptide, P11 peptide, scanning electron microscopy.

INTRODUCTION

Due to the often use of conventional antibiotics, new strains of bacteria have emerged over the last two decades, that are resistant to most, if not all available antibiotics [1-10]. Antimicrobial peptides have recently drawn much attention because of their ability to overcome such resistance and emerge as a potential new class of antibacterial agents (e.g. [11-14]).

These antibacterial peptides are known to be important components of innate immunity and the host defense system of insects, amphibians and mammals [15, 16]. Antibacterial peptides can be classified into cytotoxic peptides such as melittin (ME) that can lyse mammalian cells as well as bacterial cells [17] and peptides such as cecropin A (CA) [7, 18, 19] and magainin 2 (MA) [6] that are active only on bacterial cells. CA, a cationic 37-amino acid antimicrobial peptide was isolated from *Hyalophora cecropia* pupae [18] and MA, a cationic 23-amino acid antimicrobial peptide was discovered from the skin of the African clawed frog, *Xenopus laevis* [6]. Both CA and MA exhibit strong antibacterial activity but no cytotoxicity against normal mammalian cells.

In our previous study, CA-MA analogue P5 (P5), designed by flexible region (GIG→P)-substitution, Lys- (positions 4, 8, 14, 15) and Leu- (positions 5, 6, 12, 13, 16, 17, 20) substitutions, showed potent antibacterial activity in minimal inhibition concentration (MIC) [20].

In the present work, novel analogue peptides by decreasing the net hydrophobicity and charge by deleting Leu- or Lys- of the N- or C-terminal regions in P5 were designed and synthesized. In order to investigate the correlation between

antibiotic activity and the Leu-Lys rich short peptide the antimicrobial activity were measured against bacterial and fungal cells. Additionally, we will discuss the importance of N- or C- terminus of Leu-Lys rich peptide, the antibacterial effect of analogue using the membrane probe and its effectiveness on the damage in the cell membrane.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Peptide Synthesis

The peptides were synthesized by the solid phase method using Fmoc(9-fluorenyl-methoxycarbonyl)-chemistry [21]. Rink Amide 4-methyl benzhydrylamine (MBHA) resin (0.55 mmol/g) was used as the support to obtain a C-terminal amide peptide. The coupling of Fmoc-L-amino acids was performed with N-hydroxybenzotriazole (HOBt) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Amino acid side chains were protected as follows: *tert*-butyl (Asp and Thr), trityl (Gln), *tert*-butyloxycarbonyl (Lys and Trp), pmc (Arg). Deprotection and cleavage from the resin were carried out using a mixture of trifluoroacetic acid, phenol, water, thioanisole, 1,2-ethanedithiol and triisopropylsilane (82.5:5:5:5:2.5:2 v/v) for 3 h at room temperature. The crude peptide was then repeatedly washed with diethylether, and dried in a vacuum. The crude peptides were purified by a reversed-phase preparative HPLC on a Waters 15- μ m Deltapak C₁₈ column (19 X 30 cm). The purified peptides were hydrolyzed with 6 N HCl at 110 °C for 22 h, and then dried in a vacuum. The residues were dissolved in 0.02 N HCl and subjected to an amino acid analyzer (Hitachi Model, 8500 A, Japan). Peptide concentration was determined by amino acid analysis. The molecular masses of the peptides were confirmed with MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) mass spectrometer.

1.2. Antibacterial Activity

Staphylococcus aureus (KCTC 1621), *Bacillus subtilis* (KCTC 1918), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637),

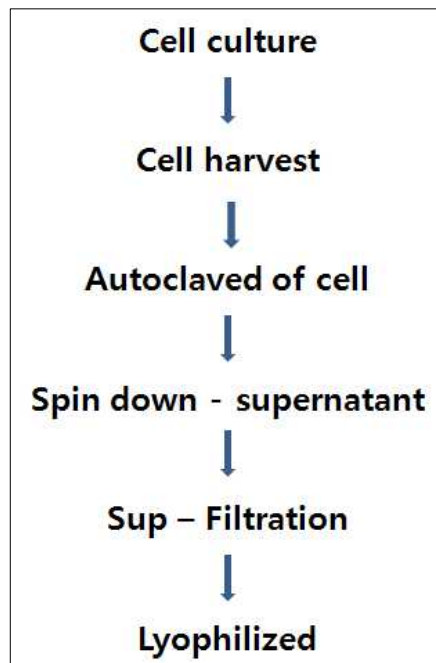
*Address correspondence to these authors at the Research Center for Proteinoous Materials, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea; Tel: 82-62-230-7556; Fax: +82-62-227-8345; E-mail: kshahm@chosun.ac.kr, y_k_park@chosun.ac.kr

나. 2차년도

1. 항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체제 실험을 위한 대량 생산

1차년도 항균활성이 우수하다고 선정된 peptide(P5) 락토바실러스 생균제의 대량생산하는 절차이다. P5 항생제 기능성 펩타이드는 1차년도에 설계된 펩타이드를 락토박실러스에 표면 발현 시킨 펩타이드 (Peptide(P5) 락토바실러스 생균제)로써 Cecropin A(1-8)-Magainin 2(1-12) 접합 펩타이드의 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20을 Lysine과 Leucine으로 치환하여 +전극과 소수성 부위를 증가시킨 Cecropin A(1-8)-Magainin 2(1-12) 유사체 펩타이드를 주형으로하여 C-말단(HSAKKF) deletion, N-말단(KKK), C-말단(KKK) addition, Hinge region GIG를 Pro으로 치환시킨 펩타이드이다.

이 Peptide(P5) 락토바실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양 후, peptide(P5) 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토박실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸 시켰다. 이후, 원심분리기를 이용하여 세포를 분획시키고, 상층액만 분리하여 filtration을 통과 시켰다. 마지막으로 filtration을 통과한 상층액을 동결건조기를 이용하여 분말화 시켰다 (Lee et al, 1995).



(1) Peptide (P5) 락토바실러스 생균제의 대량 생산 후 항생제 기능성 실험 결과

	MRS 배지	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lac+P5</i>
<i>E.coli</i>	0.125	0.0625
<i>S.aureus</i>	0.125	0.0625
<i>C.albicans</i>	1	0.5

: 분말화된 상태의 Peptide(P5)를 펩타이드 활성을 유지하는지 확인하기 위하여 그람 음성균 (*E. coli*), 그람 양성균(*S. aureus*) 및 병원성 곰팡이(*C. albicans*)에서 항생 활성을 측정하였다. 그 결과, 합성 상태의 P5 펩타이드와 항생제 기능성에서 유사한 항생 활성 결과를 나타냈다.

2. 신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색

(1) *Helicobacter pylori* 유래의 HP (2-20) 펩타이드에서 소수성 영역이 항생활성에 미치는 영향

Helicobacter pylori 유래의 HP (2-20) 펩타이드의 α -helical wheel diagram을 중심으로 펩타이드의 amphiphatic α -helical structure에서 hydrophobic region을 증가시키는 유사체 펩타이드를 설계하였다. *Helicobacter pylori* 유래의 HP (2-20) 펩타이드 및 그 유사체 펩타이드에 대해 항균, 항진균활성을 측정한 결과, 17번 위치의 Glutamine (Q)과 19번 위치의 Aspartic acid (D)를 Tryptophan (W)으로 치환 시켜 소수성 부위를 가장 많이 증가시킨 유사체 펩타이드(A3)가 HP (2-20) 보다 Gram-positive, Gram-negative bacteria에서 10배 이상의 항균활성이 증가되었으며 fungi에서는 4배 정도의 항진균 활성이 증가되었다. HP (2-20)의 hydrophobicity의 증가는 항균 및 항진균 활성을 증가시켰다. 따라서 적혈구 용혈 활성을 가지지 않으며 HP (2-20)의 아미노산 서열을 바탕으로 하여 높은 항균, 항진균활성을 나타내는 이상적인 항생 펩타이드를 얻기 위하여서는 아미노산의 적절한 hydrophobicity의 유지가 필요하다는 사실을 알았다. 이것은 펩타이드의 소수성부위와 친수성 부위의 비율도 항균활성에 중요한 영향을 미치는 것을 규명하였다.

Table 1. Amino acid sequences of synthetic antimicrobial peptide derived from *H. pylori* ribosomal protein L1 and its analogue peptides

Peptides	Amino acid sequences	Remarks
HP(2-20)	Akkvfrleklfskiqndk-NH ₂	Native
A1	Akkvfrleklfskiqnwk-NH ₂	(D ¹⁹ → W ¹⁹)
A2	Akkvfrleklfskiwndk-NH ₂	(Q ¹⁷ → W ¹⁷)
A3	Akkvfrleklfskiwnwk-NH ₂	(Q ¹⁷ D ¹⁹ → W ¹⁷ W ¹⁹)
A4	Akkvfrleksfskiqndk-NH ₂	(L ¹² → S ¹²)
A5	Akkvskrleklfskiqndk-NH ₂	(F ⁶ → S ⁶)

Table 2. Molecular weights of the peptides determined by MALDI-MS

Peptides	Observed value	Calculated value	Retention time (min)
HP(2-20)	2320	2319.38	17.821
A1	2390	2390.43	19.539
A2	2377	2377.40	20.946
A3	2448	2448.45	22.375
A4	2295	2293.33	10.680
A5	2261	2259.34	15.408

Table 3. Antibacterial activities of HP(2-20) and its analogue peptides

Peptides	MIC : μM			
	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
HP(2-20)	3.12	12.5	12.5	6.25
A1	0.78	6.25	3.12	0.78
A2	0.78	6.25	3.12	3.12
A3	0.39	0.78	1.56	0.39
A4	12.5	50	25	12.5
A5	6.25	50	12.5	12.5
Melittin	0.19	0.78	1.56	1.56

Table 4. Antifungal activities of HP(2-20) and its analogue peptides

Peptides	MIC : μM		
	<i>C. albicans</i>	<i>T. beigelii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
HP(2-20)	25	12.5-25	25
A1	12.5	6.25	12.5
A2	12.5	6.25-12.5	12.5
A3	6.25	3.12	3.12-6.25
A4	50-100	50	50
A5	100	50	50-100
Melittin	3.12	3.2-6.25	3.12

(2) 신규 펩타이드의 세포 독성 실험 수행

분리한 A3가 세포독성을 갖는지의 여부를 측정하기 위하여 사람의 적혈구 세포만을 분리한 후 HP(2-20) 및 그 유사체 펩타이드를 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. 반면, 항생펩타이드인 멜리틴(melittin)펩타이드는 낮은 농도에서도 아주 강한 세포 독성을 나타냄으로써 개발한 A3펩타이드가 항생제 기능은 강하면서 세포독성은 전혀 나타내지 않는 결과를 나타내었다.

Table 1. Hemolytic activity of HP(2-20) and its analogues

Peptide	% Hemolysis (μ M)						
	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5
HP(2-20)	0	0	0	0	0	0	0
A1	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	18
A3	0	0	0	0	0	0	0
A4	0	0	0	0	0	0	0
A5	0	0	0	0	0	0	0
Melittin	0	0	12	30	60	86	100

(3) 신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체제 실험을 위한 대량 생산

2차년도 항균활성이 우수하다고 선정된 신규 peptide(A3) 락토바실러스 생균제의 대량생산은 Peptide(A3) 락토바실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양 후, peptide(A3) 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토박실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸 시켰다. 이후, 원심분리기를 이용하여 세포를 분획시키고, 상층액만 분리하여 filtration을 통과시켰다. 마지막으로 filtration을 통과한 상층액을 동결건조기를 이용하여 분말화시켰다.

	MRS 배지	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lac+A3</i>
<i>E.coli</i>	0.125	0.0625~0.125
<i>S.aureus</i>	0.125	0.0625~0.125
<i>C.albicans</i>	1	0.5

: 분말화된 상태의 Peptide(A3)를 펩타이드 활성을 유지하는지 확인하기 위하여 그람 음성균 (*E. coli*), 그람 양성균(*S. aureus*) 및 병원성 곰팡이(*C. albicans*)에서 항생 활성을 측정하였다. 그 결과, 합성 상태의 A3 펩타이드와 항생제 기능성에서 유사한 항생 활성 결과를 나타냈다.

3. 개발 펩타이드의 국제 학술지(SCI급) 게재

(1) Isolation and Characterization of an Extracellular Antimicrobial Protein from *Aspergillus oryzae*

- * 학술지명: J. Agri. Food Chem, 2008, 56, 9647--9652 (SCI급)
- * 교신저자: 박윤경
- * 주저자: 박성철
- * 공동저자: 채병조

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9647-9652 9647

**Isolation and Characterization of an Extracellular
Antimicrobial Protein from *Aspergillus oryzae***

SEONG-CHEOL PARK,[†] NAE CHOON YOO,[‡] JIN-YOUNG KIM,[†] HAE KYUN PARK,[†]
BYUNG JO CHAE,[§] SONG YUB SHIN,^{†,||} HYEONSOOK CHEONG,[‡]
YOONKYUNG PARK,^{*,†,‡} AND KYUNG-SOO HAHM^{*,†,||}

Research Center for Proteinoous Materials (RCPM), Department of Cellular and Molecular Medicine,
College of Medicine, and Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity Control,
Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea, Yonsei University College of Medicine, 134
Shinchon-Dong, Seodaemun-Gu, Seoul, 120-752, Korea, and Kangwon National University,
Chuncheon, Korea

A 17 kDa antimicrobial protein was isolated from growth medium containing the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* by extracting the supernatants from the culture media, ion exchange chromatography on CM-sepharose, and C18 reverse-phase high-performance liquid chromatography. This antimicrobial protein, which we considered to be an extracellular antimicrobial protein from *A. oryzae* (exAP-AO17), possessed antimicrobial activity but lacked hemolytic activity. The exAP-AO17 protein strongly inhibited pathogenic microbial strains, including pathogenic fungi, *Fusarium moniliform* var. *subglutinans* and *Colletotrichum coccodes*, and showed antibacterial activity against bacteria, including *E. coli* O157 and *Staphylococcus aureus*. To confirm that the protein acts as a regulation factor for extracellular secretion, we examined growth under varying conditions of N sources, C sources, ions, ambient pH, and stress. Various culture conditions were found to induce characteristic changes in the expression of protein synthesis as analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Highly basic polypeptides were regulated by suppressing the ambient pH under acidic conditions and strongly induced under alkaline conditions, thus confirming that pH regulation is physiologically relevant. The expression of exAP-AO17 was upregulated by heat shock upon growth in the presence of NaCl. Automated Edman degradation showed that the N-terminal sequence of exAP-AO17 was NH₂-GLPGPAGAVGFAGKDQNM-. ExAP-AO17 showed partial sequence homology with a collagen belonging to the animal source. These results suggest that exAP-AO17 is an excellent candidate as a lead compound for the development of novel oral or other types of anti-infective agents.

KEYWORDS: Antimicrobial activity; *Aspergillus oryzae*; exAP-AO17; homology with a collagen; anti-infective agents

INTRODUCTION

Organisms use different defense systems, including the production of antimicrobial proteins (1-4), lectins (5), secondary metabolites, membrane-interacting proteins, and antifeedant proteins (6), to fight against microbial pathogen infections. Several antimicrobial proteins, which apparently belong to a host defense system against invasive infection, have been isolated from prokaryotes and eukaryotes (7-11). These proteins show wide variation in length and amino acid composition but are characterized by compact structures, thermal stability, and potent antimicrobial activity. Antimicrobial proteins are a part of the innate immune system widely distributed in nature, and they play the key roles in defending the host against invasive pathogens (12).

Filamentous fungi have the unique abilities to economically produce and secrete many different types of products (e.g., antibiotics, commodity chemicals, and enzymes) (13) and to grow on a wide variety of inexpensive substrates. An important characteristic of the filamentous fungi used in these industries is their high-efficiency production of various kinds of enzyme production. Furthermore, because filamentous fungi, especially species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, have a long history of use in the food and beverage industries, they have been granted GRAS (generally regarded as safe) status. Ar-

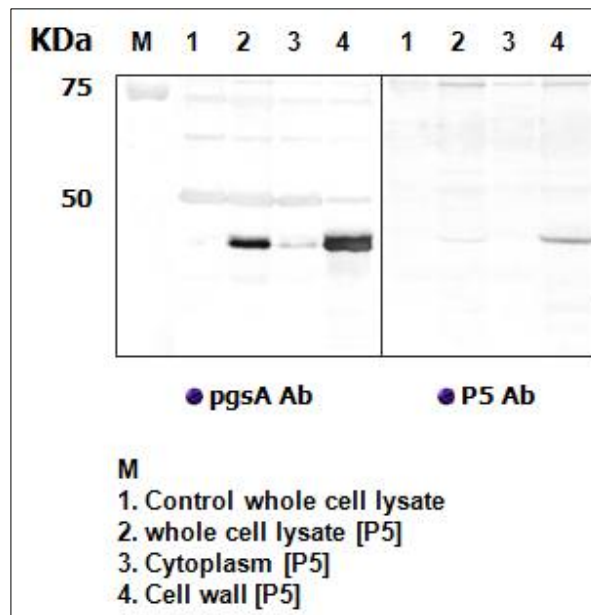
* To whom correspondence should be addressed. (K.-S.H.) Fax: +82-62-227-8345. E-mail: kshahm@chosun.ac.kr. (Y.P.) Fax: +82-62-230-6854. E-mail: ykpark@chosun.ac.kr.
[†] Research Center for Proteinoous Materials (RCPM), Chosun University.
[‡] Yonsei University College of Medicine.
[§] Kangwon National University.
^{||} College of Medicine, Chosun University.
[‡] Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity Control, Chosun University.

다. 3차년도

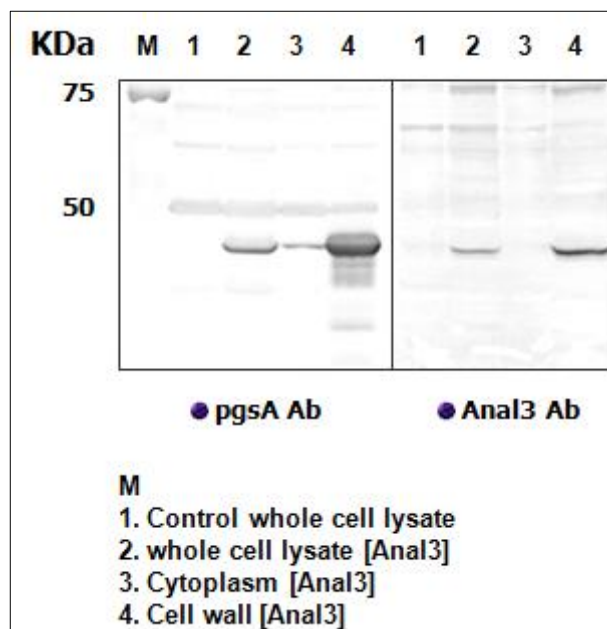
1. 항생제 활성 단백질의 분자량 확인

1, 2차년도 항균활성이 우수하다고 선정된 신규 peptide(P5) 및 peptide(A3)를 이용하여 락토바실러스 생균제에 표면 발현한 후, 이들 펩타이드가 원래의 단백질 분자량을 유지하는지 확인하였다.

(1) P5의 분자량 확인



(2) A3의 분자량 확인



2. 분리 단백질(펩타이드)의 분리 효율 검증

1, 2차년도 항균활성이 우수하다고 선정된 신규 peptide(P5) 및 peptide(A3) 락토바실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양 후, peptide(P5) 및 peptide(A3) 락토바실러스 생균제만을 수확하고, 락토박실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸 시켰다.

(1) Antimicrobial of *Lactobacillus*

	MRS 배지			제조배지		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lac+A3</i>	<i>Lac+P5</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lac+A3</i>	<i>Lac+P5</i>
<i>E.coli</i>	0.125	0.0625~0.125	0.0625	0.250	0.125~0.250	0.125
<i>S.aureus</i>	0.125	0.0625~0.125	0.0625	0.250	0.125~0.250	0.125
<i>C.albicans</i>	1	0.5	0.5	-	-	-

: 분말화된 상태의 peptide(P5) 및 peptide(A3)를 펩타이드 활성을 유지하는지 확인하기 위하여 그람 음성균(*E. coli*), 그람 양성균(*S. aureus*) 및 병원성 곰팡이(*C. albicans*)에서 항생 활성을 측정하였다. 그 결과, 합성 상태의 P5 및 A3 펩타이드와 항생제 기능성에서 유사한 항생 활성 결과를 나타냈다.

(2) peptide(A3) 락토바실러스 생균제의 일반 항생제와의 활성 비교 자료

Antibacterial activity of resistant strain from Animals

(mg/ml)

Pathogens from animals	
뉴아프라메드	20
아프라란(한국유업)	20
아프라마이신	20
콜리시틴(한국유업)	>20
콜리시틴(다원메디칼)	>20
아빌라마이신	>20
TE알파마	>20
HPA3	0.04

(3) peptide(A3) 락토바실러스 생균제의 일반 항생제와의 활성 비교 사진



Control



뉴아프라에드
(20mg/ml)



아프라란(한국유업)
(20mg/ml)



아프라마이신
(20mg/ml)



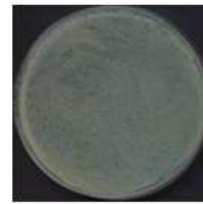
콜리시틴(한국유업)
(20mg/ml)



아빌라마이신
(20mg/ml)



콜리시틴(다원메디칼)
(20mg/ml)



TE 알파마
(20mg/ml)



HPA3
(20µg/ml)

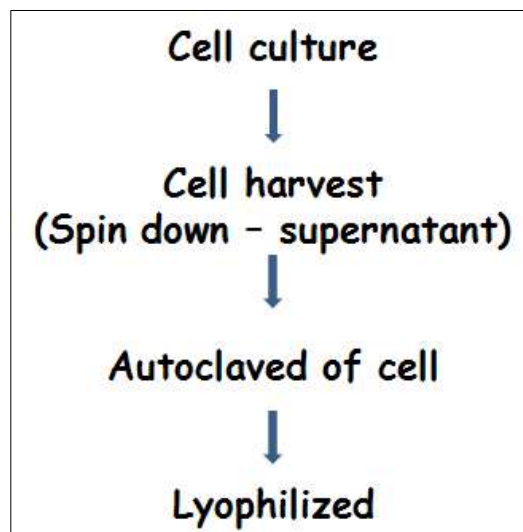


HPA3
(40µg/ml)

3. 최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량생산 기술의 단순화

(1) 1, 2차년도 항균활성이 우수하다고 선정된 peptide(P5) 및 peptide(A3) 락토바실러스 생균제의 대량생산 단순화

항생제 기능성 peptide(P5) 및 peptide(A3)는 1, 2차년도에 설계된 펩타이드를 락토박실러스에 표면 발현 시킨 펩타이드 (Peptide(P5) 및 peptide(A3) 락토바실러스 생균제)로써 락토박실러스 생균제를 바이오리액터를 이용하여 대량 배양 후, peptide(P5) 및 peptide(A3) 락토박실러스 생균제만을 수확하고, 락토박실러스 생균제는 멸균기를 이용하여 사멸 시켰다. 이후, 1차년도에서 수행했던 filtration 과정을 제외하고 원심분리 후 바로 세포를 분말화 함으로써 시간적 그리고 경제적으로 훨씬 단순화 시킨다.



<제 1 협동과제-바이오리더스>

가. 1차년도

1. 유용 펩타이드 항생물질의 선별(P5)

지금까지 알려진 펩타이드 항생물질들은 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -쉬트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -회전형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한 (proline-rich) 펩타이드로 구분된다. 이러한 펩타이드 항생물질들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많이 존재하는 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드(Hoffman, 1995)인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다. 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대한 많은 연구가 보고되었고, 현재까지 보고된 대표적인 양친화성 펩타이드는 마가이닌 2(magainin 2, MA), 세크로핀 A(cecropin A, CA) 및 멜리틴(melittin, ME) 펩타이드 등이 있다. 또한, 이러한 펩타이드들의 일부 서열을 재조합시킨 접합 펩타이드 (conjugation peptde)를 제조하여 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드를 제조할 수 있음이 보고되고 있다. 이러한 대표적 양친화성 펩타이드인 마가이닌 2(magainin 2, MA)와 세크로핀 A(cecropin A, CA)를 접합한 펩타이드(CA-MA)를 주형으로 하여 새롭게 합성한 펩타이드 항생물질 P5를 본 연구의 펩타이드 항생물질로 선별하였다(Figure 1).

2. 유산균 표면발현 모체 선정

바실러스 속 균주 (*Bacillus subtilis* Chungkookjang)에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질 유전자(pgsBCA 효소계)를 유산균 표면발현 모체로 선정하였다. 폴리감마글루탐산의 생합성에 관여하는 단백질은 3개 (PgsB, PgsC, PgsA)로 구성되어 있으며 이들 단백질의 상동성을 조사한 결과 PgsB는 세포막의 안쪽에 위치하여 글루탐산의 연결에 관여하는 것으로 추측되고, PgsC는 세포막에 위치하여 고분자량의 폴리감마글루탐산 폴리머를 세포밖으로 내보내는 통로 역할을 하는 porine 단백질로 추정되며, PgsA는 폴리감마글루탐산을 직접 세포밖으로 수송하는 transport의 역할을 하는 것으로 추정되었다. 폴리감마글루탐산 생산에 관여하는 생합성계 효소 중 PgsA의 2차구조를 TM Pred server와 TMHMM server에서 분석한 결과, N-terminal region (26 a.a-44 a.a)에 putative transmembrane region의 존재와 outermembrane protein과의 상동성을 보유하고 있음을 확인 할 수 있었고, 따라서 PgsA 단백질의 주된 기능은, 세포외벽에 존재하면서 거대분자량의 폴리감마글루탐산의 합성 또는 세포 내에서 생성된 폴리감마글루탐산을 외부로 transfer하는 역할을 가지고 있을 것으로 추정되었다. PgsA가 세포외벽에 존재하면서 폴리감마글루탐산의 생합성 또는 transporter로서의 역할을 수행한다면 PgsA 단백질은 세포외벽에서 매우 안정적인 구조를 유지할 것으로 예상되어 본 연구에서는 PgsA 단백질의 1차, 2차 구조분석을 통하여 단백질의 3차구조를 유추하고

이를 바탕으로 세균의 표면에 외래 항원 단백질을 발현시킬 수 있는 표면 발현 모체 (motif)로서의 가능성을 확인하였다. 이러한 가능성을 토대로 폴리 감마 글루탐산을 합성하는 합성효소계 유전자 중에서 pgsA를 국내 전통 발효식품인 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* chungkookjang ((주) 바이오리더스 특허 균주)로부터 분리가 되어 cloning하였다.

3. 고효율 항시적 프로모터 선정

유산균에서 항시적으로 단백질을 발현시킬 수 있는 프로모터 선정을 위해서 *Lactococcus lactis* 유래의 citrate permease 프로모터, *Pediococcus* 유래의 SlpA 프로모터, (주) 바이오리더스가 보유하고 있는 *Bacillus* 균주 유래의 고발현 HCE (High Constitutive Expression) 프로모터 등을 이용하여 유산균에서의 발현을 비교한 결과 고발현 SlpA promoter의 효율이 가장 높아 유산균 표면발현 벡터를 위한 프로모터로 선정하였다.

4. 표면발현용 발현벡터 구축

유산균에서 항시적으로 단백질을 발현시킬 수 있는 SlpA promoter와 폴리 감마 글루탐산 합성효소계 유전자 pgsB, pgsC, pgsA중 표면발현모체로 pgsA 유전자를 그리고 gram-negative균에서 그리고 gram-positive균에서 각각 복제가 가능하도록 두개의 replication origin 부위를 함유한 대장균-유산균 shuttle 표면발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA를 제작하였다(Figure 1). 이때 유산균에서 복제가 가능하도록 도와주는 origin 부위는 당사가 보유한 장내정착형 유산균인 *Lactobacillus casei*에서 추출한 plasmid를 sequencing하고 이 plasmid내 origin 부위를 cloning하여 그 정보를 기초로 한 것이다.

5. 숙주 유산균의 동정 및 유산균 형질전환법 확립

숙주유산균의 동정을 위해서 자체 plasmid를 갖고 있지 않은 인체 장내에서 정착하는 유산균 *Lactobacillus casei* L525와 *Lactococcus lactis* 1403를 분리 동정하여 숙주 유산균으로서의 유용성을 검증하였고, 분리 동정한 유산균에 유산균 표면발현 벡터를 형질전환할 수 있는 형질전환법을 확립하였다.

그 방법을 요약하면 Plasmid (형질전환 시키고자하는 DNA)를 competent cell (*Lactobacillus casei* L525와 *Lactococcus lactis* 1403)에 10 μ l 접종후 cuvette (0.2cm electrode gap)에 주입 후 5분간 얼음에서 방치 후 Gene pulser로 전기 pulse [25 μ F, 2kV, 200 Ω]를 주고, 900 μ l SGM17MC medium을 섞어 거품이 생기지 않도록 잘 혼탁한 후 37 $^{\circ}$ C, 1 hours 이상 Incubation을 시켜 배양액을 selection medium에 100 μ l spreading 후 3-4일 후에 colony를 확인하였다.

6. 펩타이드 항생물질의 표면 발현 벡터 제작

선정된 펩타이드 항생물질 P5의 유전자를 합성하고 유전자 조작에 의해 제작된 유산균 표면발현 벡터 pHCE1LB-pgsA에 삽입하여 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터 pHCE1LB-pgsA:P5와 pHCE1LB를 제작하였다(Figure 1).

그 방법을 요약하면 제작한 유산균 표면발현 벡터 pAT/SlpA:pgsA에 펩타이드 항생물질 P5를 코딩하는 유전자를 도입하기 위하여 펩타이드 P5를 코딩하는 유전자 primer 1 [5'-ga tcc aag tgg aag aaa ctg ctc aag aaa ccg ctg ctc aag aag ctg ctc aag aaa ctg ta - 3'] 및 primer 2 [5'- aag cta cag ttt ctt gag cag ctt ctt gag cag ccgg ttt ctt gag cag ttt ctt cca ctt g - 3']를 혼합하여 denature로 95°C에서 5분 동안 그리고 37°C에서 1시간 동안 annealing하여 65 bp크기의 DNA를 얻었다. 이 DNA 단편은 표면 발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA에 존재하는 제한효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었고, 상기 annealing된 P5 유전자를, 미리 제한효소 BamH I과 Hind III로 처리된 표면 발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA와 혼합하고 연결하여 위의 P5 유전자가 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈이 맞추어지도록 결합하여 P5를 표면발현시킬 수 있는 벡터 pAT/SlpA:pgsA-P5를 제작하였다.

7. 펩타이드 항생물질의 유산균 발현 유도 및 확인

제작한 유산균 표면발현 벡터 pAT/SlpA:pgsA-P5를 *Lactobacillus casei* L525에 형질전환시키고 배양을 하면서 발현을 유도하여 표면발현 모체인 pgsA와 융합된 펩타이드 P5가 유산균에서 발현되는 지를 확인하였다. 형질전환된 *Lactobacillus casei* L525 균주를 항생제인 에리스로마이신 20 mg/L가 첨가된 200 ml의 MRS배지를 포함하는 500 ml 플라스크에서 정체 배양 증식시키고 *Lactobacillus casei* L525내 pAT/SlpA:pgsA-P5의 존재를 확인한 후 (Figure 2), pgsA와 융합된 펩타이드 P5 융합단백질의 발현을 조사하였다(Figure 3). 폴리감마 글루탐산 합성에 관여하는 유전자 pgsA의 C-말단과 융합된 펩타이드 항생물질 P5의 유산균내 발현은 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 pgsA에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다.

구체적으로 pAT/SlpA:pgsA-P5로 형질전환된 *Lactobacillus casei* L525를 MRS 배지 (*Lactobacillus* MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 37°C에서 증식시킴으로 표면발현을 유도하였다. 발현을 유도한 *Lactobacillus casei* L525를 동일한 세포 농도에서 단백질을 얻은 후 이를 denature시켜 시료를 준비하고 이를 SDS-PAGE로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF membrane (polyvinylidene-difluoride membranes, Bio-Rad)에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액 (50 mM 트리스 염산, 5 % 스킴 밀크(skim milk), pH 8.0)에 담가 1시간 동안 교반하여 블로킹시킨 다음 pgsA에 대한 토끼 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 12시간 동안 반응시켰고, 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 바이오틴이 접합된 토끼에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 아비딘-바이오틴 (avidin-biotin)시약을 1시간 동안 반응시켜 다시 세척하였

다. 세척된 멤브레인에 기질과 발색시약으로 H_2O_2 와 DAB 용액을 첨가하여 발색시키고 pgsA 에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다. 그림 7 에서 레인 1 은 형질전환되지 않은 숙주세포인 *Lactobacillus casei* L525이고, 레인 2는 형질전환된 pAT/SlpA:pgsA-P5/*Lactobacillus casei* L525 임. 그림에서 보는 바와 같이, pAT/SlpA:pgsA-P5 에 의해서 약 44 KDa의 융합 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. pgsA 가 약 41.8 KDa이고, 펩타이드 P5가 약 2.2 KDa이므로 44 KDa를 나타내는 밴드는 pgsA와 펩타이드 P5가 융합된 융합단백질임을 확인 할 수 있었다.

8. 펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균작용 확인

(1) 펩타이드 항생물질 P5 표면 발현하는 생균 유산균의 항진균작용 확인

펩타이드 항생물질 P5를 표면 발현하는 유산균의 항진균활성을 측정하기 위해 병원성 진균인 *Candida albicans* (TIMM 1768)를 대상으로 항진균활성의 가시화실험 [plate 생육억제 실험]을 수행한 결과 *Candida albicans*에 대하여 각각 높은 항진균활성을 확인하였다(Figure 4, a). 펩타이드 항생물질 P5를 표면 발현하는 유산균을 사균화시킨 후의 항진균활성을 측정하기 위해 병원성 진균인 *Candida albicans*를 대상으로 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 통한 항진균활성을 측정하였다. 사균화된 유산균의 *Candida albicans*에 대한 항진균활성을 확인하였다(Figure 4, b).

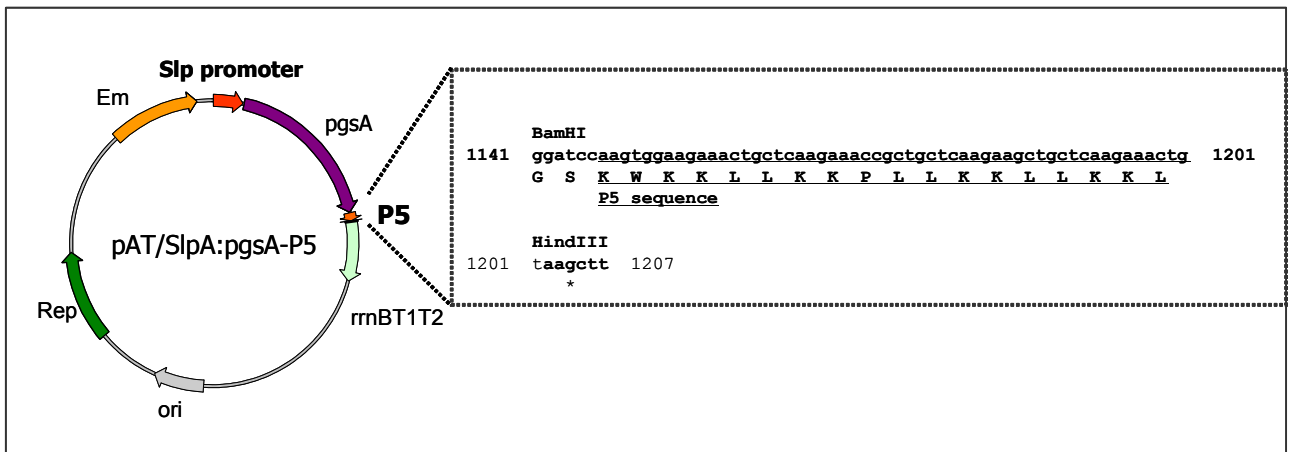


Figure 1. 유용펩타이드 P5의 유전자 합성 및 유산균 표면발현용 벡터 plasmid.

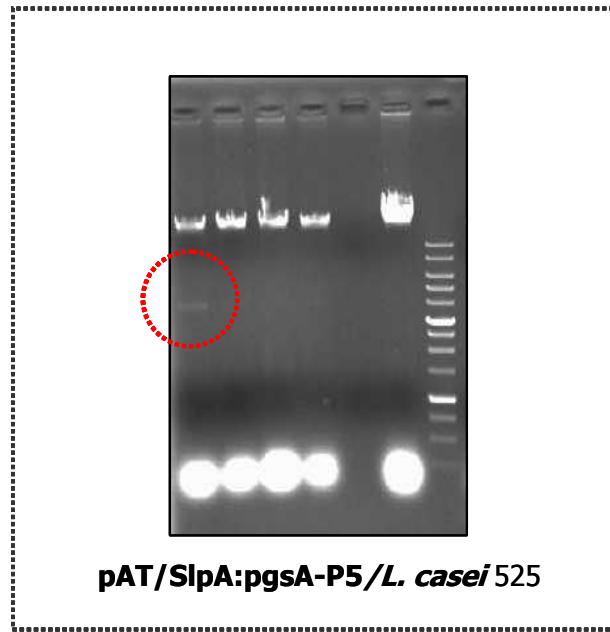


Figure 2. 형질전환 유산균내 유산균 표면발현용 벡터의 확인.

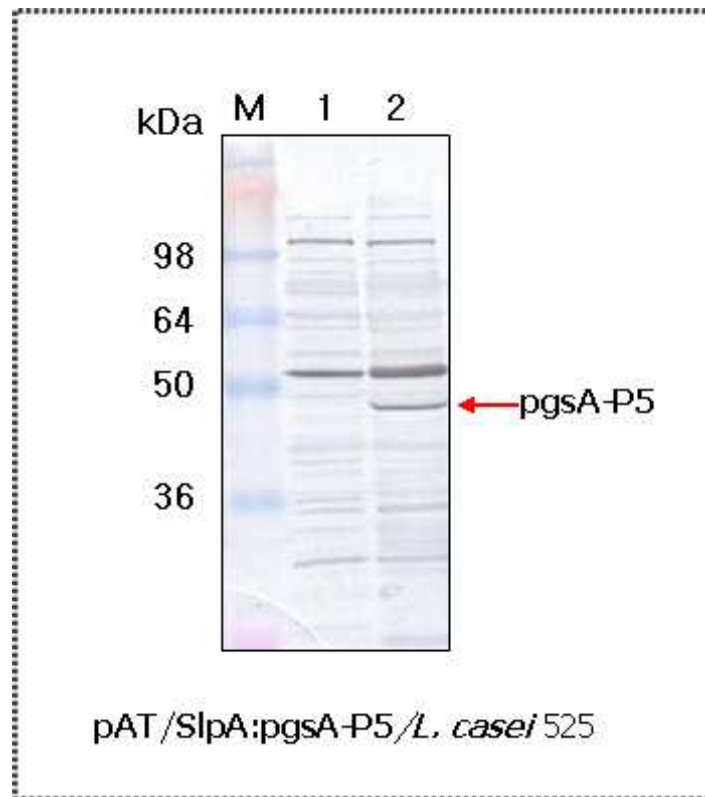
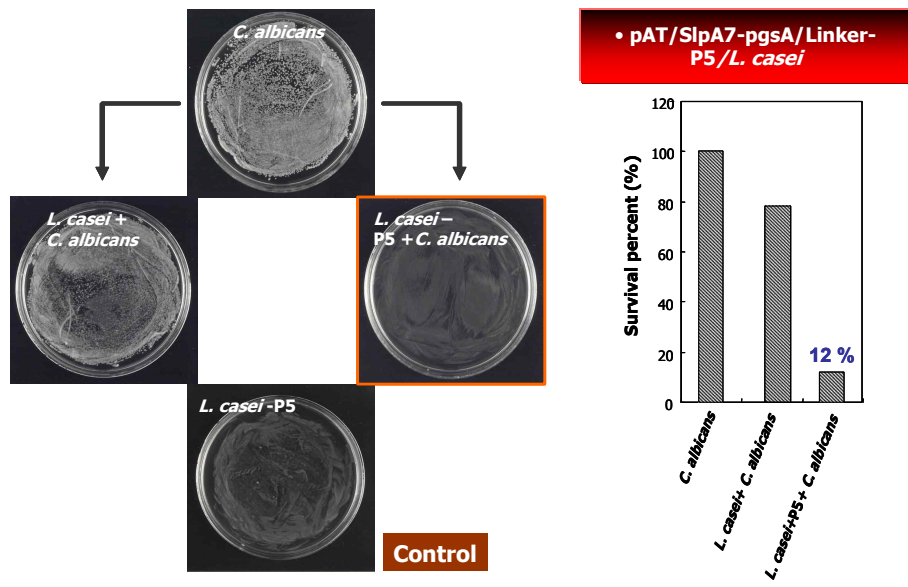


Figure 3. 형질전환 유산균내 펩타이드 항생물질의 발현 확인.

a)



b)

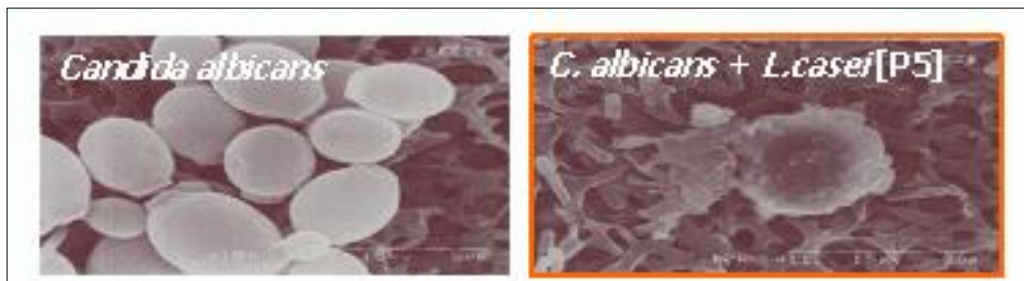


Figure 4. 항균 펩타이드 P5를 표면발현하는 유산균의 항진균활성 확인.

나. 2차년도

1. 유용 펩타이드 항생물질의 선별(Anal3)

헬리코박터 파일로리균 유래의 RPL1이라는 단백질 내 아미노말단 부위는 완벽한 양친화성 나선모양 구조를 가지는데 이러한 양친화성 펩타이드는 세포막의 지질 성분과 유사한 구조를 지니므로 미생물의 세포막 지질과 결합함으로써 미생물의 세포막을 파괴하거나, 세포막의 전위에 영향을 주어 이를 변화시킴으로써 미생물을 파괴한다는 작용 기작이 보고되어 있다. 이에 양친화성을 갖는 헬리코박터 파일로리균의 RPL1 단백질의 아미노말단 부위 중 특정 부위 서열과 상기 서열 중 일부를 다른 아미노산으로 치환시킴으로써 소수성 부위를 증가시키는 양친화성 구조로 펩타이드 유도체를 설계하고 합성하여 Anal3라는 합성펩타이드를 제작하였고 이를 본 연구의 펩타이드 항생물질로 선별하였다.

2. 표면발현용 발현벡터 구축

1차년도에서 선정한 유산균 표면발현 모티브와 유산균에서 항시적으로 작동하여 단백질을 발현시킬 수 있는 프로모터인 SlpA promoter와 폴리 감마 글루탐산 합성효소계 유전자 pgsB, pgsC, pgsA중 표면발현모체로 pgsA 유전자를 그리고 gram-negative균에서 그리고 gram-positive균에서 각각 복제가 가능하도록 두개의 replication origin 부위를 함유한 대장균-유산균 shuttle 표면발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA를 제작 하였다(Figure 1). 이때 유산균에서 복제가 가능하도록 도와주는 origin 부위는 당사가 보유한 장내정착형 유산균인 *Lactobacillus casei*에서 추출한 plasmid를 sequencing하고 이 plasmid내 origin 부위를 cloning하여 그 정보를 기초로 한 것이다.

3. 숙주 유산균의 동정 및 유산균 형질전환

숙주유산균의 동정을 위해서 자체 plasmid를 갖고 있지 않은 인체 장내에서 정착하는 유산균 *Lactobacillus casei* L525와 *Lactococcus lactis* 1403를 분리 동정하여 숙주 유산균으로서의 유용성을 검증하였고, 분리 동정한 유산균에 유산균 표면발현 벡터를 형질전환할 수 있는 형질전환법을 확립하였다.

그 방법을 요약하면 Plasmid (형질전환 시키고자하는 DNA)를 competent cell (*Lactobacillus casei* L525와 *Lactococcus lactis* 1403)에 10 μ l 접종후 cuvette (0.2cm electrode gap)에 주입후 5분간 얼음에서 방치 후 Gene pulser로 전기 pulse [25 μ F, 2kV, 200 Ω]를 주고, 900 μ l SGM17MC medium을 섞어 거품이 생기지 않도록 잘 혼탁한 후 37 $^{\circ}$ C, 1 hours 이상 Incubation을 시켜 배양액을 selection medium에 100 μ l spreading 후 3-4일 후에 colony를 확인하였다.

4. 펩타이드 항생물질의 표면 발현 벡터 제작

선정된 펩타이드 항생물질 Anal3의 유전자를 합성하고 유전자 조작에 의해 제작된 유산균 표면발현 벡터 pHCE1LB-pgsA에 삽입하여 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터 pHCE1LB-pgsA:Anal3를 제작하였다(Figure 1).

그 방법을 요약하면 제작한 유산균 표면발현 벡터 pAT/SlpA:pgsA에 펩타이드 항생물질 Anal3를 코딩하는 유전자를 도입하기 위하여 펩타이드 Anal3를 코딩하는 유전자 primer 1 [5'- ga tcc gcg aag aag gtg ttc aaa cgc ctg gag aag ctg ttt agc aaa atc tgg aac tgg aag ta - 3'] 및 primer 2 [5'- aag cta ctt cca gtt cca gat ttt gct aaa cag ctt ctc cag gcg ttt gaa cac ctt ctt cgc g - 3']를 혼합하여 denature로 95°C에서 5분 동안 그리고 37°C에서 1시간 동안 annealing하여 65 bp크기의 DNA를 얻었다. 이 DNA 단편은 표면 발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA에 존재하는 제한효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었고, 상기 annealing된 Anal3 유전자를, 미리 제한효소 BamH I과 Hind III로 처리된 표면 발현용 벡터 pAT/SlpA:pgsA와 혼합하고 연결하여 위의 Anal3 유전자가 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈이 맞추어지도록 결합하여 Anal3를 표면발현시킬 수 있는 벡터 pAT/SlpA:pgsA-Anal3를 제작하였다.

5. Anal3 펩타이드 항생물질의 유산균 발현 유도 및 확인

제작한 유산균 표면발현 벡터 pAT/SlpA:pgsA-Anal3를 *Lactobacillus casei* L525에 형질 전환시키고 배양을 하면서 발현을 유도하여 표면발현 모체인 pgsA와 융합된 펩타이드 Anal3가 유산균에서 발현되는 지를 확인하였다. 형질전환된 *Lactobacillus casei* L525 균주를 항생제인 에리스로마이신 20 mg/L가 첨가된 200 ml의 MRS배지를 포함하는 500 ml 플라스크에서 정체 배양 증식시키고 *Lactobacillus casei* L525내 pAT/SlpA:pgsA-Anal3의 존재를 확인한 후(Figure 2), pgsA와 융합된 펩타이드 Anal3 융합단백질의 발현을 조사하였다(Figure 3). 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 유전자 pgsA의 C-말단과 융합된 펩타이드 항생물질 Anal3의 유산균내 발현은 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 pgsA에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다.

구체적으로 pAT/SlpA:pgsA-Anal3로 형질전환된 *Lactobacillus casei* L525를 MRS 배지 (*Lactobacillus* MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 37°C에서 증식시킴으로 표면발현을 유도하였다. 발현을 유도한 *Lactobacillus casei* L525를 동일한 세포 농도에서 단백질을 얻은 후 이를 denature시켜 시료를 준비하고 이를 SDS-PAGE로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF membrane (polyvinylidene-difluoride membranes, Bio-Rad)에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액 (50 mM 트리스 염산, 5 % 스킴 밀크(skim milk), pH 8.0)에 담가 1시간 동안 교반하여 블로킹시킨 다음 pgsA에 대한 토끼 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 12시간 동안 반응시켰고, 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 바이오틴이 접합된 토끼에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 아비딘-바이오틴 (avidin-biotin)시약을 1시간 동안 반응시켜 다시 세척하였다. 세척된 멤브레인에 기질과 발색시약으로 H₂O₂ 와 DAB 용액을 첨가하여 발색시키고 pgsA에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다. 그림 7 에서 라인 1

은 형질전환되지 않은 숙주세포인 *Lactobacillus casei* L525이고, 레인 2는 형질전환된 pAT/SlpA:pgsA-Anal3/*Lactobacillus casei* L525 임. 그림에서 보는 바와 같이, pAT/SlpA:pgsA-Anal3 에 의해서 약 44 KDa의 융합 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. pgsA가 약 41.8 KDa이고, 펩타이드 Anal3가 약 2.2 KDa이므로 44 KDa를 나타내는 밴드는 pgsA와 펩타이드 Anal3가 융합된 융합단백질임을 확인 할 수 있다.

6. 펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균작용 확인

(1) 펩타이드 항생물질 Anal3를 표면 발현하는 생균 유산균의 항진균작용 확인

펩타이드 항생물질 Anal3를 표면 발현하는 유산균의 항진균활성을 측정하기 위해 병원성 진균인 *Candida albicans* (TIMM 1768)를 대상으로 항진균활성의 가시화실험 [plate 생육억제 실험]을 수행한 결과 *Candida albicans*에 대하여 각각 높은 항진균활성을 확인하였다 (Figure 4, a).

펩타이드 항생물질 Anal3를 표면 발현하는 유산균을 사균화시킨 후의 항진균활성을 측정하기 위해 병원성 진균인 *candida albicans*를 대상으로 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 통한 항진균활성을 측정하였다. 사균화된 유산균의 *candida albicans*에 대한 항진균활성을 확인하였다(Figure 4, b).

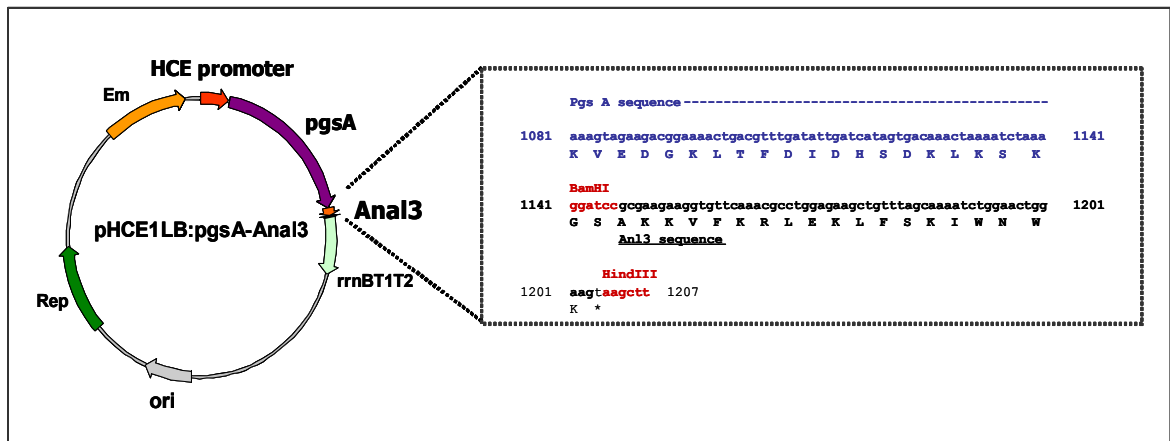


Figure 1. 유용펩타이드 Anal3의 유전자 합성 및 유산균 표면발현용 벡터 plasmid.

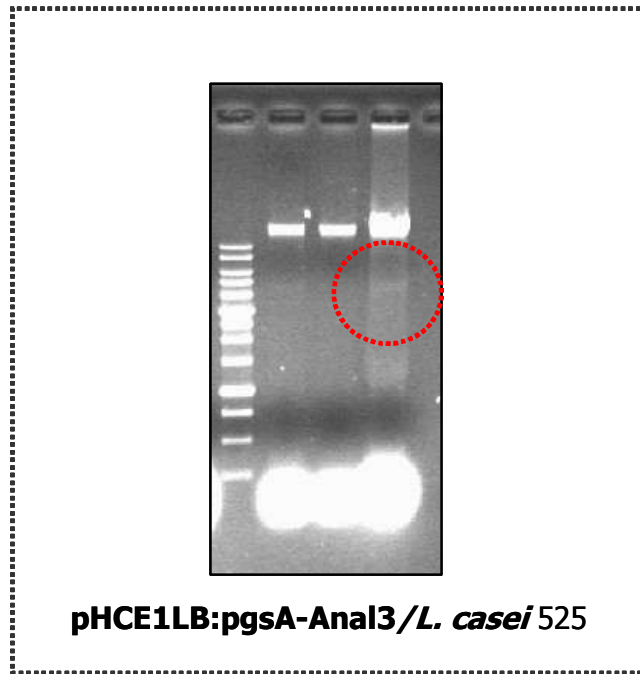


Figure 2. 형질전환 유산균내 유산균 표면발현용 벡터의 확인.

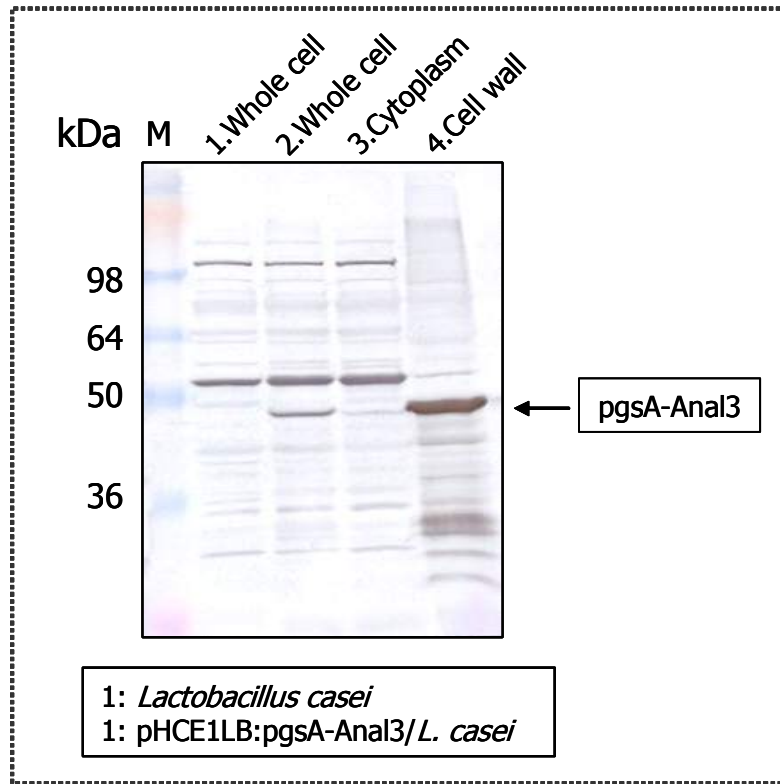
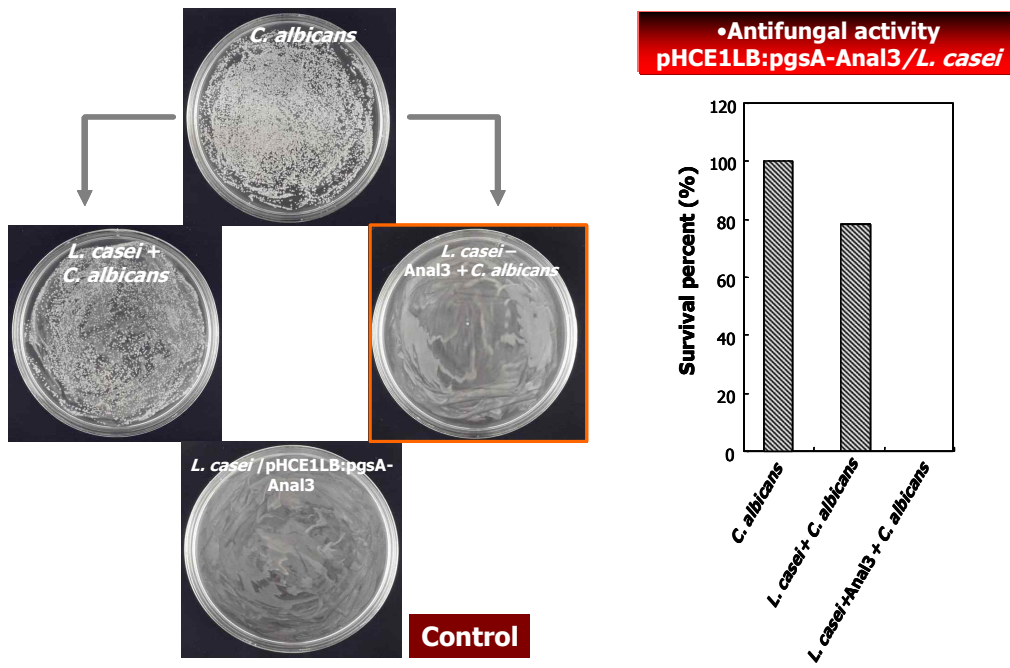


Figure 3. 형질전환 유산균내 펩타이드 항생물질의 발현 확인.

a)



b)

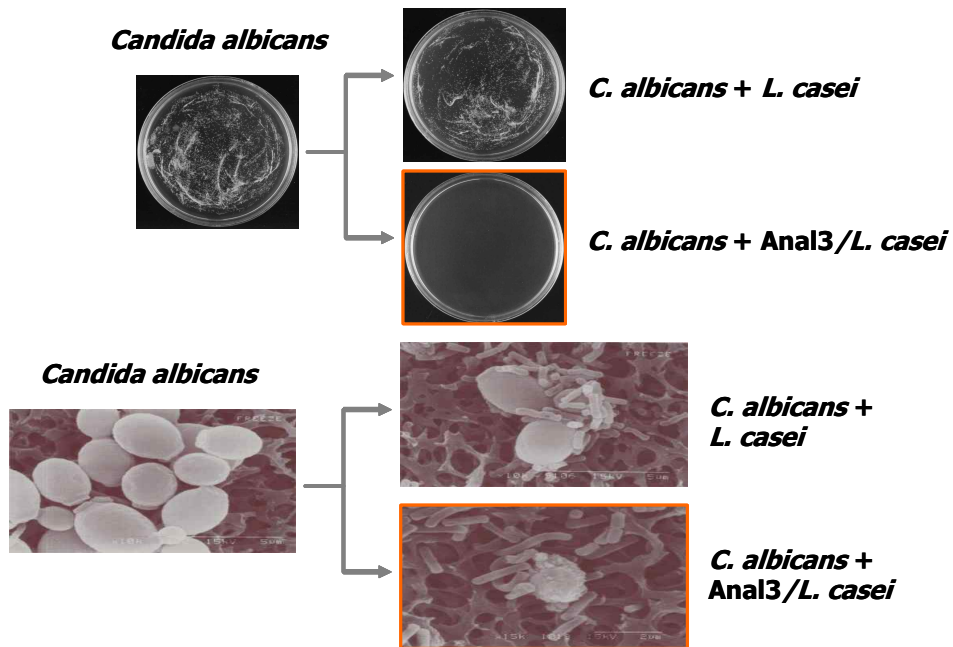


Figure 4. 항균 펩타이드 Anal3를 표면발현하는 유산균의 항진균활성 확인.

다. 3차년도

1. 고농도 배양 기술 검토

고농도 배양 기술의 확립은 생산성 향상과 직결되어 생산 원가 감소를 통한 비용 절감 및 제품의 질적 향상을 이끌 수 있는 직접적인 요소로 균주의 특성을 정확하게 파악하여 배양 조건을 검토함으로써 제품의 대량 생산 시 적용 가능한 공정을 확립하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다.

미생물의 단백질 합성에 가장 큰 영향을 주는 질소원의 변화에 따른 유산균의 성장 변화를 검토한 결과 caseinpeptone 보다 soypeptone이 더 균체 성장에 효과적인 것으로 확인되었다 (그림 1).

2. 고농도 배양 조건 검토

배양 온도 조건 검토 결과, 30℃보다는 35℃에서 균의 성장 속도가 더 좋은 것으로 확인이 되었으며, 교반속도는 50 RPM 보다 상대적으로 고속 교반 속도인 100 RPM이 유산균의 성장에 더 효과적인 것으로 확인되었다. 성장과정 중 유산을 생산하는 일반적인 특징을 가진 유산균에 있어 배양액의 pH 조건은 균의 성장 속도 및 대사 환경에 있어 중요한 요소 중 하나이다. 유산균에 있어 적절한 pH 조건에 대한 성장 특성 검토 결과, 균주의 배양 과정 중 pH를 6.0~6.3 범위 안으로 일정하게 유지시켜 주는 경우, 성장 속도가 보다 좋은 것으로 확인되었다 (그림 2).

3. 고농도 배양 기술의 확립

앞서 수행된 배양 조건 검토를 통해 효과적인 배양을 달성할 수 있는 배양 조건들을 조합하여 대량 배양 공정을 확립하였다. 대량배양 공정에서 추가로 당을 첨가함으로써 유산균 균체량을 늘릴 수 있었으며, 생균수의 증가에도 도움이 되는 것으로 확인이 되었다.

3% seed를 접종하여 12시간 배양한 후 당이 1% 잔량 존재할 때 1%의 당을 더 추가하여 배양을 지속하였다. 그 결과 OD값이 다시 큰 폭으로 증가하였고, 균수도 15시간에서 큰폭으로 증가하는 것이 관찰되었다 (그림 3).

높은 OD로 균체가 증가하고 항원의 발현이 지속적으로 유지가 되는 것을 확인함으로써, 본 실험을 통해 확립된 조건으로 대량 배양된 항원펩타이드 표면발현 유산균을 이용하여 분말 제제화 확립하였다.

(1) 추가 공급에 따른 균성장 확인 (붉은색 원 위치에서 당 추가).

1) 펩타이드 항생물질의 항시적 발현을 위한 조건의 최적화

반복 계대 배양 및 large-scale 배양 시, 안정적으로 표면발현양이 유지되는 안정화 유산

균을 획득하였다.

유용 peptide의 표면발현이 확인된 유산균 형질전환체를 이용한 반복 계대배양 수행 및 large-scale 배양 규모 발현 확인 실험 (1 L, 30 L, 300 L) 수행을 통해 peptide 단백질이 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다 (그림 4).

2) 유용 펩타이드 항생물질 고발현 시스템의 생산성 증대를 위한 고농도 배양 기술 및 Scale-up 연구

유용 peptide가 표면발현된 기능성 유산균을 8% seed 균주를 접종하여 500 L J/F 배양실험을 진행한 결과 성장은 6시간에 OD가 10을 넘어갈 만큼 성장하였으며, 당은 3.5시간에 급격하게 소모되기 시작하여, 6시간에 거의 소모되었다. 생균수는 지속적으로 증가하다가 4.5시간을 정점으로 감소하기 시작하였다 (그림 5). 표면발현단백질의 발현은 발효기간에 따라 계속 증가하다가 배양 종료 후 cooling 단계에서 증가된 단백질의 발현이 안정적으로 유지됨을 확인하였다.

배양시간에 따른 균성장 관련 특성연구를 바탕으로 대량배양을 진행하였으며, 이에 따른 표면발현 단백질의 발현양 유지와 안정화를 위한 조건 검토를 바탕으로 제제화 기술을 검토하고 대량 제품화 공정을 진행하였다.

3) 유용 펩타이드 항생물질 고발현 유산균의 열처리 공정개발에 따른 항진균 활성 검토

펩타이드 항생물질 P5, Anal3를 표면 발현하는 열처리 유산균의 항진균작용 확인하였다. 펩타이드 항생물억제 실험]을 수행한 결과 *Candida albicans*에 대하여 각각 높은 항진균활성을 확인하였다.

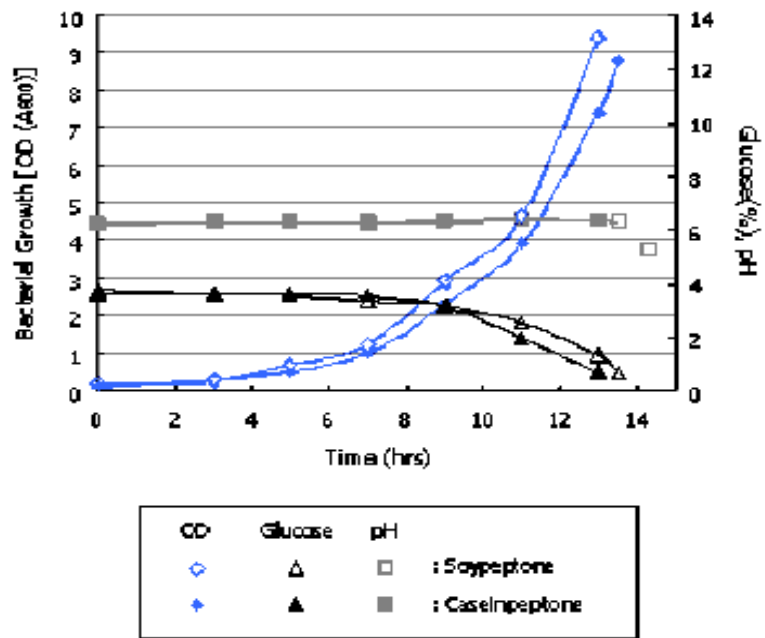


그림 1. 질소원에 따른 유산균 성장 검토.

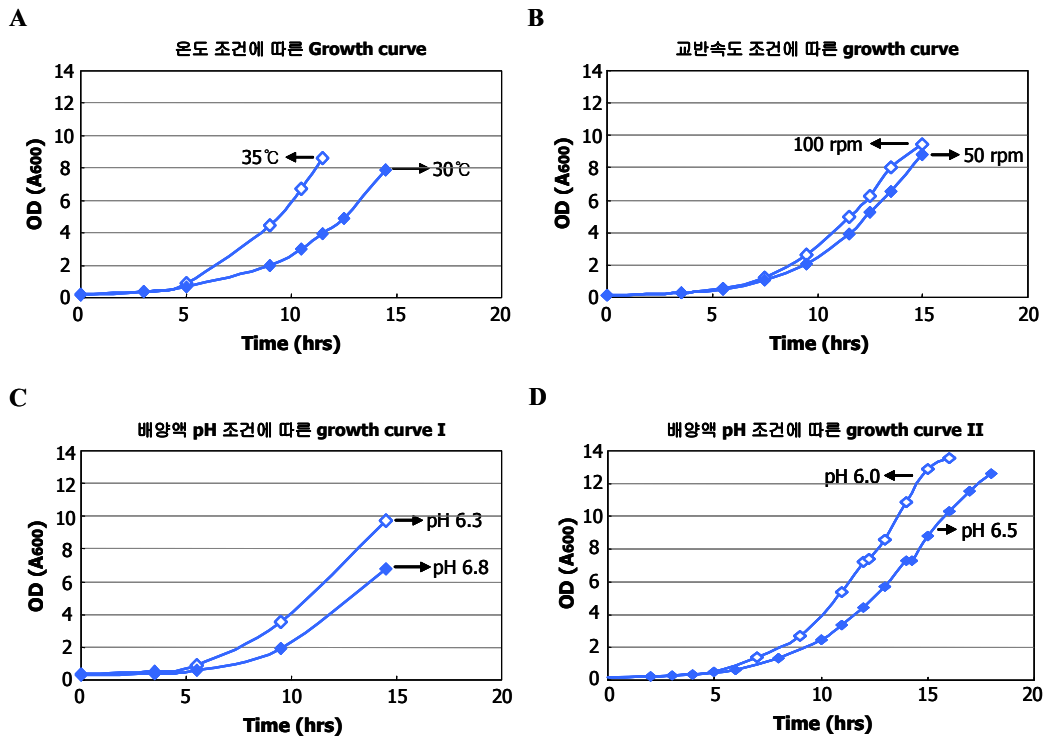


그림 2. 배양온도 및 교반속도, pH에 따른 유산균 성장 검토

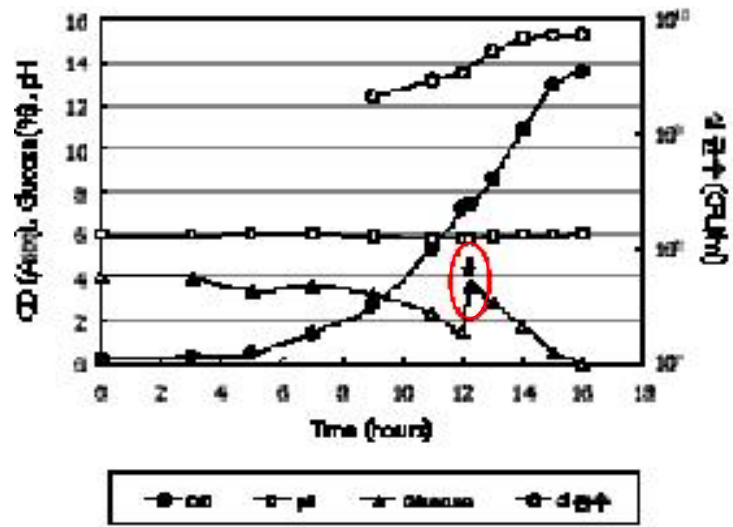


그림 3. 고농도 배양 기술의 확립을 위한 영양성분.

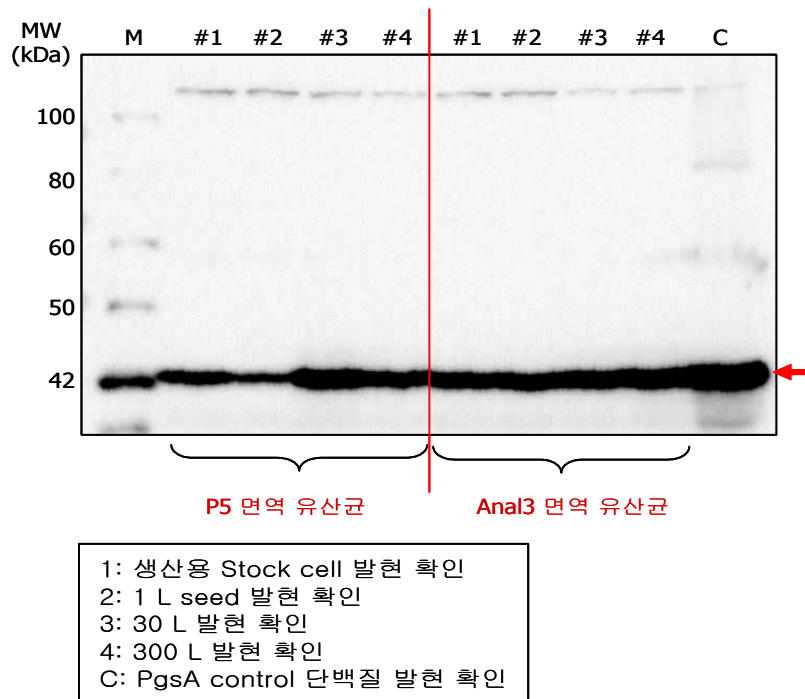


그림 4. 유용 peptide의 안정적인 발현. 균주안정화와 scale-up 배양 실험을 통해 항원발현 확인

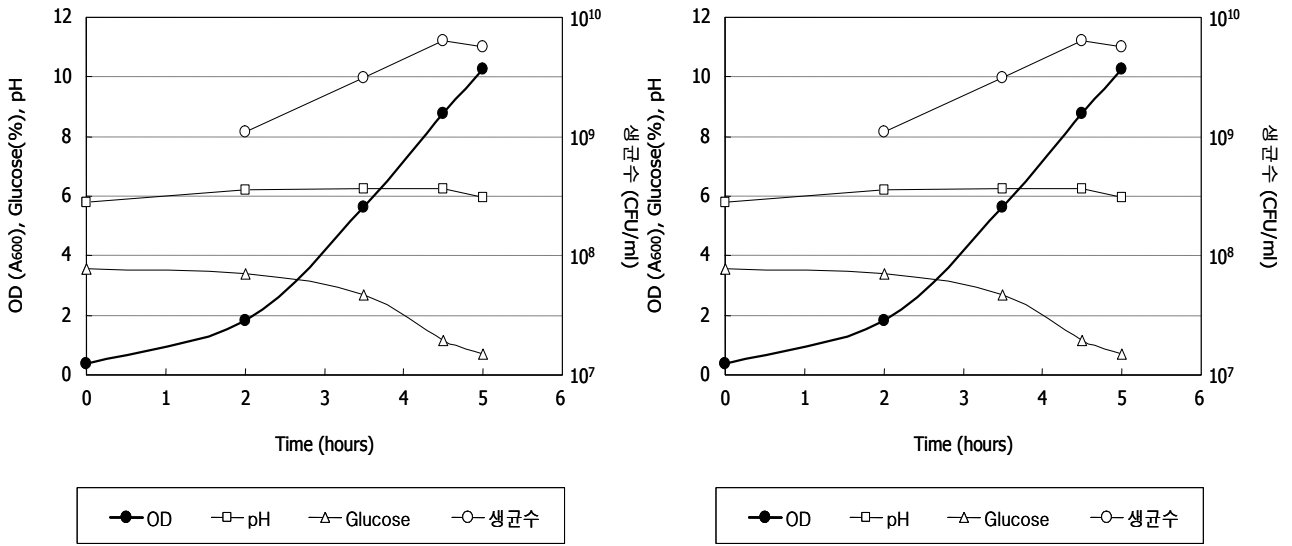


그림 5. 유용 peptide 표면발현 유산균의 대량 배양 조건(500 L J/F)에서의 성장 특성 확인.

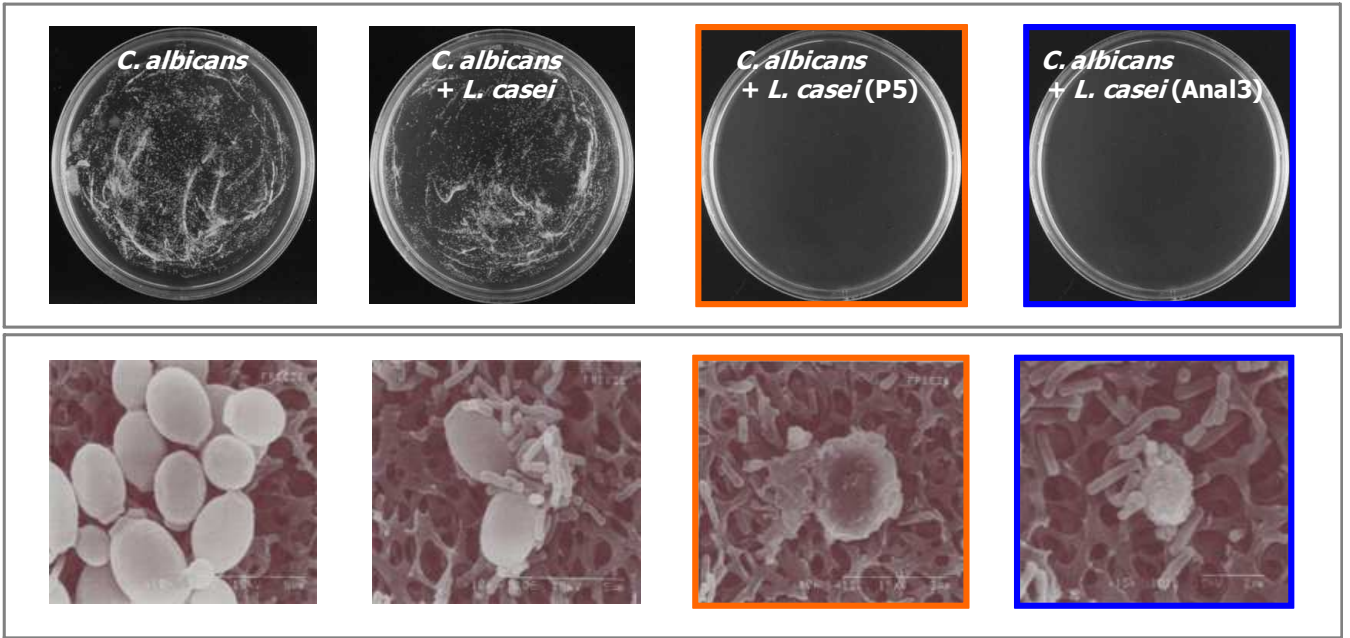


그림 6. 유용 peptide 표면발현 열처리 유산균의 항진균활성 확인.

<제 2 협동과제-강원대학교>

가. 1차년도

1. 자돈 사료 내 생균제 배지에서 배양된 항균 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 자돈으로 사양시험을 실시하였다.

(2) 시험돈 및 시험사료

사양시험을 위해 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc, 24±1일령, 6.22±0.02kg) 300두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복(반복 당 15두)에 완전임의 배치하였다. 시험기간은 phase I(0~2주)과 phase II(3~4주)로 나누어 총 4주(28일)간 실시하였으며 phase I 과 II의 시험사료는 옥수수-대두박을 위주로 하였으며 처리내용은 NC(negative control), PC I(positive Control : Antibiotics-Apramycin, 0.15%), PC II(positive control: Probiotics- Lactobacillus, 0.2%), P5(Antimicrobial peptide P5 40ppm+Lactobacillus) 그리고 P5(Antimicrobial peptide P5 60ppm+Lactobacillus)로 하였다. 시험사료의 영양소 수준은 NRC(1998)에서 제시된 영양소 요구량을 충족하거나 초과하도록 배합하였다(Table 2와 3).

(3) 사양관리

사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다. 그리고 시험사료와 물은 자유채식 시켰으며 기타 첨가제나 약품은 일체 사용하지 않았다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 각 단계의(Phase I, II) 개시와 종료에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 체중 측정시 급이통으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(Average daily gain, ADG), 일일사료섭취량(Average daily feed intake, ADFI) 그리고 사료요구율(F/G)을 산출하였다.

2) 영양소 소화율

영양소소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 두었다. 각 단계별로 분을 채취하여 65°C의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100$$

회장내용물은 실험종료 시 처리별로 4두씩(총 20두) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20°C의 냉장고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80°C의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105°C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid 용액으로 산화 처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 펠트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine-HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 1과 같으며, 미생물 중 총균수(total anaerobic bacterial counts), *Clostridium spp.* counts는 Gas Pak System(BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, Coliforms counts는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37°C, 48시간 이었다.

Table 1. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
Coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

자돈의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 자돈의 경정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다.

총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 Pig IgG ELISA Quantitation Kit (Bethyl, USA), Pig IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Pig IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Pig IgG antibody, Goat anti-Pig IgA antibody, Goat anti-Pig IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100 μ l씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution (50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 200 μ l씩 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 자돈의 혈청을 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Pig IgG-HRP conjugate antibody, Goat anti-Pig IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Pig IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:100,000과 1:50,000, 1:100,000로 희석한 후 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37℃에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 100 μ l씩 넣고 37℃에서 15분간 반응 시킨 후 2M H₂SO₄를 각각 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 장기발달 정도

항균 펩타이드 P5의 급여가 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 실험종료 시 각 처리별로 4두씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

6) 소장 morphology

항균 펩타이드 P5의 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 실험 종료 시 처리별로 4두(총 20두)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높기와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera et al, 1988). 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

본 시험에서 통계적 실험단위는 돈방이었으며, 실험설계는 완전임의배치법으로 실시하였다. SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다. 펩타이드와 항생제, 펩타이드와 생균제의 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

Table 2. Formula and chemical composition of experimental diets (0~2 wk)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %	
				40	60
Ingredients (%)					
Corn (EP)	22.24	22.09	22.04	21.99	21.87
Corn Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
SBM (dehulled)	12.11	12.11	12.11	12.11	12.11
S.P.C	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish meal (65%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Whey powder	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Lactose	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
W.P.C	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
SDPP	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Soy oil	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Sucrose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
MCP	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
Limestone	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Lysine (78%)	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
DL-Methionine (98%)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Threonine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin (10%)	-	0.15	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial peptide(type I)	-	-	-	0.25	0.36
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,410	3,410	3,410	3,410	3,410
CP	22.84	22.84	22.84	22.84	22.84
Ca	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
Avail. P	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Lysine	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Met + Cys	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

Table 3. Formula and chemical composition of experimental diets (3~4 wk)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %	
				40	60
Ingredients (%)					
Corn	34.08	33.93	33.88	33.83	33.71
SBM (44%)	19.10	19.10	19.10	19.10	19.10
Corn (EP)	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
SBM (dehulled)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Whey powder	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal (55)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Animal fat	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Sucrose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DCP	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
Limestone	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Acidifier	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Lysine (78%)	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
DL-Methionine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
L-Threonine (98%)	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin (10%)	-	0.15	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial peptide(type I)	-	-	-	0.25	0.37
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,370	3,370	3,370	3,370	3,370
CP	21.70	21.70	21.70	21.70	21.70
Ca	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Total P	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Avail. P	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
Lysine	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Met + Cys	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Phase I과 Phase II로 나누어 진행하였으며, Table 4는 항균 펩타이드 P5의 급여가 이유자돈의 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 및 사료요구율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 항균 펩타이드 P5를 사료 내 60ppm 급여하였을 경우 phase I의 ADG와 ADFI가 대조구에(NC) 비하여 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 급여구(PC I) 및 생균제 급여구(PC II)와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여구간에는 60ppm 급여구가 40ppm 급여구에 비하여 증체량이 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$). P5 급여구와 PC I 급여구간의 비교시에는 PC I 급여구가 P5 급여구에 비하여 ADG가 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여구와 생균제 급여구간의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). phase II에서 P5 60ppm 급여구가 대조구에 비하여 ADG 및 F/G에서 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). P5 60ppm 급여구와 항생제 및 생균제 급여구와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5간의 비교시에는 60ppm 급여구가 40ppm 급여구에 비해 F/G가 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). P5 급여구와 항생제 급여구와의 비교시에는 항생제 급여구가 P5 급여구에 비하여 ADFI가 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여구와 생균제 급여구와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 전체기간으로(overall) 볼 때 P5 급여구가 대조구에 비하여 ADFI를 개선하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 4. Effects of antimicrobial peptide (P5) supplementation on growth performance in weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value		
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II	
Phase I (d 0 ~ 14)									
ADG, g	275 ^c	308 ^a	295 ^{ab}	282 ^{bc}	302 ^a	3.50	0.032	0.969	
ADFI, g	419 ^c	442 ^a	435 ^{ab}	426 ^{bc}	438 ^{ab}	2.49	0.114	0.547	
F/G	1.53 ^a	1.43 ^b	1.47 ^{ab}	1.51 ^{ab}	1.45 ^{ab}	0.01	0.093	0.643	
Phase II (d 14 ~ 28)									
ADG, g	352 ^c	401 ^a	378 ^{ab}	367 ^{bc}	392 ^a	5.00	0.096	0.926	
ADFI, g	593 ^b	609 ^a	602 ^{ab}	600 ^{ab}	601 ^{ab}	1.80	0.032	0.690	
F/G	1.68 ^a	1.52 ^b	1.59 ^{ab}	1.64 ^a	1.53 ^b	0.02	0.185	0.978	
Overall (d 0 ~ 28)									
ADG, g	311 ^b	357 ^a	330 ^{ab}	323 ^{ab}	335 ^{ab}	5.60	0.124	0.745	
ADFI, g	506 ^c	525 ^a	518 ^{ab}	513 ^{ab}	519 ^{ab}	2.60	0.146	0.931	
F/G	1.63 ^a	1.48 ^b	1.57 ^{ab}	1.60 ^a	1.55 ^{ab}	0.02	0.169	0.804	

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), Type I : Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

영양소 소화율 시험 결과는 Table 5와 같다. phase I의 건물 및 조단백질 소화율에서 P5 60ppm 급여구가 대조구에 비하여 소화율이 높은 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여구간의 비교시에는 60ppm 급여구가 40ppm 급여구에 비하여 건물 소화율이 개선되는 것으로 나타났었다($p < 0.05$). P5 급여구와 항생제 급여구와의 비교시에는 건물 및 조단백질에서 항생제 급여구가 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). phase II에서는 항생제 급여구가 건물, 조단백질 및 에너지 소화율에서 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났었다($p < 0.05$). P5와 항생제 급여구와의 비교시에는 항생제 급여구가 P5 급여구에 비하여 건물 소화율이 높게 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 회장의 외관상 아미노산 소화율(Table 6)에서는 각 처리에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 5. Effects of antimicrobial peptide (P5) supplementation on nutrient digestibility (%) in weanling pigs¹

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

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 6. Effects of antimicrobial peptide (P5) supplementation on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in weanling pigs¹ (d 28)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Essential amino acid								
Arg	81.97	84.22	82.33	81.92	82.27	0.42	0.114	0.892
His	79.77	80.56	80.47	76.54	79.49	0.67	0.224	0.195
Ile	77.61	80.43	79.34	77.98	78.88	0.58	0.242	0.517
Leu	74.69	78.74	76.87	77.38	78.33	0.63	0.566	0.467
Lys	76.78	78.74	77.98	77.17	78.01	0.65	0.580	0.830
Met	72.68	75.68	75.11	73.22	73.58	0.57	0.111	0.183
Phe	71.35	76.05	76.58	75.96	77.73	0.94	0.753	0.924
Thr	72.48	76.11	74.04	73.02	77.19	0.78	0.648	0.603
Val	76.21	77.58	75.90	77.54	77.72	0.44	0.965	0.149
Non-essential amino acid								
Ala	74.27	77.19	76.22	76.38	75.54	0.95	0.664	0.919
Asp	74.93	75.36	75.65	75.15	75.81	0.79	0.958	0.937
Cys	72.09	74.61	73.79	73.51	76.77	0.75	0.824	0.544
Glu	74.67	76.15	75.35	77.47	76.33	0.93	0.807	0.616
Gly	72.37	74.15	74.03	73.17	76.21	0.68	0.779	0.761
Ser	75.20	76.23	74.77	74.63	75.69	0.42	0.614	0.874
Tyr	72.47	75.59	73.75	73.54	74.28	0.92	0.589	0.954

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

2) 장 및 분 중 미생물

항균 펩타이드 P5 급여에 의한 분 중 미생물의 수치의 변화는 Table 7과 같다. 14일째의 총 균수와 *Clostridium spp.*은 급여구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나($p>0.05$), Coliforms 수치에서는 P5 60ppm 급여구가 대조구에 비하여 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 항생제 급여구 및 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). P5 급여구와 항생제 급여구간의 비교에서는 Coliforms 수치가 항생제 급여구에서 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 28일째의 Coliforms 수치는 항생제 급여구가 다른 급여구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), P5 60ppm과 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p<0.05$). P5 처리구와 항생제 급여구와의 비교시에는 항생제 급여구에서 Coliforms 수치가 낮게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 7. Effects of antimicrobial peptide (P5) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in feces of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
d 14								
TAB ³	8.75	8.56	8.67	8.73	8.62	0.03	0.284	0.964
<i>Clostridium spp.</i>	7.43	7.18	7.33	7.35	7.24	0.06	0.417	0.806
Coliforms	6.78 ^a	6.37 ^c	6.69 ^a	6.62 ^{ab}	6.51 ^{bc}	0.04	0.011	0.119
d 28								
TAB	8.61	8.45	8.52	8.59	8.49	0.04	0.456	0.821
<i>Clostridium spp.</i>	7.34	7.08	7.13	7.18	7.11	0.05	0.611	0.858
Coliforms	6.61 ^a	6.19 ^c	6.53 ^{ab}	6.50 ^{ab}	6.37 ^{bc}	0.04	0.018	0.242

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (P<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria.

Table 8은 P5의 급여가 자돈의 회장 및 맹장의 미생물(28일)에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 회장에서는 총 균수와 *Clostridium spp.*에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (p>0.05). *Coliforms*의 수치에서는 P5 60ppm 급여구가 대조구에 비하여 개선되는 것으로 나타났다(p<0.05), 항생제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). P5 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 *Coliforms* 수치가 항생제 급여구에서 낮게 나타났으나 (p<0.05), 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). 맹장의 총 균수와 *Coliforms*의 수치는 항생제 급여구에서 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05).

Table 8. Effects of antimicrobial peptide (P5) on bacterial populations(Log₁₀ CFU/g) in ileal and cecal content of weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Ileum								
TAB ³	8.48	8.19	8.34	8.44	8.26	0.20	0.248	0.959
<i>Clostridium spp.</i>	7.25	6.92	7.09	7.08	6.99	0.21	0.216	0.556
Coliforms	6.46 ^a	6.09 ^b	6.38 ^a	6.35 ^a	6.28 ^{ab}	0.17	0.030	0.211
Cecum								
TAB	8.57 ^a	8.28 ^b	8.40 ^{ab}	8.42 ^{ab}	8.36 ^{ab}	0.03	0.158	0.927
<i>Clostridium spp.</i>	7.30	6.95	7.11	7.12	7.04	0.05	0.314	0.792
Coliforms	6.54 ^a	6.15 ^c	6.42 ^{ab}	6.40 ^{ab}	6.32 ^b	0.04	0.006	0.272

^{ab}Values with different superscripts of the row significantly differ (P<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria.

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 9은 항생제 및 항균 펩타이드 P5의 급여에 의한 이유자돈의 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도를 나타낸 것이다. 각 처리에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았지만($p>0.05$), 항균 펩타이드 P5의 첨가수준이 높을수록 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다.

Table 9. Effects of antimicrobial peptide (P5) on serum immunoglobulins (mg/ml) of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
d 14								
IgG	6.98	7.51	7.26	7.21	7.33	0.24	0.727	0.992
IgA	0.33	0.40	0.36	0.34	0.37	0.03	0.743	0.986
IgM	0.86	0.96	0.89	0.90	0.93	0.03	0.638	0.714
d 28								
IgG	7.09	7.57	7.30	7.24	7.44	0.37	0.850	0.973
IgA	0.35	0.42	0.39	0.38	0.39	0.05	0.787	0.958
IgM	0.90	1.03	0.91	0.92	0.95	0.06	0.626	0.800

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

4) 장기무게 및 소장 형태

Table 10은 P5의 급여에 따른 장기무게를 나타낸 것으로 각 기관의 무게를 생체 중 대비 백분율 %로 나타낸 것이다. 각 처리구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). 이와 비슷한 결과로 소장 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(VH/CD)를 조사한 결과(Table 11) 각 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 10. Effect of antimicrobial peptide (P5) on relative visceral organ weights and length of intestine in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Organ weight, % of live weight								
Heart	0.46	0.54	0.51	0.50	0.53	0.01	0.578	0.907
Liver	3.25	3.36	3.28	3.29	3.32	0.09	0.822	0.944
Lung	1.27	1.34	1.27	1.24	1.28	0.05	0.559	0.981
Kidney	0.43	0.44	0.43	0.39	0.42	0.02	0.530	0.597
Stomach	0.53	0.62	0.57	0.56	0.58	0.02	0.287	0.906
Small intestine	4.22	4.56	4.51	4.34	4.49	0.15	0.755	0.843
Large intestine	2.15	2.31	2.27	2.20	2.23	0.12	0.814	0.872
Length, cm								
Small intestine	1356.50	1445.75	1490.50	1420.67	1438.50	26.88	0.813	0.507
Large intestine	367.25	412.00	386.25	374.75	397.00	11.92	0.479	0.979

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 11. Effect of antimicrobial peptide (P5) supplementation on small intestinal morphology in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	p5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Villus height, μm								
Duodenum	684	656	679	649	665	18.35	0.983	0.700
Jejunum	541	574	551	528	546	18.66	0.483	0.848
Ileum	457	431	451	467	455	20.83	0.634	0.846
Crypt depth, μm								
Duodenum	323	335	344	343	345	6.44	0.630	0.982
Jejunum	275	233	247	253	276	7.82	0.239	0.485
Ileum	241	258	213	298	274	20.50	0.663	0.253
VH/CD								
Duodenum	2.11	1.96	1.98	1.89	1.92	0.08	0.816	0.733
Jejunum	1.97	2.46	2.24	2.08	1.98	0.11	0.169	0.520
Ileum	1.90	1.67	2.12	1.57	1.66	0.20	0.776	0.234

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

(7) 요약

본 실험의 결과 이유자돈에서 분과 장내 미생물, 영양소 소화율 및 사양성적에 미치는 영

향은 항생제 처리구가 전체 P5 급여구 보다 큰 것으로 나타났다. 그러나 높은 수준의 P5 급여구는 항생제와 유사한 결과를 나타냈으며, 대조구 및 생균제 급여구와 비교하였을 때 높은 수준의 P5 급여구는 분과 장내 미생물 수치를 감소시켜 영양소 소화율을 개선하였다. 이로 인해 사양성적도 개선하는 것으로 보인다. 높은 수준의 P5 급여구는 항생제와 유사한 효과가 나타난 것으로 보아 항균펩타이드 P5의 급여는 사료용 항생제 대체 가능성을 나타내는 것으로 생각되며, 적정첨가수준은 0.6%보다 높은 것으로 사료된다

2. 육계 사료 내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 육계로 사양시험을 실시한다.

(2) 공시동물 및 시험사료

본 시험을 위해 Ross종 broiler(45 ± 1.00 g) 400수를 공시하여(5처리, 4반복, 반복당 20수) Starter(0~3주)와 Finisher(4~5주)로 총 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 영양소 요구량에 근거하여 Starter와 Finisher로 구분하여 급여하였고, 처리내용은 항생제 비교를 위하여 NC(negative control), PC I (positive Control : Antibiotics-Avilamycin, 0.05%), PC II(positive control: Probiotics- Lactobacillus, 0.2%), P5(Antimicrobial peptide P5 40ppm+ Lactobacillus) 그리고 P5(Antimicrobial peptide P5 60ppm+ Lactobacillus)하였으며, 시험사료 배합비는 아래와 같다(Table 13, 14).

(3) 사양관리

Broiler는 체중을 기초로 하여 5처리로 처리 당 4반복, 반복 당 20수씩 완전임의 배치하였다. 전 사양기간 평사(사양면적: $2\text{m} \times 2\text{m}$)하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며, 시험기간 내 시험사료와 물은 자유채식 시켰다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 시험개시, starter와 finisher의 종료시에 측정하였으며 사료섭취량은 체중 측정시 사료 급이통에서 사료잔량의 무게를 측정하였다.

2) 영양소 소화율

영양소 소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr₂O₃, 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 예비기간을 3일간 두었다. 각 단계별로 분을 채취하여 65℃의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{\{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100}$$

회장내용물은 각 단계 종료 시 처리별로 8수씩(총 40수) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20℃의 냉동고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 페트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine-HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 12와 같으며, 미생물 중 총 균수(total anaerobic bacterial counts), *Clostridium spp.* counts는 Gas Pak System(BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, Coliform 는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37℃, 48시간 이었다.

Table 12. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
Coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

육계의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 육계의 익정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C 에서 보관하였다.

총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 Chicken IgG ELISA Quantitation Kit (Bethyl, USA), Chicken IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Chicken IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Chicken IgG antibody, Goat anti-Chicken IgA antibody, Goat anti-Chicken IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution (50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C 에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 육계의 혈청을 well에 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Chicken IgG-HRP conjugate antibody, Goat anti-Chicken IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Chicken IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:40,000과 1:60,000, 1:40,000로 희석한 후 well에 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C 에서 15분간 반응 시킨 후 2M H_2SO_4 를 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 도체성적 및 장기발달 정도

항균 펩타이드 P5의 급여가 도체성적과 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 도체를 및 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 각 단계 종료 시 각 처리별로 8수씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

6) 소장 morphology

항균 펩타이드 P5의 급여가 소장 내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 단계 종료 시 처리별로 8수(총 40수)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높이와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 $6\mu\text{m}$ 크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다. 펩타이드와 항생제, 펩타이드와 생균제의 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

Table 13. Formula and chemical composition of experimental diets
(starer : 0~3 wk)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %	
				40	60
Ingredients (%)					
Corn	55.68	55.63	55.48	55.43	55.31
SBM (44%)	26.19	26.19	26.19	26.19	26.19
Wheat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Corn gluten meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal (55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soy-oil	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
TCP	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
DL-Methionine (50%)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin premix ¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Trace mineral premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin (20%)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.2	-	-
Antimicrobial peptide(type I)	-	-	-	0.25	0.37
Total	100.00	100.00	100.00	99.75.00	99.63.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Ca	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Avail. P	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Lysine	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Methionine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Met + Cys	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88

¹Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

²Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

Table 14. Formula and chemical composition of experimental diets
(finisher: 4~5 wk)

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %	
				40	60
Ingredients (%)					
Corn	58.34	58.29	58.14	58.09	57.97
SBM (44%)	21.43	21.43	21.43	21.43	21.43
Wheat	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Animal fat	3.86	3.86	3.86	3.86	3.86
TCP	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
DL-Methionine (50%)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline chloride (25%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Vitamin premix ¹	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Avilamycin (20%)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.2	-	-
Antimicrobial peptide(type I)	-	-	-	0.25	0.37
Total	100.00	100.00	100.00	99.75.0	99.63.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	20.00	20.10	20.10	20.10	20.10
Ca	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Avail. P	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine	0.39	0.38	0.38	0.38	0.38
Met + Cys	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72

¹Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

²Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Starter와 Finisher로 나누어 진행되었으며 사양성적의 결과는 Table 15와 같다. Starter 기간에는 항생제 급여구가 다른 처리구에 비하여 증체량(weight gain)과 사료섭취량(feed intake)이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm 급여구는 대조구에 비하여 증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여구와 항생제 급여구의 비교에서는 항생제 급여구가 증체량에서 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으나($p < 0.05$), 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). Finisher 기간에 P5 60ppm 급여구는 대조구에 비하여 증체량이 개선되었으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 전체 기간으로 볼 때 사료섭취량 및 사료요구율에서는 차이가 나타나지 않았으나($p > 0.05$), 증체량에서 항생제 급여구가 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm 급여구는 대조구에 비하여 증체량이 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여구와는 차이가 나지 않았다($p > 0.05$).

Table 15. Effects of antimicrobial peptide (type I) supplementation on growth performance in broilers¹

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

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

영양소 소화율 시험결과는 Table 16과 같다. Starter 기간에는 항생제 급여구가 건물 및 조단백질 소화율에서 가장 높게 나타났다($p < 0.05$). P5 60ppm 급여구는 대조구에 비하여 건물 및 조단백질 소화율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5와 항생제 급여구와의 비교에서는 항생제 급여구가 건물 및 조단백질 소화율이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). Finisher 기간에는 P5 60ppm 급

여구가 대조구에 비하여 건물 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 급여구와 항생제 및 생균제 급여구와의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 회장아미노산소화율(Table 17)에서는 Arginine과 Methionine 소화율에서 대조구에 비해 P5 60ppm 급여구가 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). P5 급여구와 항생제 급여구간의 비교에서는 항생제 급여구가 Arginine 소화율을 개선하는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

Table 16. Effects of antimicrobial peptide (P5) supplementation on nutrient digestibility (%) in broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Starter (0 ~ 3 wk)								
DM	77.81 ^b	80.81 ^a	79.17 ^{ab}	78.48 ^b	79.05 ^{ab}	0.34	0.018	0.660
CP	68.38 ^c	71.96 ^a	70.30 ^b	69.27 ^{bc}	70.42 ^{ab}	0.35	0.006	0.474
GE	74.65	76.29	75.05	74.80	75.02	0.48	0.420	0.933
Ash	45.89	49.78	49.57	47.82	49.65	0.58	0.563	0.634
Ca	36.10	38.70	37.64	36.86	37.56	0.42	0.239	0.600
P	34.60	37.46	36.97	36.88	36.90	0.53	0.620	0.960
Finisher (3 ~ 5 wk)								
DM	76.04 ^c	78.44 ^a	77.13 ^{abc}	76.75 ^{bc}	77.97 ^{ab}	0.26	0.103	0.670
CP	65.86 ^b	68.58 ^a	66.45 ^{ab}	65.56 ^b	67.98 ^{ab}	0.41	0.185	0.717
GE	74.06 ^b	76.35 ^a	75.04 ^{ab}	74.98 ^{ab}	75.75 ^{ab}	0.31	0.227	0.732
Ash	46.47	47.65	46.86	46.98	46.94	0.46	0.581	0.944
Ca	35.92	37.78	36.81	36.26	36.57	0.62	0.486	0.815
P	32.94	34.52	33.15	33.09	33.36	0.45	0.554	0.924

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), Type I : Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 17. Effects of antimicrobial peptide (P5) supplementation on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Essential amino acid								
Arg	68.37 ^c	72.42 ^a	71.42 ^{ab}	70.64 ^b	71.50 ^{ab}	0.38	0.047	0.628
His	62.74	63.48	63.60	64.41	64.65	0.53	0.763	0.808
Ile	61.53	67.32	65.55	64.15	64.03	0.84	0.301	0.806
Leu	69.45	70.83	68.18	69.44	69.92	0.57	0.372	0.410
Lys	70.60	73.77	70.75	71.06	72.59	0.47	0.087	0.353
Met	76.03 ^b	78.97 ^a	79.27 ^a	75.54 ^b	78.83 ^a	0.44	0.160	0.092
Phe	65.93	66.18	64.87	65.16	65.80	0.39	0.559	0.441
Thr	57.13	57.81	58.53	56.89	58.38	0.32	0.839	0.280
Val	61.14	62.39	60.53	60.80	62.19	0.36	0.356	0.450
Non-essential amino acid								
Ala	63.35	66.16	65.43	64.83	66.24	0.44	0.554	0.928
Asp	54.90	57.02	56.08	55.66	56.71	0.31	0.386	0.881
Cys	55.77	56.48	55.80	55.38	56.53	0.40	0.680	0.878
Glu	68.97	71.39	69.65	69.38	69.53	0.61	0.389	0.897
Gly	60.15	61.10	60.36	59.95	59.92	0.37	0.343	0.699
Ser	60.98	62.56	61.35	61.58	61.42	0.49	0.249	0.891
Tyr	60.82	63.05	62.62	62.46	63.19	0.44	0.867	0.814

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

2) 장 및 분 중 미생물

항균 펩타이드 P5 급여에 의한 분 중 미생물 수치의 변화는 Table 18과 같다. 21일째의 총 균수 및 Coliforms 수치는 항생제 급여구에서 가장 낮게 나타났으나($p < 0.05$), P5 60ppm 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 항생제 급여구의 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 35일째에는 P5 처리구가 대조구에 비하여 총 균수 및 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났으며($p < 0.05$), P5 60ppm 급여구는 항생제 급여구와의 비교시에도 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). P5 급여구와 생균제 급여구를 비교할 때 P5 급여구에서 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$).

Table 18. Effects of antimicrobial peptide (P5) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in excreta of broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
d 21								
TAB ³	8.74 ^a	8.49 ^b	8.65 ^{ab}	8.61 ^{ab}	8.54 ^{ab}	0.04	0.378	0.424
<i>Clostridium spp.</i>	7.49	7.29	7.45	7.41	7.39	0.03	0.258	0.548
Coliforms	6.87 ^a	6.55 ^c	6.73 ^{ab}	6.79 ^a	6.61 ^{bc}	0.03	0.030	0.729
d 35								
TAB	8.70 ^a	8.38 ^b	8.56 ^{ab}	8.53 ^{ab}	8.46 ^b	0.03	0.173	0.427
<i>Clostridium spp.</i>	7.44 ^a	7.21 ^b	7.33 ^{ab}	7.35 ^{ab}	7.25 ^{ab}	0.03	0.240	0.667
Coliforms	6.81 ^a	6.37 ^d	6.58 ^b	6.52 ^{bc}	6.47 ^{cd}	0.04	0.029	0.031

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria.

Table 19은 항균 펩타이드 급여에 의한 육계의 회장 및 맹장 내 미생물(35일)에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 회장 내 미생물에 미치는 영향에서 P5 60ppm 급여구는 대조구에 비하여 Coliforms 수치를 감소시키는 것으로 나타났다(p<0.05). P5 급여구와 항생제 및 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). 맹장 내 미생물에서도 P5 60ppm 급여구가 대조구에 비하여 Coliforms 수치가 낮게 나타났다(p<0.05). P5와 항생제 급여구간의 비교시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만(p>0.05), 생균제와의 비교에서는 P5가 *Clostridium spp.* 억제에 더욱 효과적인 것으로 나타났다(p<0.05).

Table 19. Effects of antimicrobial peptide (P5) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in ileal and cecal content of broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	p-value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Ileum								
TAB ³	8.53 ^a	8.23 ^b	8.62 ^{ab}	8.48 ^{ab}	8.30 ^{ab}	0.06	0.314	0.110
<i>Clostridium spp.</i>	7.15	6.96	7.14	7.10	7.03	0.03	0.171	0.210
Coliforms	4.69 ^a	4.25 ^c	4.43 ^b	4.42 ^b	4.34 ^{bc}	0.04	0.097	0.518
Cecum								
TAB	8.64 ^a	8.35 ^b	8.55 ^{ab}	8.49 ^{ab}	8.39 ^{ab}	0.04	0.398	0.195
<i>Clostridium spp.</i>	7.23	7.03	7.19	7.12	7.09	0.03	0.565	0.011
Coliforms	4.78 ^a	4.29 ^c	4.53 ^b	4.49 ^b	4.42 ^{bc}	0.04	0.063	0.293

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 20은 항생제 및 항균 펩타이드 P5의 급여에 의한 육계의 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도를 나타낸 것이다. 각 처리에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았지만($p>0.05$), 항균 펩타이드 P5의 첨가수준이 높을수록 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다.

Table 20. Effects of antimicrobial peptide (P5) on serum immunoglobulins (mg/dl) of broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
				d 21				
IgG	284.94	310.51	302.33	297.73	304.83	11.18	0.685	0.972
IgA	34.86	37.01	35.19	35.03	38.51	2.25	0.967	0.840
IgM	78.36	86.52	82.56	79.14	83.39	2.07	0.365	0.851
d 35								
IgG	283.04	314.36	302.60	295.58	308.29	16.64	0.780	0.984
IgA	35.20	37.21	35.13	35.53	38.68	1.19	0.979	0.557
IgM	78.94	87.10	82.79	81.43	84.96	2.37	0.593	0.957

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

4) 장기무게, 도체형질 및 소장 형태

Table 21은 항균 펩타이드 P5 급여가 육계의 도체형질 및 장기무게에 미치는 영향을 나타낸(35일) 것이다. 각 처리구간에 유의적인 차이가 없었다($p>0.05$). 또한 이와 비슷한 결과로 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(VH/CD)를 조사한 결과 항생제 및 P5 첨가에 따른 처리구간의 변화는 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 21. Effect of antimicrobial peptide (P5) on carcass traits, relative visceral organ weights and intestinal length in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Carcass traits, % of live weight								
Dress	54.51	57.68	56.20	55.61	56.35	1.07	0.272	0.966
Breast muscle	16.50	16.65	16.18	15.59	16.49	0.46	0.531	0.921
Abdominal fat	1.42	1.24	1.22	1.29	1.25	0.07	0.882	0.796
Organ weight, % of live weight								
Heart	0.56	0.59	0.56	0.55	0.58	0.02	0.680	0.926
Liver	0.47	0.59	0.55	0.57	0.55	0.05	0.845	0.966
Proventriculus	1.76	1.73	1.72	1.73	1.75	0.05	0.948	0.919
Stomach	2.38	2.52	2.41	2.44	2.47	0.07	0.720	0.831
Small intestine	2.75	2.85	2.80	2.76	2.83	0.10	0.833	0.991
Large intestine	0.54	0.63	0.57	0.54	0.56	0.01	0.159	0.640
Length, cm								
Small intestine	161.88	166.83	165.13	159.88	165.78	3.86	0.759	0.830
Large intestine	25.38	27.15	26.13	25.25	26.75	0.62	0.406	0.955

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 22. Effect of antimicrobial peptide (P5) supplementation on small intestinal morphology in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	P5, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				40	60		P5 vs PC I	P5 vs PC II
Villus height, μm								
Duodenum	1746	1933	1780	1863	1822	46.71	0.546	0.679
Jejunum	1060	1114	1151	1120	1085	33.39	0.915	0.627
Ileum	515	584	564	547	572	17.74	0.662	0.920
Crypt depth, μm								
Duodenum	661	657	656	664	653	18.21	0.971	0.968
Jejunum	422	414	445	434	437	15.25	0.651	0.851
Ileum	249	225	242	234	214	6.72	0.975	0.316
VH/CD								
Duodenum	2.68	2.96	2.78	2.80	2.87	0.11	0.671	0.879
Jejunum	2.53	2.75	2.70	2.65	2.56	0.13	0.725	0.823
Ileum	2.13	2.60	2.35	2.35	2.69	0.09	0.739	0.454

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

(7) 요약

실험 1의 결과와 비슷한 결과로 P5의 육계 사료 내 첨가는 뚜렷한 성장촉진효과가 나타난 것으로 판단된다. 비록 항생제의 효과에는 미치지 못했지만 P5의 첨가 수준이 높을수록 유해 미생물에 대한 억제 능력이 향상되었으며, 이로 인해 영양소 소화율 및 증체량이 개선된 것으로 사료된다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 항균 펩타이드 P5가 첨가된 사료의 급여는 유해 미생물의 성장을 억제하여 소화율 개선과 성장촉진효과가 있어 항생제 대체 가능성이 있는 것으로 판단된다.

나. 2차년도

1. 자돈 사료 내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 자돈으로 사양시험을 실시하였다.

(2) 시험돈 및 시험사료

사양시험을 위해 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc, 18±1일령, 5.74±0.02kg) 300두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복(반복 당 15두)에 완전임의 배치하였다. 시험기간은 phase I(0~2주)과 phase II(3~4주)로 나누어 총 4주(28일)간 실시하였으며 phase I과 II의 시험사료는 옥수수-대두박을 위주로 배합하였으며 처리내용은 NC(negative control), PC I(positive Control : Antibiotics-Apramycin, 0.15%), PC II(positive control: Probiotics- Lactobacillus, 0.2%), A3(Antimicrobial peptide A3 60ppm+ Lactobacillus) 그리고 A3(Antimicrobial peptide A3 90ppm+ Lactobacillus)로 하였다. 시험사료의 영양소 수준은 NRC(1998)에서 제시된 영양소 요구량을 충족하거나 초과하도록 배합하였다(Table 24와 25).

(3) 사양관리

시험돈은 체중과 성을 기준으로 5처리로 처리당 4반복, 반복당 15두씩 완전임의배치법에 따라 배치하였다. 사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다. 그리고 시험사료와 물은 자유채식 시켰으며 기타 첨가제나 약품은 일체 사용하지 않았다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 각 단계의(Phase I, II) 개시와 종료에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 체중 측정시 급이통으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(Average daily gain, ADG), 일일사료섭취량(Average daily feed intake, ADFI) 그리고 사료요구율(F/G)을 산출하였다.

2) 영양소 소화율

영양소소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 두었다. 각 단계별로 분을 채취하여 65°C의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{\{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100$$

회장내용물은 실험종료 시 처리별로 4두씩(총 20두) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20°C의 냉장고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80°C의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105°C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화 처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 페트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine·HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 23과 같으며, 미생물 중 총균수 (total anaerobic bacterial counts), *Clostridium spp.* counts는 Gas Pak System (BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, Coliforms counts는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37°C, 48시간 이었다.

Table 23. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
Coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

자돈의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 자돈의 경정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 Pig IgG ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA), Pig IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Pig IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Pig IgG antibody, Goat anti-Pig IgA antibody, Goat anti-Pig IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution (50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 200 μ l씩 넣고 37°C에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 자돈의 혈청을 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Pig IgG-HRP conjugate antibody, Goat anti-Pig IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Pig IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:100,000과 1:50,000, 1:100,000로 희석한 후 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 100 μ l씩 넣고 37°C에서 15분간 반응시킨 후 2M H₂SO₄를 각각 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 장기발달 정도

항균 펩타이드 A3의 급여가 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 실험종료 시 각 처리별로 4두씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

6) 소장 morphology

항균 펩타이드 A3의 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 실험 종료

시 처리별로 4두(총 20두)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높이와 융와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모높이와 융와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

본 시험에서 통계적 실험단위는 돈방이었으며, 실험설계는 완전임의배치법으로 실시하였다. SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다. 펩타이드와 항생제, 펩타이드와 생균제의 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

Table 24. Formula and chemical composition of experimental diets (0~2 wk)

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %	
				60	90
Ingredients (%)					
Corn (EP)	22.24	22.09	22.04	21.87	21.69
Corn Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
SBM (dehulled)	12.11	12.11	12.11	12.11	12.11
S.P.C	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish meal (65%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Whey powder	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Lactose	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
W.P.C	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
SDPP	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Soy oil	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Sucrose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
MCP	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
Limestone	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Lysine (78%)	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
DL-Methionine (98%)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Threonine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin (10%)	-	0.15	-	-	-
Lactobacillus Antimicrobial peptide(type II)	-	-	0.20	-	-
				0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	99.63.00	99.45.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,410	3,410	3,410	3,410	3,410
CP	22.84	22.84	22.84	22.84	22.84
Ca	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
Avail. P	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Lysine	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Met + Cys	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

Table 25. Formula and chemical composition of experimental diets (3~4 wk)

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %	
				60	90
Ingredients (%)					
Corn	34.08	33.93	33.88	33.71	33.53
SBM (44%)	19.10	19.10	19.10	19.10	19.10
Corn (EP)	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
SBM (dehulled)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Whey powder	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal (55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Animal fat	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Sucrose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DCP	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
Limestone	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Acidifier	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Lysine (78%)	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
DL-Methionine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
L-Threonine (98%)	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin (10%)	-	0.15	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial peptide(type II)	-	-	-	0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	99.63.00	99.45.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,370	3,370	3,370	3,370	3,370
CP	21.70	21.70	21.70	21.70	21.70
Ca	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Total P	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Avail. P	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
Lysine	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Met + Cys	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Phase I과 Phase II로 나누어 진행하였으며, Table 26은 항균 펩타이드 A3의 급여가 이유자돈의 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 및 사료요구율(F/G)에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Phase I에서 항균 펩타이드 A3 90ppm 급여구는 대조구(NC)에 비하여 ADG가 개선되는 결과가 나타났으며($p < 0.05$), 항생제(PC I) 및 생균제(PC II)와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교시에는 항생제 급여구가 A3 급여구에 비해 ADG 및 ADFI가 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). Phase II에서는 항생제 급여구가 ADG 및 ADFI를 개선하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). A3 90ppm은 대조구에 비하여 ADG가 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 항생제 급여구가 ADG를 개선하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 전체기간으로 볼 때 항생제 급여구가 다른 처리구에 비해 ADG 및 F/G를 가장 효과적으로 개선하는 것으로 나타났으며($p > 0.05$).

Table 26. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on growth performance in weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Phase I (d 0 ~ 14)								
ADG, g	220 ^c	242 ^a	228 ^{bc}	225 ^{bc}	232 ^{ab}	9.94	0.018	0.865
ADFI, g	337 ^b	360 ^a	347 ^{ab}	344 ^{ab}	349 ^{ab}	12.14	0.031	0.958
F/G	1.54	1.49	1.52	1.53	1.51	0.05	0.428	0.869
Phase II (d 14 ~ 28)								
ADG, g	342 ^c	368 ^a	350 ^{bc}	345 ^{bc}	358 ^{ab}	2.83	0.027	0.860
ADFI, g	556 ^b	579 ^a	564 ^{ab}	561 ^b	568 ^{ab}	2.87	0.069	0.896
F/G	1.63	1.57	1.62	1.63	1.59	0.01	0.329	0.593
Overall (d 0 ~ 28)								
ADG, g	281 ^c	305 ^a	289 ^{bc}	285 ^c	295 ^b	2.18	0.003	0.817
ADFI, g	447	457	455	453	459	1.80	0.790	0.942
F/G	1.59 ^b	1.50 ^a	1.58 ^b	1.59 ^b	1.56 ^b	0.01	0.008	0.884

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

영양소 소화율 시험 결과는 Table 27와 같다. Phase I에서 건물 및 조단백질 소화율에서 A3 90ppm 급여구가 대조구에 비해 높은 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 및 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구간의 비교에서는 항생제 급여구가 건물 및 조단백질 소화율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). Phase II

에서는 항생제 급여구가 다른 처리구에 비하여 건물소화율이 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 항생제, 생균제 및 A3 첨가에 따른 회장 외관상 아미노산 소화율에서는(Table 28) 처리구간에 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 27. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on nutrient digestibility (%) in weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
d 14								
DM	80.20 ^c	82.26 ^a	81.34 ^b	80.47 ^c	81.82 ^{ab}	0.21	0.028	0.725
CP	78.23 ^c	80.52 ^a	79.61 ^{ab}	78.94 ^{bc}	79.94 ^{ab}	0.23	0.020	0.529
GE	81.71	82.84	82.23	81.92	82.09	0.34	0.466	0.855
Ash	43.26	46.62	45.95	45.80	45.67	0.97	0.743	0.888
Ca	43.64	47.56	45.06	45.12	46.20	1.01	0.560	0.858
P	37.36	38.81	37.77	37.82	38.21	0.94	0.689	0.924
d 28								
DM	78.17 ^c	81.33 ^a	79.18 ^{bc}	78.97 ^{bc}	79.74 ^b	0.29	0.004	0.772
CP	77.90	78.85	77.83	77.56	77.57	0.34	0.226	0.779
GE	78.39	80.54	79.09	78.76	79.62	0.64	0.301	0.943
Ash	42.79	48.47	43.50	43.97	45.48	0.85	0.057	0.539
Ca	41.49	41.54	41.81	40.63	39.72	0.75	0.495	0.446
P	35.46	37.88	36.33	36.70	36.58	0.85	0.571	0.900

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 28. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Essential amino acid								
Arg	78.70	79.62	79.17	79.06	79.31	0.47	0.689	0.990
His	71.23	71.84	71.06	71.44	71.22	0.63	0.777	0.889
Ile	69.70	70.59	70.73	69.72	69.57	0.47	0.324	0.417
Leu	73.17	74.03	73.68	73.25	73.38	0.44	0.545	0.770
Lys	67.36	68.79	68.27	68.16	68.58	0.60	0.721	0.922
Met	79.59	80.51	79.32	79.24	79.60	0.23	0.170	0.883
Phe	72.73	73.64	73.84	73.02	74.14	0.44	0.947	0.819
Thr	63.99	65.03	64.41	64.19	64.11	0.47	0.519	0.853
Val	64.49	65.39	65.87	64.72	64.67	0.58	0.657	0.511
Non-essential amino acid								
Ala	63.95	65.03	65.39	64.39	64.23	0.58	0.557	0.430
Asp	70.21	71.15	70.09	70.41	70.35	0.51	0.643	0.861
Cys	54.63	57.71	56.22	55.51	55.02	1.74	0.653	0.865
Glu	73.41	74.16	73.73	73.72	74.43	0.44	0.935	0.768
Gly	48.06	49.49	48.54	49.74	49.15	0.84	0.982	0.738
Ser	70.86	71.82	70.12	70.92	71.02	0.56	0.586	0.655
Tyr	72.56	73.43	72.45	72.71	72.75	0.41	0.494	0.812

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

2) 장 및 분 중 미생물

Table 29에서는 A3 및 항생제 첨가에 따른 이유자돈의 분 중 미생물의 수치를 나타내었다. 14일째에는 항생제 급여구가 총 균수 및 Coliforms 수치가 가장 낮게 나타났다($p < 0.05$). A3 90ppm 급여구는 대조구에 비해 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났으나($p < 0.05$), 항생제 급여구 보다는 Coliforms 수치가 높게 나타났다($p < 0.05$). 28일째에는 A3 90ppm 급여구가 대조구에 비하여 총 균수 및 Coliforms 수치가 낮게 나타났으나($p < 0.05$), 항생제 급여구에 비해 높은 수치를 나타내었다($p < 0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구간의 비교에서도 Coliforms는 항생제 급여구에서 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$).

Table 29. Effects of antimicrobial peptide (A3) on bacterial populations (Log_{10} CFU/g) in feces of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
d 14								
TAB ³	8.87 ^a	8.42 ^b	8.73 ^{ab}	8.70 ^{ab}	8.63 ^{ab}	0.06	0.144	0.579
<i>Clostridium spp.</i>	7.56	7.39	7.45	7.49	7.42	0.03	0.188	0.814
Coliforms	6.56 ^a	6.12 ^c	6.43 ^{ab}	6.41 ^{ab}	6.28 ^b	0.04	0.001	0.271
d 28								
TAB	8.78 ^a	8.29 ^c	8.62 ^{ab}	8.57 ^{ab}	8.37 ^{bc}	0.05	0.092	0.221
<i>Clostridium spp.</i>	7.51 ^a	7.26 ^b	7.37 ^{ab}	7.41 ^{ab}	7.32 ^b	0.03	0.110	0.902
Coliforms	6.53 ^a	6.04 ^c	6.39 ^{ab}	6.37 ^{ab}	6.27 ^b	0.04	0.010	0.384

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria

Table 30은 항생제와 A3 첨가에 따른 이유자돈의 회장 및 맹장의 미생물(28일)에 미치는 영향을 나타내었다. 회장에서 A3 90ppm 급여구는 대조구에 비하여 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 항생제 및 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 맹장에서는 항생제 급여구에서 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치가 가장 낮게 나타났으며($p < 0.05$), A3 90ppm 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구에 비해 항생제 급여구에서 총 균수 및 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 30. Effects of antimicrobial peptide (A3) on bacterial populations (Log_{10} CFU/g) in ileal and cecal content of weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Ileum								
TAB ³	8.63 ^a	8.23 ^c	8.46 ^b	8.43 ^b	8.29 ^{bc}	0.04	0.133	0.198
<i>Clostridium spp.</i>	7.36 ^a	7.15 ^b	7.30 ^b	7.28 ^b	7.16 ^b	0.03	0.419	0.384
Coliforms	6.42 ^a	5.97 ^c	6.25 ^{ab}	6.22 ^{ab}	6.09 ^{bc}	0.04	0.076	0.208
Cecum								
TAB	8.71 ^a	8.26 ^d	8.53 ^b	8.49 ^{bc}	8.35 ^{cd}	0.04	0.043	0.137
<i>Clostridium spp.</i>	7.50 ^b	7.19 ^a	7.32 ^a	7.33 ^a	7.24 ^a	0.03	0.202	0.696
Coliforms	6.43 ^a	6.98 ^d	6.28 ^b	6.24 ^{bc}	6.12 ^{cd}	0.04	0.007	0.195

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 31은 항생제 및 항균 펩타이드(A3)의 급여에 의한 이유자돈의 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도를 나타낸 것이다. 각 처리에 따른 통계적 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 ($p>0.05$), 항균 펩타이드(A3)의 첨가수준이 높을수록 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다.

Table 31. Effects of antimicrobial peptide (A3) on serum immunoglobulins (mg/ml) of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
d 14								
IgG	6.21	6.78	6.40	6.32	6.43	0.18	0.274	0.945
IgA	0.32	0.41	0.37	0.35	0.37	0.03	0.592	0.988
IgM	0.71	0.89	0.75	0.73	0.79	0.05	0.253	0.920
d 28								
IgG	6.31	6.87	6.48	6.39	6.53	0.17	0.654	0.921
IgA	0.36	0.43	0.38	0.39	0.42	0.03	0.752	0.742
IgM	0.73	0.92	0.77	0.79	0.81	0.04	0.281	0.768

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

4) 장기무게 및 소장 형태

항생제 처리와 항균 펩타이드(A3) 급여에 따른 장기무게에 미치는 영향에 대하여 조사하였다(Table 32). 각 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($p>0.05$). 또한 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 형태(villus height, crypt depth 및 villus height: crypt; Table 33)에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 32. Effect of antimicrobial peptide (A3) on relative visceral organ weights and length of intestine in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Organ weight, % of live weight								
Heart	0.46	0.51	0.48	0.49	0.48	0.01	0.238	0.965
Liver	3.14	3.16	3.11	3.06	3.15	0.05	0.703	0.987
Lung	1.07	1.19	1.13	1.12	1.15	0.03	0.164	0.973
Kidney	0.24	0.26	0.23	0.22	0.27	0.01	0.584	0.402
Stomach	0.57	0.61	0.59	0.60	0.60	0.01	0.635	0.841
Small intestine	4.52	5.11	4.41	4.60	4.88	0.14	0.365	0.373
Large intestine	1.91	2.11	2.10	2.05	2.13	0.05	0.861	0.899
Length, cm								
Small intestine	1420.35	1496.70	1433.38	1440.88	1456.00	11.94	0.068	0.525
Large intestine	338.88	361.38	349.50	339.00	359.50	8.05	0.549	0.988

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 33. Effect of antimicrobial peptide (A3) supplementation on small intestinal morphology in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Villus height, μm								
Duodenum	495	547	551	533	553	9.53	0.863	0.714
Jejunum	544	601	508	576	595	14.13	0.524	0.226
Ileum	433	446	428	491	427	10.73	0.706	0.391
Crypt depth, μm								
Duodenum	346	309	341	328	313	10.69	0.582	0.464
Jejunum	353	312	361	349	337	7.72	0.103	0.285
Ileum	288	248	267	252	231	8.42	0.781	0.264
VH/CD								
Duodenum	1.49	1.78	1.66	1.65	1.78	0.06	0.606	0.781
Jejunum	1.55	1.96	1.42	1.66	1.77	0.08	0.288	0.116
Ileum	1.52	1.84	1.61	1.98	1.91	0.08	0.679	0.187

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

(7) 요약

본 실험의 결과 이유자돈에서 항균 펩타이드 A3의 급여는 항생제 효과에 미치지 못했지만 A3의 첨가수준이 높을 때에는 항생제와 비슷한 결과를 나타내었다. A3의 급여가 대조구에 비하여 미생물의 성장을 억제하는 것으로 나타났으며, 이에 영양소 소화율을 개선하여 사양성적

을 향상시키는 것으로 생각된다. 따라서 항균 펩타이드 A3가 함유된 사료의 급여는 항생제 대체 가능성을 보이는 것으로 판단된다.

3. 육계 사료 내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 육계로 사양시험을 실시한다.

(2) 공시동물 및 시험사료

본 시험을 위해 Ross종 broiler($45 \pm 2.00g$) 400수를 공시하여(5처리, 4반복, 반복당 20수) Starter(0~3주)와 Finisher(4~5주)로 총 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 영양소 요구량에 근거하여 Starter와 Finisher로 구분하여 급여하였고, 처리내용은 항생제 비교를 위하여 NC(negative control), PC I (positive Control : Antibiotics-Avilamycin, 0.05%), PC II(positive control: Probiotics- Lactobacillus, 0.2%), A3(Antimicrobial peptide A3 60ppm+ Lactobacillus,) 그리고 A3(Antimicrobial peptide A3 90ppm+ Lactobacillus)로 하였으며, 시험사료 배합비는 아래와 같다(Table 35, 36).

(3) 사양관리

Broiler는 체중을 기초로 하여 5처리로 처리 당 4반복, 반복 당 20수씩 완전임의 배치하였다. 전 사양기간 평사(사양면적: $2m \times 2m$)하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며, 시험기간 내 시험사료와 물은 자유채식 시켰다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 시험개시, starter와 finisher의 종료시에 측정하였으며 사료섭취량은 체중 측정시 사료 급이통에서 사료잔량의 무게를 측정하였다.

2) 영양소 소화율

영양소 소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 예비기간을 3일간 두었다. 각 단계 별로 분을 채취하여 $65^\circ C$ 의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석

시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{\{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100}$$

회장내용물은 각 단계 종료 시 처리별로 8수씩(총 40수) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20℃의 냉동고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 펠트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine-HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 34와 같으며, 미생물 중 총균수 (total anaerobic bacterial counts), *Clostridium spp.* counts는 Gas Pak System (BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, Coliforms counts는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37℃, 48시간 이었다.

Table 34. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
Coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

육계의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 육계의 익정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청

을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C 에서 보관하였다. 총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 Chicken IgG ELISA Quantitation Kit (Bethyl, USA), Chicken IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Chicken IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Chicken IgG antibody, Goat anti-Chicken IgA antibody, Goat anti-Chicken IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution (50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C 에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 육계의 혈청을 well에 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Chicken IgG-HRP conjugate antibody, Goat anti-Chicken IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Chicken IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:40,000과 1:60,000, 1:40,000로 희석한 후 well에 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C 에서 15분간 반응 시킨 후 2M H_2SO_4 를 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 도체성적 및 장기발달 정도

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

6) 소장 morphology

항균 펩타이드 A3의 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 단계 종료 시 처리별로 8수(총 40수)씩 도살 한 후 회장발단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높이와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 $6\mu\text{m}$ 크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다. 펩타이드와 항생제, 펩타이드와 생균제의 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

Table 35. Formula and chemical composition of experimental diets
(starer : 0~3 wk)

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %	
				60	90
Ingredients (%)					
Corn	55.68	55.63	55.48	55.38	55.23
SBM (44%)	26.19	26.19	26.19	26.19	26.19
Wheat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Corn gluten meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal (55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soy-oil	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
TCP	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
DL-Methionine (50%)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin premix ¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Trace mineral premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin (20ppm)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial peptide (type II)	-	-	-	0.30	0.45
Total	100.00	100.00	100.00	99.7.00	99.55.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Ca	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Avail. P	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Lysine	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Methionine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Met + Cys	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88

¹Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

²Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

Table 36. Formula and chemical composition of experimental diets
(finisher: 4~5 wk)

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %	
				60	90
Ingredients (%)					
Corn	58.34	58.29	58.14	58.04	57.89
SBM (44%)	21.43	21.43	21.43	21.43	21.43
Wheat	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Animal fat	3.86	3.86	3.86	3.86	3.86
TCP	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
DL-Methionine (50%)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline chloride (25%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Vitamin premix ¹	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Trace mineral premix ²	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Avilamycin (20ppm)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial peptide(type II)	-	-	-	0.30	0.45
Total	100.00	100.00	100.00	99.7.00	99.55.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	20.00	20.10	20.10	20.10	20.10
Ca	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Avail. P	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine	0.39	0.38	0.38	0.38	0.38
Met + Cys	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72

¹Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

²Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Starter와 Finisher로 나누어 진행하였으며 사양성적의 결과는 Table 37과 같다. Starter 기간에는 항생제 급여구가 다른 처리구에 비하여 증체량(weight gain), 사료섭취량(feed intake), 및 사료요구율(FCR)이 개선되는 것으로 나타났다. A3 90ppm 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 항생제 급여구가 증체량 및 사료섭취량에서 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). Finisher 기간에는 A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교시 항생제 급여구가 증체량 개선에 더 효과적인 것으로 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 전체기간으로 볼 때 A3 90ppm 급여구는 대조구에 비하여 증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났다($p<0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 항생제 급여구에서 증체량이 개선되는 결과를 나타내었다($p<0.05$). A3와 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 37. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on growth performance in broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	p-value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Starter (0 ~ 3 wk)								
Weight gain, g	693 ^d	732 ^a	714 ^{bc}	704 ^{cd}	722 ^{ab}	3.59	0.021	0.881
Feed intake, g	1114 ^b	1143 ^a	1130 ^{ab}	1123 ^{ab}	1136 ^{ab}	4.05	0.029	0.955
FCR	1.61 ^a	1.56 ^b	1.58 ^{ab}	1.60 ^{ab}	1.57 ^{ab}	0.01	0.074	0.874
Finisher (3 ~ 5 wk)								
Weight gain, g	1077 ^b	1153 ^a	1107 ^{ab}	1088 ^b	1121 ^{ab}	8.49	0.040	0.875
Feed intake, g	2013	2075	2063	2010	2048	12.82	0.293	0.259
FCR	1.87 ^a	1.80 ^b	1.86 ^{ab}	1.85 ^a	1.83 ^{ab}	0.01	0.189	0.232
Overall (0 ~ 5 wk)								
Weight gain, g	1855 ^d	1973 ^a	1909 ^{bc}	1878 ^{cd}	1931 ^{ab}	11.05	0.015	0.851
Feed intake, g	3136	3232	3208	3145	3195	14.82	0.174	0.237
FCR	1.69 ^a	1.64 ^c	1.68 ^{ab}	1.67 ^{ab}	1.66 ^{bc}	0.01	0.067	0.260

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p<0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 38은 항균 펩타이드 A3 급여에 의한 육계의 영양소 소화율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Starter 기간에는 사료 내 항생제의 첨가는 다른 처리구에 비하여 건물, 조단백질 및 에너지 소화율을 개선하는 것으로 나타났다($p<0.05$). A3 90ppm 급여구는 대조구에 비하여 건물의 소화율을 개선하는 것으로 나타났으며($p<0.05$), 항생제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구를 비교할 때 항생제 급여구

가 A3 급여구에 비하여 건물 및 조단백질의 소화율을 개선하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). Finisher 기간에는 A3 90ppm 급여구가 대조구에 비하여 조단백질 소화율에서 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구의 비교시 항생제 급여구가 A3 급여구에 비하여 건물 및 조단백질 소화율이 높게 나타났다($p < 0.05$). Table 39는 육계의 회장아미노산소화율을 나타낸 것으로 항생제 및 A3 첨가에 따른 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 38. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on nutrient digestibility (%) in broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Starter (0 ~ 3 wk)								
DM	74.49 ^c	78.81 ^a	76.09 ^{bc}	75.38 ^{bc}	77.10 ^{ab}	0.43	0.022	0.867
CP	65.95 ^b	71.20 ^a	67.77 ^b	66.35 ^b	68.18 ^{ab}	0.58	0.021	0.679
GE	75.41 ^b	78.49 ^a	77.37 ^{ab}	76.73 ^{ab}	77.65 ^{ab}	0.41	0.234	0.872
Ash	40.25	43.49	41.19	41.54	41.45	0.48	0.115	0.804
Ca	38.21	42.28	40.79	39.78	40.18	0.60	0.191	0.622
P	37.69	40.58	38.59	39.80	40.91	0.64	0.903	0.298
Finisher (3 ~ 5 wk)								
DM	71.87 ^b	74.14 ^a	72.32 ^{ab}	72.51 ^{ab}	72.81 ^{ab}	0.30	0.030	0.606
CP	64.81 ^c	70.31 ^a	65.33 ^{bc}	65.58 ^{bc}	68.10 ^{ab}	0.60	0.021	0.269
GE	73.55	75.11	74.41	74.15	74.37	0.31	0.345	0.846
Ash	39.78	41.67	41.09	39.97	40.91	0.83	0.547	0.783
Ca	36.16	38.99	37.32	36.26	38.15	0.48	0.149	0.939
P	34.77	37.04	35.52	36.17	36.94	0.54	0.760	0.455

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 39. Effects of antimicrobial peptide (A3) supplementation on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in broilers¹ (d 35)

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	P-value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Essential amino acid								
Arg	64.85	68.35	65.67	65.51	67.27	0.69	0.288	0.663
His	62.66	64.62	64.08	63.46	64.82	0.70	0.752	0.975
Ile	64.63	66.32	65.33	66.45	66.28	0.51	0.969	0.441
Leu	69.77	72.54	71.96	71.59	72.73	0.71	0.847	0.917
Lys	70.30	74.43	72.76	70.88	73.01	0.91	0.306	0.754
Met	74.19	75.82	75.41	75.46	75.39	0.74	0.858	0.994
Phe	63.52	64.16	64.57	64.50	65.74	0.57	0.585	0.745
Thr	49.16	49.77	49.54	48.49	49.16	0.46	0.485	0.587
Val	52.44	54.81	51.83	53.37	53.93	0.54	0.433	0.227
Non-essential amino acid								
Ala	57.38	58.88	57.68	56.85	58.59	0.52	0.401	0.982
Asp	53.77	55.91	53.06	54.76	54.25	0.66	0.511	0.422
Cys	52.17	54.42	53.77	52.37	54.38	0.53	0.522	0.783
Glu	70.73	72.18	71.04	71.77	71.86	0.48	0.774	0.571
Gly	47.49	47.88	47.68	47.58	47.83	0.51	0.920	0.992
Ser	60.97	62.09	61.38	61.16	62.96	0.69	0.983	0.723
Tyr	54.15	54.30	53.78	54.89	54.21	0.56	0.889	0.649

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

2) 장 및 분 중 미생물

항균 펩타이드 A3 급여에 따른 분 중 미생물 수치는 Table 40과 같다. 21일째의 총 균수에서는 각 처리구간의 차이가 나타나지 않았으나($p>0.05$), *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치는 항생제 급여구에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). A3 90ppm 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 *Clostridium spp.* 수치에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나($p>0.05$), Coliforms 역제는 항생제 급여구가 더욱 효과적인 것으로 나타났다($p<0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구와의 비교에서는 *E. coli* 수치가 항생제 급여구에서 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), 생균제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 35일째에는 A3 90ppm 급여구가 대조구에 비하여 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치가 낮게 나타났으며($p<0.05$), 항생제 급여구와의 비교에서도 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). A3 급여구와 항생제 급여구의 비교시 항생제 급여구가 총 균수 및 Coliforms 수치가 낮게 나타났다($p<0.05$). 생균제 급여구와의 비교에서는 차이가 없었다($p>0.05$).

Table 40. Effects of antimicrobial peptide (A3) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in excreta of broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	p-value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
d 21								
TAB ³	8.36	8.17	8.27	8.31	8.24	0.04	0.291	0.960
<i>Clostridium spp.</i>	7.34 ^a	7.13 ^c	7.26 ^{ab}	7.24 ^{ab}	7.18 ^{bc}	0.02	0.132	0.214
Coliforms	6.61 ^a	6.33 ^c	6.51 ^{ab}	6.54 ^{ab}	6.45 ^b	0.02	0.001	0.595
d 35								
TAB	8.42 ^a	8.07 ^c	8.29 ^b	8.27 ^b	8.21 ^b	0.03	0.010	0.285
<i>Clostridium spp.</i>	7.31 ^a	7.09 ^b	7.21 ^{ab}	7.19 ^{ab}	7.15 ^b	0.02	0.281	0.323
Coliforms	6.51 ^a	6.12 ^c	6.31 ^b	6.36 ^b	6.24 ^{bc}	0.03	0.018	0.984

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria

Table 41은 육계에 항생제 및 항균 펩타이드(type II)의 급여에 따른 회장 및 맹장 내 미생물(35일)을 나타낸 것이다. 회장 내 미생물에서 type II 90ppm 첨가구는 대조구에 비하여 *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치에서 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05) 항생제 첨가구와의 비교에서는 Coliforms 수치가 유의적으로 높게 나타났으며(p<0.05), 생균제 첨가구와의 비교에서는 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). 맹장 내 미생물은 항생제 첨가구가 다른 첨가구에 비해서 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치가 가장 낮게 나타났다(p<0.05). Type II 처리구와 항생제 첨가구와의 비교에서는 항생제 첨가구가 Coliforms를 억제하는데 더욱 효과적인 것으로 나타났다(p<0.05).

Table 41. Effects of antimicrobial peptide (A3) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in ileal and cecal content of broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	P-value	
				60	90		A3 vs PC I	A3vs PC II
Ileum								
TAB ³	8.21	8.03	8.20	8.16	8.15	0.03	0.159	0.474
<i>Clostridium spp.</i>	7.23 ^a	7.04 ^b	7.13 ^{ab}	7.10 ^{ab}	7.08 ^b	0.02	0.406	0.405
Coliforms	6.41 ^c	5.92 ^a	6.20 ^b	6.22 ^b	6.13 ^b	0.04	0.001	0.703
Cecum								
TAB	8.37 ^a	8.06 ^b	8.25 ^{ab}	8.23 ^{ab}	8.17 ^{ab}	0.04	0.102	0.567
<i>Clostridium spp.</i>	7.27 ^a	7.06 ^b	7.15 ^{ab}	7.14 ^{ab}	7.12 ^{ab}	0.03	0.506	0.732
Coliforms	6.45 ^a	6.09 ^c	6.29 ^{ab}	6.33 ^{ab}	6.19 ^{bc}	0.03	0.016	0.675

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

³Total anaerobic bacteria

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 42는 항생제 및 항균 펩타이드 A3의 급여에 의한 육계의 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도를 나타낸 것이다. 각 처리에 따른 통계적 유의적인 차이는 나타나지 않았지만(p>0.05), 항균 펩타이드 A3의 첨가수준이 높을수록 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다.

Table 42. Effects of antimicrobial peptide (A3) on serum immunoglobulins (mg/dl) of broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	P-value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
d 21								
IgG	284.94	310.51	302.33	297.73	304.83	15.15	0.750	0.977
IgA	31.40	38.81	32.48	32.61	33.04	1.84	0.178	0.934
IgM	67.11	73.32	70.31	69.74	71.80	1.99	0.560	0.946
d 35								
IgG	283.04	314.36	302.60	295.58	308.29	14.33	0.588	0.988
IgA	30.59	39.58	31.55	31.49	33.23	1.57	0.075	0.846
IgM	65.01	71.02	68.25	67.80	68.79	1.53	0.488	0.922

¹NC: Negative Control, PC: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

4) 장기무게, 도체형질 및 소장 형태

Table 43은 항균 펩타이드 A3 급여가 육계의 도체형질 및 장기무게에 미치는 영향을 나타낸(35일) 것이다. 각 처리구에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다(p>0.05). 또한 이와 비

슷한 결과로 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와높이(crypt depth, CD), 융모길이와 융와높이의 비례(VH/CD)를 조사한 결과 항생제 및 항균 펩타이드 A3 첨가에 따른 처리구간의 변화는 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 43. Effect of antimicrobial peptide (A3) on carcass traits relative visceral organ weights and intestinal length in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Carcass traits, % of live weight								
Dress	59.12	60.15	59.35	59.39	59.90	0.77	0.781	0.891
Breast muscle	14.24	14.67	14.56	14.54	14.63	0.39	0.892	0.957
Abdominal fat	1.14	1.11	1.10	1.13	1.09	0.06	0.955	0.966
Organ weight, % of live weight								
Heart	0.53	0.52	0.52	0.55	0.54	0.01	0.277	0.400
Liver	2.30	2.53	2.67	2.71	2.66	0.10	0.430	0.960
Proventriculus	0.42	0.41	0.42	0.44	0.43	0.01	.0529	0.652
Stomach	1.63	1.74	1.61	1.66	1.70	0.05	0.710	0.533
Small intestine	3.15	3.19	3.04	3.17	3.16	0.08	0.945	0.582
Large intestine	0.57	0.61	0.51	0.53	0.59	0.02	0.404	0.420
Length, cm								
Small intestine	169.5	176.7	168.7	168.50	173.50	2.67	0.462	0.802
Large intestine	29.75	29.00	27.25	27.50	29.75	0.45	0.721	0.255

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 44. Effect of antimicrobial peptide(A3) supplementation on small intestinal morphology in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3, ppm, %		SEM ²	<i>p</i> -value	
				60	90		A3 vs PC I	A3 vs PC II
Villus height, μm								
Duodenum	1635	1711	1677	1656	1696	25.63	0.647	0.989
Jejunum	1117	1195	1166	1135	1183	31.66	0.704	0.947
Ileum	509	616	536	550	594	18.20	0.263	0.456
Crypt depth, μm								
Duodenum	448	443	450	462	473	17.71	0.603	0.713
Jejunum	364	354	382	375	350	13.72	0.825	0.608
Ileum	233	230	236	225	227	7.89	0.864	0.651
VH/CD								
Duodenum	3.80	4.03	3.90	3.68	3.59	0.17	0.370	0.662
Jejunum	3.18	3.47	3.23	3.10	3.42	0.16	0.605	0.957
Ileum	2.18	2.83	2.36	2.46	2.69	0.14	0.556	0.561

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

(7) 요약

본 실험의 결과를 요약하면 육계에서 항균 펩타이드 A3 급여에 의한 효과는 항생제에는 미치지 못했지만 항균 펩타이드 A3의 첨가 수준이 높을수록 대조구에 비하여 장내 유해미생물을 생장을 억제하여 영양소 소화율 및 증체량을 개선하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 항균 펩타이드 A3의 육계 사료 내 급여는 항생제 대체 가능성을 보이는 것으로 사료된다.

다. 3차년도

1. 자돈사료내 생균제 배지에서 배양된 항균펩타이드(P5, A3) 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드(P5, A3) 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 이유자돈으로 사양실험을 실시한다.

(2) 공시동물 및 시험사료

사양시험을 위해 이유자돈(Landrace×Yorkshire×Duroc, 18±1일령, 5.74±0.02kg) 300두를 공시하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복(반복 당 15두)으로 완전임의 배치하였다. 시험

기간은 phase I (0~2주)과 phase II(3~4주)로 나누어 총 4주(28일)간 실시하였으며 phase I 과 II의 시험사료는 옥수수-대두박을 위주로 배합하였으며 처리내용은 NC(negative control), PC I(positive control : Antibiotics-chlortetracycline 100g/kg+ sulfathiazole 100g/kg+ penicillin 50g/kg, 0.1%), PC II(positive control: Probiotics-Lactobacillus, 0.2%), A3(Antimicrobial peptide A3 90ppm+Lactobacillus) 그리고 P5(Antimicrobial peptide P5 60ppm+Lactobacillus)로 하였다. 시험사료의 영양소 수준은 NRC(1998)에서 제시된 영양소 요구량을 충족하거나 초과하도록 배합하였다(Table 46과 47).

(3) 사양관리

시험돈은 체중과 성을 기준으로 5처리로 처리당 4반복, 반복당 15두씩 완전임의배치법에 따라 배치하였다. 사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다. 그리고 시험사료와 물은 자유채식 시켰으며 기타 첨가제나 약품은 일체 사용하지 않았다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 각 단계의(Phase I, II) 개시와 종료에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 체중 측정시 급이통으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(Average daily gain, ADG), 일일사료섭취량(Average daily feed intake, ADFI) 그리고 사료요구율(F/G)을 산출하였다.

2) 영양소 소화율

영양소소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr_2O_3 , 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 5일간의 적응기간과 3일간의 채취기간을 두었다. 각 단계별로 분을 채취하여 65°C의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 분석시료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{\{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100}$$

회장내용물은 시험종료 시 처리별로 4두씩(총 20두) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20°C의 냉동고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80°C의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105°C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold

performic acid 용액으로 산화 처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 시험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 페트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine-HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 30과 같으며, 미생물 중 총균수 (total anaerobic bacterial counts), *clostridium spp.* counts는 Gas Pak System (BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, coliforms counts는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37°C, 48시간 이었다.

Table 45. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

자돈의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 자돈의 경정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 시험에는 Pig IgG ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA), Pig IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Pig IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Pig IgG antibody, Goat anti-Pig IgA antibody, Goat anti-Pig IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100 µl씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution (50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 200µl씩 넣고 37°C에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 자돈의 혈청을 well에 각각 100µl씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Pig IgG-HRP conjugate antibody, Goat

anti-Pig IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Pig IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:100,000과 1:50,000, 1:100,000로 희석한 후 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 2M H₂SO₄를 각각 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 장기발달 정도

항균펩타이드(P5, A3)의 급여가 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 시험종료 시 각 처리별로 4두씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

6) 소장 morphology

항균펩타이드(P5, A3)의 급여가 소장 내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 시험 종료 시 처리별로 4두(총 20두)씩 도살한 후 회장말단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높이와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

본 시험에서 통계적 시험단위는 돈방이었으며, 시험설계는 완전임의배치법으로 실시하였다. SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다. 펩타이드와 항생제, 펩타이드와 생균제의 평균간 비교는 Independent-Sample T-Test를 이용하여 실시하였다.

Table 46. Ingredient and chemical composition of experimental diets(d 0~14)

Item ¹	NC	PC I	PC II	P5	A3
Ingredients (%)					
Corn (EP)	22.24	22.09	22.04	21.87	21.69
Corn Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
SBM (dehulled)	12.11	12.11	12.11	12.11	12.11
S.P.C	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Whey powder	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Lactose	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
W.P.C	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
SDPP	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Soy oil	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Sucrose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
MCP	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
Limestone	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ²	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix ³	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Lysine (78%)	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
DL-Methionine (98%)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Threonine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
CSP ⁴	-	0.10	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.2	-	-
Antimicrobial Peptide	-	-	-	0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME, kcal/kg	3,410	3,410	3,410	3,410	3,410
CP,	22.84	22.84	22.84	22.84	22.84
Ca	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Lys	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
TSAA	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83

¹ NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5, A3: Antimicrobial peptide

² Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

³ Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg S

⁴ Chlortetracycline 100g/kg+ sulfathiazole 100g/kg+ penicillin 50g/kg

Table 47. Formula and chemical composition of experimental diets (d 14~28)

Item ¹	NC	PC I	PC II	P5	A3
Ingredients (%)					
Corn	34.08	33.93	33.88	33.71	33.53
SBM (44%)	19.10	19.10	19.10	19.10	19.10
Corn (EP)	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
SBM (dehulled)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Whey powder	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Animal fat	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Sucrose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DCP	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
Limestone	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin premix ²	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix ³	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Acidifier	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Lysine (78%)	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
DL-Methionine (98%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
L-Threonine (98%)	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
CSP ⁴	-	0.10	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
Antimicrobial Peptide	-	-	-	0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME kcal/kg	3,370	3,370	3,370	3,370	3,370
CP	21.70	21.70	21.70	21.70	21.70
Ca	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Av. P	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
Lys	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
TSAA	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73

¹ NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5, A3: Antimicrobial peptide

² Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

³ Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg S

⁴ Chlortetracycline 100g/kg+ sulfathiazole 100g/kg+ penicillin 50g/kg

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

본 시험은 Phase I과 Phase II로 나누어 진행하였으며, Table 48은 항균펩타이드(P5, A3)의 급여가 이유자돈의 일당증체량, 일일사료섭취량) 및 사료요구율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Phase I, II에서 항균펩타이드(P5, A3) 급여구는 대조구에 비해 일당증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 전체 기간에서는 항생제 급여구가 다른 급여구에 비해 일당증체량 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항균펩타이드 급여구(P5, A3)는 대조구에 비하여 일당증체량이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

Table 48. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on growth performance in weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Phase I (d 0 ~ 14)						
ADG, g	238 ^c	259 ^a	244 ^{bc}	249 ^{abc}	253 ^{ab}	2.23
ADFI, g	344 ^b	364 ^a	353 ^{ab}	357 ^{ab}	358 ^{ab}	2.47
F/G	1.45	1.41	1.45	1.43	1.42	0.01
Phase II (d 14 ~ 28)						
ADG, g	369 ^d	395 ^a	374 ^c	381 ^{bc}	385 ^b	2.45
ADFI, g	574	585	573	578	581	2.71
F/G	1.56 ^a	1.48 ^d	1.53 ^b	1.52 ^{bc}	1.51 ^c	0.01
Overall (d 0 ~ 28)						
ADG, g	303 ^d	327 ^a	309 ^c	315 ^b	319 ^b	1.99
ADFI, g	459 ^c	474 ^a	463 ^{bc}	467 ^{abc}	469 ^{ab}	1.64
F/G	1.51 ^a	1.45 ^d	1.50 ^{ab}	1.48 ^{bc}	1.47 ^{cd}	0.01

^{abcd}Values with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

영양소 소화율 시험 결과는 Table 49과 같다. Phase I에서 항균펩타이드 급여구가 대조구에 비하여 에너지 및 조단백질 소화율이 개선되었으며($p < 0.05$), Phase II에서는 대조구에 비해 항균펩타이드 급여구가 건물, 에너지 및 조단백질 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 항생제 급여구는 Phase I에서 A3 급여구에 비해 에너지 소화율이 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), Phase II에서는 에너지 및 조단백질 소화율이 항균펩타이드(A3, P5) 급여구에 비해 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 회장아미노산소화율에서(Table 50) P5 급여구는 대조구에 비하여 lysine 및 phenylalanine 높았으며($p < 0.05$), 항생제 급여구와의 비교에서는 A3 급여구보다 항생제 급여구가 lysine 소화율이 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

Table 49. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on nutrient digestibility (%) in weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 14						
DM	82.93 ^b	85.24 ^a	83.18 ^b	83.78 ^{ab}	84.46 ^{ab}	0.28
GE	80.88 ^c	84.65 ^a	82.73 ^b	83.15 ^b	83.92 ^{ab}	0.33
CP	79.91 ^c	83.08 ^a	81.07 ^{bc}	81.37 ^{bc}	81.70 ^{ab}	0.31
Ash	49.76	53.38	50.72	51.65	51.91	0.61
Ca	45.07	45.85	45.13	45.44	45.14	0.24
P	41.38	43.30	41.36	42.60	42.50	0.35
d 28						
DM	80.06 ^c	84.20 ^a	81.60 ^{bc}	82.33 ^{ab}	83.42 ^{ab}	0.41
GE	79.22 ^c	83.22 ^a	80.51 ^{bc}	81.23 ^b	81.30 ^b	0.36
CP	77.88 ^c	81.12 ^a	78.82 ^{bc}	79.58 ^b	79.69 ^b	0.28
Ash	47.77	51.20	48.07	48.10	49.48	0.60
Ca	44.83	46.60	44.16	45.48	45.21	0.38
P	39.82	42.68	40.14	40.41	41.11	0.42

^{abc}Values with different superscripts in the same row differ significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

Table 50. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on apparent ileal digestibility (%) of amino acids in weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Essential amino acid						
Arg	78.72	80.29	78.80	78.62	79.98	0.32
His	73.07	74.10	73.43	73.45	73.69	0.41
Ile	69.10	69.88	69.50	69.72	69.53	0.51
Leu	70.97	72.64	71.34	71.57	71.49	0.43
Lys	71.34	74.33	71.37	72.47	73.24	0.63
Met	75.74	77.70	75.97	77.25	76.80	0.43
Phe	70.78	74.20	73.76	74.87	74.60	0.68
Thr	65.94	69.06	66.70	67.32	67.44	0.56
Val	63.12	63.55	63.22	63.03	63.25	0.39
Non-essential amino acid						
Ala	63.50	67.41	64.22	64.59	65.98	0.63
Asp	71.76	73.71	71.80	72.15	72.74	0.52
Cys	64.51	69.29	65.53	67.12	67.28	0.74
Glu	70.02	75.30	70.54	72.96	73.27	0.93
Gly	52.78	57.17	53.37	54.98	55.14	0.78
Ser	63.04	66.34	63.79	65.05	65.60	0.84
Tyr	70.19	72.39	70.97	72.13	71.82	0.82

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

2) 장 및 분 중 미생물

Table 51은 항균펩타이드(A3, P5) 급여에 따른 이유자돈의 분 중 미생물 수치를 나타낸 것이다. 14일째의 총 균수 및 *Clostridium spp.* 수치에서 항생제 급여구가 다른 급여구에 비해 유의적으로 감소된 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항균펩타이드(A3, P5) 급여구는 대조구에 비해 coliforms의 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 28일째의 항균펩타이드 급여구는 대조구에 비하여 *Clostridium spp.* 및 coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$).

Table 51. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) on bacterial populations (Log_{10} CFU/g) in feces of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 14						
TAB ³	8.76	8.58	8.70	8.65	8.66	0.03
<i>Clostridium spp.</i>	7.52 ^a	7.27 ^b	7.48 ^a	7.42 ^a	7.40 ^a	0.03
Coliforms	4.55 ^a	4.29 ^b	4.45 ^{ab}	4.39 ^{ab}	4.32 ^b	0.03
d 28						
TAB	8.72 ^a	8.33 ^b	8.65 ^a	8.60 ^a	8.54 ^a	0.04
<i>Clostridium spp.</i>	7.51 ^a	7.22 ^c	7.43 ^a	7.34 ^b	7.32 ^b	0.03
Coliforms	4.56 ^a	4.19 ^d	4.38 ^b	4.31 ^c	4.28 ^c	0.03

^{abcd}Values with different superscripts in the same row differ significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

³Total anaerobic bacteria

Table 52는 항균펩타이드(A3, P5)의 급여가 자돈의 회장 및 맹장의 미생물에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 회장에서는 항생제 급여구가 다른 급여구에 비해 총 균수 및 coliforms 수치가 유의적으로 개선되는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 항균펩타이드(A3, P5) 급여구는 대조구에 비해 coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구와의 비교 시에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 맹장의 미생물 수치에서는 항생제 급여구가 다른 급여구에 비해 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치에서 다른 급여구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 항균펩타이드(A3, P5) 급여구와 대조구와의 비교에서는 총 균수, *Clostridium spp.* 및 Coliforms 수치가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$).

Table 52. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in ileal and cecal content of weanling pigs (d 28)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Ileum						
TAB ³	8.64 ^a	8.23 ^c	8.51 ^{ab}	8.50 ^{ab}	8.40 ^{ab}	0.04
<i>Clostridium spp.</i>	7.44 ^a	7.14 ^b	7.30 ^{ab}	7.28 ^{ab}	7.24 ^b	0.03
coliforms	4.42 ^a	4.06 ^d	4.32 ^{ab}	4.22 ^{bc}	4.19 ^c	0.03
Cecum						
TAB	8.67 ^a	8.28 ^c	8.59 ^{ab}	8.54 ^b	8.48 ^b	0.03
<i>Clostridium spp.</i>	7.46 ^a	7.19 ^c	7.40 ^{ab}	7.32 ^{bc}	7.29 ^{bc}	0.03
coliforms	4.49 ^a	4.12 ^d	4.36 ^b	4.29 ^{bc}	4.23 ^c	0.03

^{abcd}Values with different superscripts in the same row differ significantly differ (p<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

³Total anaerobic bacteria

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 53은 항생제 및 항균펩타이드(A3, P5)의 급여에 의한 이유자돈의 혈중 IgG, IgA 및 IgM의 농도를 나타낸 것이다. 각 처리에 의한 통계적 유의차는 나타나지 않았지만(p>0.05), 항생제 급여구가 다른 급여구에 비해 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다. 항균 펩타이드(A3, P5) 또한 유의적 차이는 나타나지 않았지만(p<0.05) 대조구에 비해 IgG, IgA 및 IgM의 농도가 높게 나타났다.

Table 53. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) on serum immunoglobulins (mg/ml) of weanling pigs¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 14						
IgG	7.81	7.93	7.81	7.88	7.89	0.12
IgA	0.44	0.47	0.45	0.45	0.45	2.54
IgM	0.78	0.82	0.79	0.80	0.81	3.95
d 28						
IgG	7.83	8.07	7.84	7.95	7.98	0.11
IgA	0.47	0.51	0.47	0.49	0.50	2.51
IgM	0.86	0.92	0.88	0.89	0.91	3.39

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

4) 장기 무게 및 소장 형태

Table 54는 항균펩타이드(A3, P5) 급여에 따른 장기무게를 나타낸 것으로 각 기관의 무게를 생체 중 대비 백분율(%)로 나타낸 것이다. 항생제, 생균제 및 항균펩타이드 급여에 의한 각 급여구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(p>0.05). Table 55는 항균펩타이드(A3,

P5), 항생제 및 생균제 급여에 의한 소장의 형태 변화를 나타낸 것으로 소장의 각 부분(십이지장, 공장 및 회장)의 융모길이(villus height, VH), 융와 높이(crypt depth, CD), 융모 길이와 융와 높이의 비례(VH/CD)를 조사한 결과 각 급여구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

Table 54. Effect of antimicrobial peptide (A3, P5) on relative visceral organ weights and length of intestine in weanling pigs¹ (d 28)

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Organ weight, % of live weight						
Heart	0.52	0.53	0.54	0.52	0.54	0.01
Liver	2.69	2.70	2.69	2.55	2.50	0.04
Lung	1.12	1.08	1.15	1.18	1.12	0.02
Kidney	0.23	0.19	0.20	0.22	0.21	0.01
Stomach	0.58	0.55	0.54	0.53	0.55	0.01
Small intestine	5.57	5.47	5.66	5.40	5.32	0.05
Large intestine	1.97	1.88	1.96	1.92	1.90	0.03
Length, cm						
Small intestine	1411.50	1413.25	1419.75	1403.00	1418.25	4.93
Large intestine	294.25	292.50	295.00	297.00	289.75	4.18

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

Table 55. Effect of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on small intestinal morphology in weanling pigs¹ (d 28)

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Villus height, μm						
Duodenum	684	656	679	649	665	18.35
Jejunum	541	574	551	528	546	18.66
Ileum	457	431	451	467	455	20.83
Crypt depth, μm						
Duodenum	323	335	344	343	345	6.44
Jejunum	275	233	247	253	276	7.82
Ileum	241	258	213	298	274	20.50
VH/CD						
Duodenum	2.11	1.96	1.98	1.89	1.92	0.08
Jejunum	1.97	2.46	2.24	2.08	1.98	0.11
Ileum	1.90	1.67	2.12	1.57	1.66	0.20

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

(5) 고찰

위의 시험결과 전체기간 동안 항균펩타이드(A3, P5)의 급여는 대조구 보다 증체량 및 사료 섭취량에서 개선효과가 나타났지만 항생제 급여구에 비해서는 높지 않았다. 이전의 많은 연구

결과를 통해 가축 사료 내 항생제의 우수한 성장효과를 확인하였다. Han et al, 1996은 Mecadox와 CTC 혼합제를 투여한 자돈의 일당증체량이 대조구에 비해 각각 36.5%와 32.4%로 증가하였다고 보고하였다. 또한 이유자돈에 항생제 급여는 설사발생을 52.2% 감소시켰다 보고하였다.

장 내에 있는 병원성 미생물은 장벽 두께를 증가시킴으로써 영양소의 흡수를 저해하고 단백질과 에너지 등의 불필요한 영양소 이용 경쟁을 가져와 요구량이 증가하게 된다고 보고하였다. 이에 본 시험결과에서 나타난 항생제과 항균펩타이드(A3, P5)의 성장개선 효과는 유해 미생물을 감소시켜 에너지의 손실을 줄여주고 DM과 CP 등의 소화율을 개선시켜 줌으로써 나타난 결과로 판단된다. 0~14일 동안에 고농도의 항균펩타이드 P5 급여구와 항생제 급여구에서 증체량에 유의차를 보이지 않은 것으로 항균활성이 강화된 항균펩타이드는 이유 후 병원성 미생물에 노출되기 쉬운 환경에서 보다 우수한 항균성을 나타내 항생제 대체가능성을 확인할 수 있었다. 또한 항균펩타이드 P5가 증체량 및 사료섭취량에서 항균펩타이드 A3보다 높은 결과를 나타낸 것은 in vitro에서 A3보다 높은 항균억제능력을 나타내어 생체 내에서도 병원성 미생물의 성장억제에 보다 많은 영향을 미친 것으로 판단된다.

항생제의 항균능력은 이미 수많은 보고를 통해 널리 알려져 있지만(Wang et al, 2006), 항균펩타이드의 경우 생체 내에서의 효과에 대한 연구가 아직 미흡하다. Ramanathan et al, 2002은 항균펩타이드는 생체 면역체계의 주요방어 인자로 장 내 미생물의 성장을 조절하고 유해 미생물로부터 점막을 보호하여 소화율을 개선시킨다고 하였다. 또한 Kwon et al, 2003은 한국 전래 민간요법에서 상처치유에 사용했던 아시아 두꺼비(*Bufo bufo gargarizans*)의 위 조직에서 분리된 39개의 아미노산 중에서 항균력이 뛰어난 21개의 아미노산을 재조합하여 제조한 항균펩타이드 buforin IIb를 이유자돈에 급여한 결과 증체량과 설사 원인균 감소에서 항생제에 비하여 우수한 효과를 나타내었다고 보고하였다.

본 시험의 연구결과 항생제 급여구는 다른 급여구에 비해 유해 미생물 억제와 소화율 향상을 통한 성장개선 효과가 우수하게 나타났다. 이는 질병과 환경이 열악한 상업농장에서 항생제의 병원성 미생물에 대한 선택적 공격 특성상 다른 급여구에 비해 개선효과가 나타난 것으로 보인다. 그러나 항균 능력이 향상된 고농도의 항균펩타이드 P5의 경우 이유 후 2주 동안에 항생제와 비슷한 coliforms수치 감소를 보여 항생제 대체재로서의 가능성을 보였다. 따라서 항균펩타이드의 첨가수준, 투여기간 등에 대한 추가적인 시험을 통해 보다 명확한 대체 가능성을 판단해야 할 것으로 보여진다.

항생제와 항균펩타이드는 모두 면역기능을 개선하고 유해 미생물에 대하여 방어기작을 하는 것으로 알려져 있으며(Weber et al, 2001; Broekaert et al, 1995), 특히 항균펩타이드는 선천성 면역방어시스템의 중요한 부분으로 생체 내 면역기능을 강화하는 것으로 보고되고 있다(Ramanathan et al, 2002). 그러나 본 시험의 혈청내 면역반응 조사에서 IgA, IgM, IgG 결과는 항생제와 항균펩타이드 그리고 생균제 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 병원성 미생물의 감소를 통한 성장개선 효과는 확인 되었으므로 Interferon- γ , TNF, C4와 같은 장 내 면역반응에 대한 세부적인 연구가 필요할 것으로 보여진다. 장내 점막의 구조는 장 건강을 나타내는 하나의 지표이다. 또한 이유 후 낮은 사료섭취량과 스트레스 요인은 용모의 길이감소와 융와높이의 증가를 가져오고 병원성 미생물은 용모 윗부분(미세용모)의 흡수부위에 영향을 미쳐 영양소 흡수의 감소와 성장 저하를 가져온다 하였다(Pluske et al, 1996; Kelly et al, 1999). Draper, 1958은 페니실린을 육계에 급여한 결과 장의 두께가 감소하고

그에 따라 영양소의 이용률이 개선되었다고 하였다. Gaskins, 1997은 장 내 유해 미생물이 증가하게 되면 독소의 생산으로 점막의 상피세포에 손상을 가져옴에 따라 세포 재생율이 증가하여 장의 두께가 증가한다고 하였다. 또한 이유 자돈에 여러 성장 촉진용 항생제를 급여한 결과 소장의 무게 및 길이의 감소를 보고하였다. 소장의 용모길이 감소와 용와 높이 증가는 장 내 존재하는 병원성 미생물에 의한 독소의 생산과 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Yason et al, 1987). 또한 Pluske et al, 1996은 VH/CD의 비율이 높으면 이유자돈의 사양성적이 개선되는데 이것은 용와높이보다는 용모길이의 증가로 인한 소화율 향상으로 기인한 것이라 하였다. 그러므로 장의 여러 형태학적 변화는 이유자돈의 성장에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 본 시험 결과에서는 항생제 및 항균펩타이드 첨가에 의한 병원성 미생물의 감소를 확인하였음에도 불구하고 소장의 형태학적 변화, 무게 및 길이의 감소 등 사료 내 급여에 따른 유의차가 나타나지 않아 이전의 연구결과와 일치 하지 않았다. 이는 농장의 환경, 이유 일령 및 체중 등에 따라 항생제 및 항균펩타이드의 효과가 다르기 때문인 것으로 판단된다.

지금까지 항생제는 이유 자돈에서 질병감소 및 성장촉진 효과를 가져와 생산성 증진 목적으로 많이 사용되어져 왔다. 본 시험에서도 항생제의 사료 내 급여는 전체기간 동안 다른 항균 펩타이드 및 생균제 급여구에 비해 우수한 증체량 및 사료섭취량을 나타냈다. 그러나 이전의 많은 연구에서 나타났듯이 항생제의 지속적인 사용은 내성균의 출현과 체내 잔류 문제를 가져와 인간의 건강에 위험을 줄 수 있다(Monroe et al, 2000; Schwarz et al, 2001). 본 연구에서는 내성 및 잔류 가능성이 전혀 없는 항균펩타이드의 첨가에 따른 성장개선 효과를 확인하였다. 물론 항생제 급여구가 보다 우수한 성장개선 효과를 나타냈지만, 농도가 높은 항균펩타이드는 유해 미생물에 대한 항균성, 소화율, 증체량 등을 높여 항생제 대체에 대한 가능성을 보였다. 따라서 항균펩타이드의 사용량, 투여기간 그리고 면역반응에 대한 세부적인 조사를 통하여 대체재로서의 보다 명확한 기전을 밝히는 것이 필요할 것으로 보인다.

(6) 요약

본 시험의 결과 이유자돈에서 장내 미생물, 영양소 소화율 및 사양성적에 미치는 영향은 항생제 복합제 급여구가 항균펩타이드(A3, P5) 급여구보다 큰 것으로 나타났다. 항균펩타이드 간의 비교에서는 P5 급여구가 A3 급여구에 비해 우수한 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 대조구에 비하여 항균펩타이드 급여구는 분과 장내 유해 미생물의 수치를 감소시켜 영양소 소화율을 개선하였다. 이로 인하여 사양성적도 개선하는 것으로 판단되며, 기존의 항생제 대체 하기 위해서는 더 높은 수준의 항균펩타이드를 첨가하여야 할 것으로 판단된다.

2. 육계 사료 내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드(A3, P5) 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구

(1) 연구목적

본 연구에서는 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드(A3, P5) 함유 생균제와 배지로 사용된 생균제 및 항생제와의 비교를 위하여 자돈으로 사양실험을 실시하였다.

(2) 시험돈 및 시험사료

본 시험을 위해 Ross종 broiler(45±1.50g) 400수를 공시하여(5처리, 4반복, 반복당 20수) Starter(0~3주)와 Finisher(4~5주)로 총 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 영양소 요구량에 근거하여 Starter와 Finisher로 구분하여 급여하였고, 처리내용은 항생제 비교를 위하여 NC(negative control), PC I (positive Control : Antibiotics-Avilamycin, 0.05%), PC II(positive control: Probiotics- Lactobacillus, 0.2%), A3(Antimicrobial peptide A3 60ppm+ Lactobacillus,) 그리고 P5 (Antimicrobial peptide P5 90ppm+ Lactobacillus)로 하였으며, 시험사료 배합비는 아래와 같다(Table 57, 58).

(3) 사양관리

Broiler는 체중을 기초로 하여 5처리로 처리 당 4반복, 반복 당 20수씩 완전임의 배치하였다. 전 사양기간 평사(사양면적: 2m×2m)하였으며 바닥에는 왕겨를 깔았다. 사료통과 물통은 가장자리에 설치하였으며, 시험기간 내 시험사료와 물은 자유채식 시켰다. 기타 사양관리는 본 연구실의 관행법에 준하여 실시하였다.

(4) 조사항목

1) 사양성적

본 시험의 사양성적을 조사하기 위하여 체중 측정은 시험개시, starter와 finisher의 종료시에 측정하였으며 사료섭취량은 체중 측정시 사료 급이통에서 사료잔량의 무게를 측정하였다.

2) 영양소 소화율

영양소 소화율을 측정하기 위하여 불소화 지시제인 산화크롬(Cr₂O₃, 0.25%)을 시험사료에 첨가하여 급여하였으며 변화된 환경에 적응시키기 위하여 예비기간을 3일간 두었다. 각 단계별로 분을 채취하여 65℃의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분석사료로 사용하였다. 시험사료와 분의 일반성분은 AOAC(1990)에 준하여 분석하였으며 영양소 소화율은 다음의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{\{1 - (\text{사료중의 Cr함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%}) / (\text{분중의 Cr함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%})\} \times 100}$$

회장내용물은 각 단계 종료 시 처리별로 8수씩(총 40수) 도축하여 회장내용물을 채취하여 -20℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 회장내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동건조하였다. 건조된 시료는 1mm screen wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장보관하였다. 회장내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters

486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 함유황아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid 용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

3) 장 및 분 중 미생물

장 및 분 중의 미생물 검사를 하기 위해 샘플을 5g씩 채취하여 45ml 희석액에 넣고 균질하게 1차 현탁액을 만들어 현탁액 1ml를 9ml 희석액에 연속 희석하였다. 희석 중 혐기 상태를 유지하기 위하여 희석액 표면을 파라핀 오일로 코팅하였고 질소 가스로 충전하며 실험하였다. 제조된 희석액 중 원하는 희석액을 1 ml를 페트리디쉬에 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 희석액은 peptone와 L-cysteine-HCl을 각각 0.5%, 0.05%씩 첨가한 용액을 사용하였다. 균수 측정을 위한 사용한 배지와 배양 조건은 Table 56과 같으며, 미생물 중 총균수(total anaerobic bacterial counts), *Clostridium spp.* counts는 Gas Pak System (BBL)을 사용하여 혐기상태로 배양하였고, Coliforms counts는 호기 상태로 배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산 후 log10으로 환산하였다. 배양조건은 37°C, 48시간 이었다.

Table 56. Selection media and culturing condition for the enumeration of microorganisms

Item	Medium	Incubation	
		Temperature (°C)	Hour
Total anaerobic bacteria	Tryptic soy agar ¹	37	48
<i>Clostridium spp.</i>	TSC agar (anaerobic) ¹	37	48
Coliforms	Violet red bile agar	37	48

¹Anaerobic : Gas pak anaerobic system (BBL).

4) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

육계의 총 IgG, IgA와 IgM의 양을 측정하기 위해 육계의 익정맥에서 혈액을 채혈 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 총 IgG, IgA와 IgM은 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 Chicken IgG ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA), Chicken IgA ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)와 Chicken IgM ELISA Quantitation Kit(Bethyl, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgG, IgA와 IgM의 측정은 96 well plate에 Coating Buffer(0.05M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6)와 Goat anti-Chicken IgG antibody, Goat anti-Chicken IgA antibody, Goat anti-Chicken IgM antibody를 각각 1:100으로 희석한 용액을 100µl씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 Wash Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 3회 세척하였다. Blocking Solution(50nM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 200µl씩 넣고 37°C에서 30분간 배양한 후 3회 세척하였다. 계단식으로 희석한 표준혈청과 육계의 혈청을 well에 각각 100µl씩 넣은 후 37°C에서 1시간 배양한 후 5회 세척하였다. Goat anti-Chicken IgG-HRP conjugate

antibody, Goat anti-Chicken IgA-HRP conjugate antibody와 Goat anti-Chicken IgM-HRP conjugate antibody를 Conjugate Diluent(50mM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 각각 1:40,000과 1:60,000, 1:40,000로 희석한 후 well에 각각 100 μ l씩 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 5회 세척한 후 발색제(TBM solution)를 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응 시킨 후 2M H₂SO₄를 각각 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 plate를 ELISA reader를 이용하여 450nm의 흡광도에서 분석하였다.

5) 도체성적 및 장기발달 정도

항균 펩타이드(A3, P5)의 급여가 도체성적과 소화기관의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 도체율 및 각 소화기관의 무게를 측정하였다. 각 단계 종료 시 각 처리별로 8수씩 도축하여 각 소화기관의 전체무게를 측정하고 내용물을 제거한 뒤 마른 수건으로 물기를 없애고 빈 소화관 무게를 측정하였다.

6) 소장 morphology

항균 펩타이드(A3, P5)의 급여가 소장내 용모의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 각 단계 종료 시 처리별로 8수(총 40수)씩 도살 한 후 회장말단부위로부터 상단 15cm부분을 적출하여 식염수로 세척한 다음 10% formalin 용액에 침지하여 전자현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

용모 높기와 용와 깊이를 측정하기 위하여 10% formalin 용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색한 시료는 40배 배율에서 전자현미경으로 측정하였다(Cera 등, 1988). 용모높이와 용와깊이의 비율은 두 수치를 나누어 산출하였다.

(5) 통계분석

시험설계는 완전임의배치법으로 실시하였으며, SAS(1985)의 GLM 절차를 이용하여 분산 분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정으로 유의성을 검정하였다.

Table 57. Formula and chemical composition of experimental diets
(starer : 0~3 wk)

Item ¹	NC	PC I	PC II	P5	A3
Ingredients (%)					
Corn	55.68	55.63	55.48	55.31	55.13
SBM (44%)	26.19	26.19	26.19	26.19	26.19
Wheat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Corn gluten meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish meal (55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soy-oil	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
TCP	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
DL-Methionine (50%)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Choline chloride (50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Trace mineral premix ³	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin (20ppm)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
A n t i m i c r o b i a l peptide(type II)	-	-	-	0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Ca	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Avail. P	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Lysine	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Methionine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Met + Cys	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PCII: Positive Control II (Probiotics), P5, A3 : Antimicrobial peptide

²Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

³Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

Table 58. Formula and chemical composition of experimental diets
(finisher: 4~5 wk)

Item ¹	NC	PC I	PC II	P5	A3
Ingredients (%)					
Corn	58.34	58.29	58.14	57.97	57.79
SBM (44%)	21.43	21.43	21.43	21.43	21.43
Wheat	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Animal fat	3.86	3.86	3.86	3.86	3.86
TCP	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lysine (78%)	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
DL-Methionine (50%)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline chloride (25%)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Vitamin premix ²	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Trace mineral premix ³	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Avilamycin (20ppm)	-	0.05	-	-	-
Lactobacillus	-	-	0.20	-	-
A n t i m i c r o b i a l peptide(type II)	-	-	-	0.37	0.55
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (%)					
ME (kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP	20.00	20.10	20.10	20.10	20.10
Ca	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Avail. P	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine	0.39	0.38	0.38	0.38	0.38
Met + Cys	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), P5, A3 : Antimicrobial peptide

²Supplied per kg diet : 10,000IU Vit A, 2,500IU Vit D₃, 50IU Vit E, 1.5mg Vit K₃, 1.5mg Vit B₁, 5mg Vit B₂, 3mg Vit B₆, 0.025mg Vit B₁₂, 15mg Pantothenic Acid, 35mg Niacin, 0.15mg Biotin, 1mg Folic Acid, 6mg Ethoxyquin.

³Supplied per kg diet : 45mg Fe, 4.25mg Cu, 65mg Zn, 72.5mg Mn, 0.2mg Co, 0.5mg I, 0.15mg Se, 0.5mg Mo, 0.15mg Cr.

(6) 연구결과

1) 사양성적과 영양소 소화율

육계 사료내 항균펩타이드(A3, P5)의 급여가 사양성적에 미치는 영향은 Table 59와 같다. 전기(0~3주)에서는 항생제 급여구(PC I)가 대조구(NC)에 비해 증체량 및 사료요구율이 유의적으로 개선된 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 생균제 급여구(PC II) 및 항균펩타이드(A3, P5) 급여구와는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 후기(4~5주)에서는 항생제와 P5 급여구가 대조구에 비해 증체량 및 사료요구율을 유의적으로 개선시켰으며($p < 0.05$), A3 급여구에서도 대조구에 비해 사료요구율이 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). 시험 전체 기간(0~5주)동안 P5 급여구는 항생제 급여구와 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), 대조구 및 생균제 급여구에 비해 증체량 및 사료요구율이 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). 항균펩타이드 급여구간에는 P5 급여구가 A3 급여구에 비해 사양성적이 개선되는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 59. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on growth performance in broilers

Item ¹	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Starter (0 ~ 3 wk)						
Weight gain, g	641 ^b	708 ^a	654 ^{ab}	668 ^{ab}	683 ^{ab}	9.50
Feed intake, g	1043	1087	1043	1052	1066	13.51
FCR	1.63 ^a	1.54 ^c	1.60 ^{ab}	1.57 ^{bc}	1.56 ^{bc}	0.01
Finisher (3 ~ 5 wk)						
Weight gain, g	962 ^c	1025 ^a	971 ^c	988 ^{bc}	1009 ^{ab}	28.32
Feed intake, g	1717	1757	1707	1711	1735	10.18
FCR	1.78 ^a	1.71 ^c	1.76 ^{ab}	1.73 ^{bc}	1.72 ^{bc}	0.01
Overall (0 ~ 5 wk)						
Weight gain, g	1557 ^c	1686 ^a	1578 ^c	1610 ^{bc}	1646 ^{ab}	13.53
Feed intake, g	2760	2844	2750	2764	2801	17.95
FCR	1.77 ^d	1.69 ^a	1.74 ^c	1.72 ^b	1.70 ^{ab}	0.01

^{abcd}Values with different superscripts of the row significantly differ ($P < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

항균펩타이드 급여에 대한 영양소 소화율의 시험 결과는 Table 60와 같다. 전기 소화율에서는 P5 급여구가 대조구에 비해 DM 및 CP의 소화율이 유의적으로 개선된 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 항생제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구는 대조구에 비해 CP 소화율이 유의적으로 개선된 것으로 나타났으며($p < 0.05$), P5 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 후기 소화율에서는 P5 급여구가 대조구에

비해 CP 및 GE의 소화율이 유의적으로 개선되었으며($p < 0.05$), 항생제 급여구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 항균펩타이드 급여구간에는 P5 급여구가 A3 급여구에 비해 영양소 소화율이 개선되는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 60. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on nutrient digestibility (%) in broilers¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 21						
DM	73.58 ^b	77.03 ^a	74.89 ^{ab}	75.46 ^{ab}	76.38 ^a	0.40
CP	66.58 ^c	72.43 ^a	68.14 ^{bc}	69.15 ^b	69.82 ^b	0.50
GE	76.78	79.07	77.46	78.35	78.78	0.30
Ash	41.88	42.71	42.13	42.17	42.34	0.22
Ca	37.23	40.30	38.46	39.55	39.25	0.39
P	36.83	39.22	37.50	38.02	38.39	0.30
d 35						
DM	72.71 ^b	75.40 ^a	73.23 ^b	73.90 ^{ab}	74.10 ^{ab}	0.33
CP	65.14 ^b	68.96 ^a	66.98 ^{ab}	66.79 ^{ab}	67.98 ^a	0.43
GE	74.56 ^b	77.10 ^a	75.54 ^{ab}	75.73 ^{ab}	76.25 ^a	0.28
Ash	38.61	39.94	38.84	38.98	39.28	0.21
Ca	34.89	36.16	35.32	35.55	35.63	0.19
P	34.26	35.51	34.75	35.04	35.07	0.24

^{abc}Values with different superscripts in the same row differ significantly differ ($p < 0.05$).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

Table 61은 육계의 회장 아미노산 소화율을 나타낸 것이다. 분석 결과 필수아미노산 및 비필수아미노산 소화율에서 항생제, 생균제 및 항균펩타이드(A3, P5) 급여구가 대조구에 비해 아미노산 소화율이 개선되는 경향을 나타냈으나, 모든 급여구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다($P > 0.05$).

Table 61. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) apparent ileal digestibility (%) of amino acids in broilers (d 35)¹

Item	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Essential amino acid						
Arg	64.37	67.27	65.62	66.05	66.80	0.42
His	60.94	62.98	61.53	62.18	61.90	0.44
Ile	63.21	65.03	64.12	63.63	64.47	0.32
Leu	70.29	71.56	70.32	71.15	71.33	0.36
Lys	69.21	71.49	69.91	70.03	70.14	0.41
Met	71.49	73.84	71.88	72.49	72.36	0.39
Phe	64.43	66.99	65.42	65.53	66.26	0.37
Thr	46.71	48.26	47.38	47.76	47.56	0.39
Val	50.63	53.21	52.09	52.80	52.86	0.41
Non-essential amino acid						
Ala	60.73	62.50	61.21	61.44	61.61	0.46
Asp	58.40	60.42	58.92	59.75	60.10	0.30
Cys	56.80	59.76	57.76	57.99	58.22	0.44
Glu	67.50	69.63	67.73	68.72	69.33	0.31
Gly	50.28	53.32	50.93	51.72	51.86	0.52
Ser	58.44	61.13	58.92	59.39	59.31	0.54
Tyr	56.14	57.87	56.38	56.87	57.09	0.31

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error of means.

2) 장 및 분 중 미생물

Table 62는 항균펩타이드 급여에 따른 육계의 분 중 미생물의 변화에 대해 나타낸 것이다. 21일째의 Coliforms의 수치에서는 항생제 및 P5 급여구가 대조구에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 대조구를 제외한 다른 급여구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 35일째에서는 총 혐기성균수, *Clostridium. spp.* 및 Coliforms의 수치에서 P5 급여구가 대조구에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 항생제 급여구와의 비교에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). A3 급여구는 대조구에 비해 총 혐기성균수 및 Coliforms의 수치가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며($p < 0.05$). 항균펩타이드(A3, P5) 급여구 간의 비교에서는 P5 급여구가 A3 급여구에 비해 *Clostridium. spp.* 및 Coliforms의 수치가 감소하는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 63은 항균펩타이드 급여에 따른 육계의 장내 미생물의 변화에 대해 나타낸 것이다. 항생제 급여구는 다른 처리구에 비해 회장과 맹장에서 TAB, *Clostridium. spp.* 및 Coliforms의 수치가 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 항균펩타이드(A3, P5)와 생균제 급여구에서도 대조구에 비해 TAB, *Clostridium. spp.* 및 Coliforms 수치가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 펩타이드 급여구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 62. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in excreta of broilers¹

Item ¹	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 21						
TAB ³	8.66	8.53	8.61	8.59	8.57	0.02
<i>Clostridium spp.</i>	7.35	7.27	7.32	7.31	7.29	0.01
Coliforms	6.78 ^a	6.61 ^b	6.71 ^{ab}	6.68 ^{ab}	6.66 ^b	0.02
d 35						
TAB ³	8.60 ^a	8.41 ^c	8.53 ^{ab}	8.48 ^{bc}	8.45 ^{bc}	0.02
<i>Clostridium spp.</i>	7.33 ^a	7.18 ^c	7.28 ^{ab}	7.26 ^{abc}	7.25 ^{bc}	0.01
Coliforms	6.74 ^a	6.53 ^c	6.67 ^{ab}	6.63 ^b	6.59 ^{bc}	0.02

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (P<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

Table 63. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on bacterial populations (Log₁₀ CFU/g) in ileal and cecal of broilers (d 35)¹

Item ¹	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Ileum						
TAB ³	8.22 ^a	8.04 ^c	8.15 ^{ab}	8.17 ^{ab}	8.13 ^{bc}	0.02
<i>Clostridium spp.</i>	7.20 ^a	7.07 ^c	7.16 ^{ab}	7.11 ^{bc}	7.10 ^{bc}	0.01
Coliforms	6.34 ^a	5.99 ^c	6.16 ^b	6.15 ^b	6.13 ^b	0.03
Cecum						
TAB ³	8.26 ^a	8.07 ^c	8.20 ^{ab}	8.17 ^b	8.18 ^b	0.02
<i>Clostridium spp.</i>	7.23 ^a	7.10 ^b	7.16 ^{ab}	7.16 ^{ab}	7.15 ^{ab}	0.01
Coliforms	6.34 ^a	6.04 ^c	6.26 ^{ab}	6.25 ^{ab}	6.22 ^b	0.03

^{abc}Values with different superscripts of the row significantly differ (P<0.05).

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

3) 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도

Table 64는 항균펩타이드 급여에 의한 육계의 IgG, IgA 및 IgM 농도를 나타낸 것이다. 21일째와 35일째에서 항생제 급여구와 항균펩타이드(A3, P5) 급여구에서 대조구에 비해 IgG, IgA 및 IgM 농도가 높게 나타났으나, 모든 급여구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (p>0.05).

Table 64. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on serum immunoglobulins (mg/dl) of broilers¹

Item ¹	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
d 21						
IgG	278.67	280.43	282.76	281.83	281.37	9.11
IgA	36.39	38.57	35.62	38.60	37.73	1.90
IgM	73.06	74.93	73.11	73.91	74.09	1.28
d 35						
IgG	278.01	281.52	259.76	282.47	280.30	10.28
IgA	38.12	39.39	38.70	39.41	38.79	0.97
IgM	74.16	75.82	74.06	73.50	74.26	1.44

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

4) 장기무게 및 소장의 형태

Table 65는 항균펩타이드 급여에 따른 육계의 소장 형태 변화를 나타낸 것이다. 십이지장, 공장 및 회장의 융모길이(villus height, VH)와 융와깊이(Crypt depth, CD), 융모길이와 융와깊이의 비례정도(VH/CD)를 조사한 결과 각 급여구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ($p>0.05$).

Table 65. Effects of antimicrobial peptide (A3, P5) supplementation on small intestinal morphology in broilers (d 35)¹

Item ¹	NC	PC I	PC II	A3	P5	SEM ²
Villus height, μm						
Duodenum	1513	1570	1529	1531	1569	26.05
Jejunum	852	863	848	833	857	18.22
Ileum	413	425	429	421	434	13.58
Crypt depth, μm						
Duodenum	397	378	374	363	353	9.07
Jejunum	309	335	331	339	370	8.88
Ileum	230	222	228	233	236	5.97
VH/CD						
Duodenum	3.83	4.21	4.11	4.28	4.51	0.13
Jejunum	2.80	2.58	2.65	2.49	2.34	0.10
Ileum	1.84	1.95	1.88	1.84	1.86	0.08

¹NC: Negative Control, PC I: Positive Control I (Antibiotics), PC II: Positive Control II (Probiotics), A3, P5: Antimicrobial peptide

²SEM: Standard error mean.

(7) 요약

본 시험의 결과 육계에서 장내 미생물, 영양소 소화율 및 사양성적에 미치는 영향은 항생제 복합제 급여구가 항균펩타이드(A3, P5) 급여구보다 큰 것으로 나타났다. 항균펩타이드간의 비교에서는 P5 급여구가 A3 급여구에 비해 우수한 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 대조구에 비하여 항균펩타이드 급여구는 분과 장내 유해 미생물의 수치를 감소시켜 영양소 소화율을 개선하였다. 이로 인하여 사양성적도 개선하는 것으로 판단되며, 기존의 항생제 대체하기 위해서는 더 높은 수준의 항균펩타이드를 첨가하여야 할 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1차년도	제1세부과제 조선대	<ul style="list-style-type: none"> ◦항균 peptide 개발 및 항생제 기능 효과검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◦기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 지닌 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색 ◦기존에 개발된 항균 펩타이드(P5)를 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행 ◦항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체재 실험을 위한 대량 생산 ◦기존에 개발된 항균 펩타이드보다 우수한 새로운 항생 펩타이드(신규 펩타이드)의 설계 	100
	협동 (주)바이오 리더스	<ul style="list-style-type: none"> ◦유용 펩타이드 항생물질의 선별(P5) ◦유산균 표면발현 시스템 확립 ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ◦최적의 유산균 표면 발현 모체 선정 및 고효율 항시적 프로모터의 선정 ◦펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종) ◦숙주 유산균의 동정, 선별 ◦펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 유산균 형질 전환법 확립 ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인 	100
	협동 강원대	<ul style="list-style-type: none"> ◦생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5의 항생제 대체효과 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ◦자돈을 이용한 효능검증 ◦육계를 이용한 효능검증 	100

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
2차년도	제1세부과제 조선대	<ul style="list-style-type: none"> ◦P5 항균 peptide, 생균제 배양 및 효과검증 ◦신규 항균 peptide 선발 및 생균제 배양 및 효과검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◦항균 peptide(P5)의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체재 실험을 위한 대량 생산 ◦신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 병원성 박테리아와 곰팡이를 대상으로 항생제 기능 탐색 ◦신규 펩타이드의 적혈구를 대상으로 하는 세포 독성 실험 수행 ◦신규 펩타이드의 락토바실러스 생균제의 항생제 대체재 실험을 위한 대량 생산 ◦최종 선정된 2종의 항생 펩타이드에 대한 각종 동물세포주를 이용하여 세포독성 여부 검토 ◦장내세균 및 식중독 유발 세균에 대한 독성 검토 	100
	협동 (주)바이오리더스	<ul style="list-style-type: none"> ◦신규 유용 펩타이드 항생물질의 선별(Anal3) ◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 최적화 조건 확립 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 효능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦신규 펩타이드 항생물질 표면 발현 벡터의 제작(1종) ◦신규 펩타이드 항생물질의 유산균 표면 발현 유도 및 확인 ◦펩타이드 항생물질의 항시적 유산균 표면발현을 위한 조건의 최적화 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균 효능 확인 	100
	협동 강원대	<ul style="list-style-type: none"> ◦생균제 배지에서 배양된 새로운 항균 펩타이드 A3의 항생제 대체효과 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ◦자돈과 육계 사료내 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5 함유 생균제와 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구 	100

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
3차년도	제1세부과제 조선대	◦항균 peptide 대량생산 및 분리 기술의 단순화	◦항생제 활성 단백질의 분자량 확인 ◦분리 단백질(펩타이드)의 분리 효율 검증 ◦최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량생산 기술의 단순화 ◦최종 선정된 2종의 락토바실러스 생균제에 대한 대량분리기술의 단순화	100
	협동 (주)바이오리더스	◦펩타이드 항생물질의 유산균 표면발현 최적화 조건 확립 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 효능 분석	◦펩타이드 항생물질의 항시적 유산균 표면발현을 위한 조건의 최적화 ◦펩타이드 항생물질을 표면 발현하는 유산균의 항진균 효능 확인	100
	협동 강원대	◦생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 P5와 A3의 효과 검증	◦자돈과 육계 사료내 새로운 항균 펩타이드와 생균제 배지에서 배양된 항균 펩타이드 A3의 항생제와의 비교를 통한 성장, 영양소 소화율, 소장의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구	100

제 2 절 관련분야의 기술발전의 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 식품보존제, 사료첨가제, 항바이러스제 및 항암제 등으로 그 이용 범위가 넓어(Mitscher et al, 1987) 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 연구개발에 관심을 기울이고 있다.

이에 본 연구과제에서는 산업, 경제적으로 큰 부가가치를 창출할 수 있는 항생제 기능성 펩타이드를 생산하는 신규 펩타이드를 개발하여 단백질생화학의 집중연구를 수행하고 펩타이드공학 기술의

노하우를 축적함으로써 펩타이드 공학의 발전에 세계 시장을 겨냥한 신기능성 펩타이드 체제를 개발하여 국가경제 및 산업발전에 기여하리라 여겨진다. 또한 최근 전세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성 세균에 대한 항생제 대체제 및 사료 첨가용 항생제를 대체할 수 있는 무독성의 체제 개발이 가능할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 과제를 통하여 개발된 유산균 표면 발현 항생 펩타이드를 이용하여 기본적으로는 사료 개발 회사 및 사료첨가제 개발 회사 등 새로운 기능성 항생제 대체제에 다양하게 응용할 수 있다. 또한 현대사회에 있어서 사람을 포함하여 동식물 모두 질병예방 및 치료 목적으로 항생제 사용이 불가피하고 현 항생제의 대부분이 각종 부작용과 사용규제가 늘고 있는 실정이다. 그래서 인체와 가축, 식물 및 환경에 까지 무해한 항생제의 개발이 필수적인 상황에서, 개발된 항생 펩타이드를 사용한다면 가축 및 어류의 사료사업이나 생활용품 및 의약계 등 다양한 분야에서의 응용이 가능할 것이다.

제 2 절 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 특허: 2건 출원 진행중
 - 항생펩타이드를 이용한 육계에 대한 항생제 대체제 개발 연구
 - 항생펩타이드를 이용한 자돈에 대한 항생제 대체제 개발 연구
- 논문: 국제학술 논문(SCI) 2건 게재 및 국제학술 논문(SCI) 3건 준비중
 - 항생펩타이드 개발 P5에 대한 연구 논문 게재
 - 항생펩타이드 개발 A3에 대한 연구 논문 게재
 - 항생펩타이드를 이용한 육계에 대한 항생제 대체제 개발 연구
 - 항생펩타이드를 이용한 자돈에 대한 항생제 대체제 개발 연구

제 3 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 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

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 (Cubist제약회사)은 2004년도 판매액이 약 6천만 달러에 이 름.
- 그러나 국외에서도 아직까지 감자를 이용한 항생 펩타이드 이용 기술 및 가축의 사료, 식 중독 유발세균이나 화장품에 여드름 등의 미생물을 목표로 하여 기능성 제품을 생산하는 경우는 없었음.
- 신개념 펩타이드 항생소재의 개발[사료첨가제, 화장품첨가제, 식품첨가제(Russell, 1991)] 은 5억달러 이상의 세계시장 점유효과 및 이에 따른 수출효과/수입대체효과가 기대됨.
- LL-37는 인간으로부터 분리된 35개의 아미노산 잔기로 이루어진 cationic amphiphathic α -helical antimicrobial peptide이다 (Henzler Wildman et al, 2003).
- Pseudin-2는 *Paradoxical Frog*로부터 분리된 24개의 아미노산으로 이루어진 양성전하를 갖는 amphiphathic α -helical antimicrobial peptide 이다.
- Cecropin A(CA)는 *hyalophora cecropia pupae*로부터 분리된 N-말단에 Lys 잔기가 많 이 존재하며, C-말단에는 긴 소수성 아미노산들이 많이 존재, α -helix구조, Gly-Pro 서열 을 포함한 hinge region 함유(Gazit et al, 1994, Steiner et al, 1998).
- Melittin(ME)은 26개의 아미노산으로 구성, α -helical amphiphathic structure, C-말단에 Lys잔기가 많이 존재, N-말단에는 소수성 아미노산들이 많이 존재.
- Magainin-2 (MA)은 α -helical amphiphathic structure에 속하는 항균 펩타이드로서 개구 리의 피층(skin)으로부터 분리(Zasloff, 1987).
- 항균 펩타이드의 α -helix구조에 의해 세포막이 파괴되는 메카니즘은 항균 펩타이드의 α -helix부분이 표적세포의 지질 이중층 막상(lipid bilayer)에 박힌 다음 pore 또는 ion channel를 형성함으로서 막투과성이 증가하여 세포막의 생리적 ion gradient 균형 또는 막 전위의 파괴등에 의하여 최종적으로 세포가 사멸 (cell death)하는 작용 메카니즘으로 보고 (Ganz et al, 1994).

제 7 장 참고문헌

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. *Assoc. Offic. Anal. Chem.* Arlington, VA.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia-Olmedo, F. and Molina, A. 2002. *Plant Physiol.* 128:951-961.
- Boman, H. G. and Hultmark, D. 1987. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:103-126.
- Boman, H. G., Faye I., Gudmundsso, G. H., Le,e J. Y. and Lidholm, D. A. 1991. *Eur. J. Biochem.* 201:23-31.
- Broekaert W., Terras, F., Cammue, B. P. A. and Osborne, R. 1995. *Plant Physiol.* 108:1353-1358.
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A. and Whitmoyer, R. E. 1988. *J. Anim. Sci.* 66:574-584.
- De Lucca, A. J. and Walsh, T. J. 1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1-11.
- Dial, E. J., Hall, L. R., Serna, H., Romero, J. J., Fox, J. G. and Lichtenberger, L. M. 1998. *Dig. Dis. Sci.* 43:2750-2756.
- Doyle, M. E. 2001. *Briefings Food Research Institute.* University of Wisconsin-Madison.
- Draper, M. E. 1958. *Food Research Institute Briefings.*
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. 1994. *Curr. Opin. Immunol.* 6:584-589.
- Gaskins, H.R., In:Mackie, R., White, B.A. and Isaacson, R.E. (Eds.) 1997.*Gastrointestinal Microbiology.* Chapman & Hall, New York, NY, p. 537.
- Gazit, E., Lee, W. J., Brae, P. T. and Shai, Y. 1994. *Biochemistry* 33:12416-12423.
- Han, C. K., Lee, B. H., Song, K. S., Lee, N. H. and Yoon, C. S. 1996. *Korean J. Nutr.* 29:1087-1095.
- Henzler, W. K. A., Lee, D. K. and Ramamoorthy, A. 2003. *Biochemistry* 42: 6545-6558.
- Hoffmann, J. A. 1995. *Curr. Opin. Immunol.* 7:4-10.
- Hunter, H. N., Fulton, D. B. Ganz, T. and Vogel, H. J. 2002. *J. Biol. Chem.* 277:37597-37603.
- Kelly, D. and King, T. P. 2001. pp. 113-131 in Gut Environment of Pigs. A. Piva, K. E. Bach Knudsen and J. E. Lindberg, ed. *Nottingham University Press.* Nottingham, UK.
- Kendall, D. C., Richert, B. T., Weber, T. E., Bowers, K. A., Decamp, S. A., Schionckel, A. P. and Matzat, P. 2000. *J. Anim. Sci.* 78:39.

- Kim, J. Y., Park, S. C., Kim, M. H., Lim, H. T., Park, Y. and Hahm, K. S. 2005. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:921-927.
- Kim, M. H., Park, S. C., Kim, J. Y., Lee, S. Y., Lim, H. T., Cheong, H. S., Hahm, K. S. and Park, Y. 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:681-686.
- Koch, A. L. 1981. *Microbiol. Rev.* 45:355-378.
- Kwon, A. R. and Bals, R. 2003. *Drugs* 63:389-406.
- Lee, D. G., Shin, S. Y., Maeng, C.-Y., Jin, Z. Z., Kim, K. L. and Hahm, K.-S. 1999. *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. *Cells* 5:429-435.
- Mitscher, L. A., Darke, S., Gollapudi, S. R. and Okwute, S. K. 1987. *J. Nat. Prod.* 50:1025-1040.
- Monroe, S. and Polk, R. 2000. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:496-501.
- Moore, S. 1963. *J. Biol. Sci.* 38:235-237.
- NRC, 1998. Nutrient Requirements of Swine. (10th Ed.) *National Academy Press*, Washington, DC.
- Ogawara, H. 1981. *Microbiol. Rev.* 45:591-619.
- Pluske, J. R., Williams, I. H. and Aherne, F. X. 1996. *Anim. Sci.* 62:145-158.
- Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R. and Blecha, F. 2002. *Microbes Infect.* 4: 361-372.
- Russell, A. D. 1991. *J. Appl. Bacteriol.* 71:191-201.
- Saberwal, G. and Nagaraj, R. 1994. *Biochim. Biophys. Acta* 1197:109-131.
- SAS. 1985. SAS/STAT® Users guide (Release 6.03 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T. R. 2001. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:431-437.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M. and Gennaro, R. 1999. *FEBS Lett.* 463:58-62.
- Steiner, H., Andreu, D. and Merrifield, R. B. 1998. *Biochem. Biophys. Acta.* 939:260-266.
- Taniguchi, M. and Kubo, I. 1993. *J. Nat. Prod.* 56:1539-1546.
- Wang, Y. Z., Shan, T. Z., Xu, Z. R., Feng, J. and Wang, Z. Q. 2006. *Anim. Feed Sci. Tech.* 135:263-272.
- Weber, H. C., Aarestrup, F. M., Gerner-Smidt, P. and Bager, F. 2001. *Acta Vet. Scand.* 92:51-57.

Yanson, J. T. and Pond, W. G. 1987. *J. Anim. Sci.* 68:4236.

Zasloff, M. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5449-5453.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.