

육계 병아리 사료중 갈조류(미역: *Undaria pinnatifida*)의 항염증기능

임진택

건국대학교 축산대학 영양자원학과

요약

본 연구는 육계병아리에서 사료중 미역산물이 타고난 면역(급성기 반응)에 미치는 영향을 평가하여 기능성 사료자원으로서 미역산물의 이용가능성을 평가하기 위해 실시하였다.

실험 1에서는 사료중 미역산물의 수준이 육계병아리의 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 갓 부화한 슛컷 병아리(Ross종)에 기초사료의 밀기울 대신 각각 0.0, 1.0, 2.0 및 4.0%의 미역산물을 대치한 네 종류의 실험사료를 2 주간 급여하여 육계병아리의 생산성과 영양소 이용성을 평가하였다. 미역산물 2.0% 사료는 사료효율과 육계병아리의 질소밸런스를 유의하게($p < 0.05$) 증가시키고 노산배설량을 감소시켜 체내 단백질 축적량을 높였다.

실험 2는 미역산물 2.0% 사료와 기초사료를 육계병아리에 4주간 급여하면서 급성기반응시 나타나는 성장감소에 대한 미역산물의 효과와 타고난 면역능력에 미치는 영향을 조사하였다. 육계병아리 2주령의 복강내에 *Salmonella typhimurium* LPS를 주입하여 급성기 반응(타고난 면역)을 활성화 하였다. 급성기반응시 미역산물 2.0% 사료급여시 사료효율은 기초사료와 차이를 나타내지 않았으나, 혈중 TNF- α 의 수준을 유의하게($p < 0.05$) 감소시켰으며, 혈중 오보트렌스페린 농도는 유의한 차이가 없었다. 육계병아리 4주령의 PBMC 증식도와 Macrophage/monocyte로부터의 IL-1 분비는 미역산물 2.0% 사료의 급여로 유의하게 기초사료 급여에 비해 증가하였다($p < 0.05$).

본 성적은 육계병아리에서 미역산물 2.0% 사료는 IL-1의 분비와 PBMC증식도를 높여서 타고난 면역을 조정하여 급성기 반응을 완화한 결과 육계병아리의 단백질 축적량과 생산성을 증진시킨다는 것을 나타내었다. 결론적으로 본 성적은 미역

산물 2.0% 사료가 가금의 강건성을 유지하는 기능성 사료원료로 사용이 가능하다는 것을 시사하였다.

I. 서 론

동물의 생산성감소는 주로 감염(infection)에 의한 면역반응의 발생에 따른 항상성(homeostasis) 조절에 기인한다. 감염된 동물은 그 감염원을 인식하여 처리하는 면역반응을 활성화 한다.

감염원의 침입을 받으면 대식세포(macrophage)가 활성화되어, 감염원 식작용(phagocytosis)반응이 일어나는 타고난 면역계(innate immune system)[급성기반응(acute phase response)]가 활성화한다. 타고난 면역은 감염초기에 동물체에 신속하고 강력한 첫번째 방어 역할을 수행한다(Klasing, 1998). 한편 특이항체 생산은 타고난 면역계에 의한 항원 제시(antigen presenting)와 항체생산을 위한 B 림프구 증식에 수 일이 필요하기 때문에 감염초기에는 동물체가 획득면역계로부터 충분한 방어기능을 제공받기 어렵다(Humphrey와 Klasing, 2004). 또한 어린동물의 획득면역은 성숙한 동물에 비해 불완전하여 육계병아리의 경우 3~4주령 이후에 파브리시우스 낭(bursa of fabricius)이 발달하여 획득면역이 완성된다(Humphrey등, 1997). 따라서 어린 동물의 면역력은 거의 전적으로 타고난 면역에 의지하게 된다.

Pell과 Aston등(1995)은 어린 동물의 타고난 면역성이 섭취하는 영양소에 의해 조정된다고 하였다. 육계병아리에서 부화 후 처음 1주일의 백혈구의 증식, 임파기관의 발달, 임파구의 증식등 가금의 평생 타고난 면역력을 결정짓는 중요한 시기이다. 이 시기에 급여하는 영양소의 종류와 질에 따라 타고난 면역력의 크기가 결정된다(Klasing, 1998). 육계병아리 사료중 n-3 다가불포화 지방산(n-3 polyunsaturated fatty acid)은 급성기 반응중인 가금의 생산성감소를 완화시키고(고등A, 2004; Korver와 Klasing, 1997) 부화 후 급여되는 사료중 영양소의 종류에 따라 타고난 면역계가 변화한다.

바다에서 서식하는 갈조류의 일종인 미역(*Undaria pinnatifida*)은 건물량 기준으로 조단백질과 가용성 섬유소를 각각 20.0와 33.9%를 함유한다(정, 2001). 미역중의 가용성 섬유소중에는 알긴산(alginic acid), 후코이단(fucoidans)과 래미나란(laminaran)등이 함유 되어있다. 미역중 가장 많이 함유된 성분인 가용성 섬유소 성분중에서 알긴산은 50~60%가 된다. 알긴산은 면역자극(Reen등, 1993), 항염증(Murata등, 1999), 면역억제(immunosuppress; Otterlei등, 1991)등 면역성을 조절한다고 알려져 있다. 알긴산의 면역조절능력은 알긴산의 구조적 차이에 따라 달라져 알긴산중 매뉴로닉 산(mannuronic acid)과 구류로닉 산(guluronic acid)의 상대적인 양에 따라 달라진다. 알긴산중 매뉴로닉 산이 많으면 *in vitro*상에서 랫트의 대식세포와 임파구의 증식을 증가시키고(Pueyo등, 1993), 구류로닉 산이 많으면 면역억제효과가 나타나는 것으로 알려져 있다(Otterlei등, 1991). 일반적으로 미역의 알긴산은 매뉴로닉 산을 더 많이 함유한다고 한다(Soon-Shing등, 1991). 본 연구는 미역중 알긴산의 매뉴로닉 산 함량으로부터 가정 했을 때, 육계병아리 사료중 미역산물을 부화 후 1일령부터 급여하면, 미역중 알긴산의 영향으로 타고난 면역계의 염증반응에 영향을 미칠 것으로 예상하여 실시하였다.

가금에서 사료중 해조류가 생산성에 미치는 영향에 관해서는 많은 연구들이 수행되었다(Kaufmann등, 1998; Strand등, 1998; Bratova와 Ganovski, 1982; Guevich, 1959; 김등, 2004). 그러나 면역반응에 미치는 미역산물의 영향을 조사한 연구들은 많지 않다. 상기한 미역산물 급여시 면역조절기능들은 주로 랫트와 마우스등 포유류에서 연구되어진 성과들이다.

따라서 본 연구는 사료중 미역산물이 육계병아리의 생산성과 타고난 면역성에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 1은 사료중 미역산물의 농도에 따른 육계병아리의 생산성(일당 증체, 사료섭취, 사료효율)과 영양소 이용성(질소와 에너지이용성, 질소 배출)을 조사하였다. 실험 2는 실험 1을 기초로 미역산물의 급여가 LPS주입에 의한 타고난 면역을 활성화 했을 때의 TNF- α 와 IL-1(interleukin-1)등 사이토카인 분비, 면역세포인 PBMC의 증식도 그리고 급성기 단백질인 오보트렌스페린의 분비량에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 1 : 사료중 미역산물 수준과 생산성

1-1. 실험 사료, 실험설계 및 실험 동물 사육

실험 1은 사료중 미역산물의 대치수준이 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 실험사료는 Table 1에서 보는바와 같이 NRC 사양표준(1994)에서 제시한 옥수수과 대두박 중심의 기초 사료를 조제하고, 기초사료와 기초사료 중 밀기울대신 1.0, 2.0 및 4.0 %의 미역산물을 각각 대치한 네 종류이다. 각 사료의 조단백질함량과 연소열가는 거의 동일하였다.

실험동물은 갓 부화된 Ross종 육계 병아리로서 온도와 습도가 조절되는 케이지 환경의 사육실에서 1일령부터 2주령까지 네 종류의 실험사료를 급여하여 사육하였다. 사료와 물은 자유섭취하게 하였다.

한 개의 실험 사료당 각각 6개의 우리를 할당하여 총 4개의 실험 사료구에 대해 총 24 개의 우리로 분구하여 2주령까지 육계병아리를 사육하였다.

실험 개시시와 실험종료시(2주령)에 모든 실험구 (24개 우리)의 체중을 측정하고, 매일 24시간 간격으로 정해진 시간에 사료섭취량과 사료잔량을 기록한 뒤 2주령의 일당 증체량, 사료섭취량 및 사료효율을 조사하였다.

1-2. 영양소 이용성의 평가

육계병아리 9, 11, 및 13일령에 처리구별로 분뇨혼합물을 채취하고, 균질기(IKA)로 균질화하여 균질화한 분뇨혼합물의 일정량을 취하여 총질소 함량, 노산 배설량 및 연소열가 측정에 각각 이용하였다. 균질화한 분뇨혼합물과 사료의 질소함량은 켈달법(John Kjeldahl, 1883)으로 켈달장치(Foss Tecator)를 이용하여 측정하였다. 질소밸런스(NB)는 섭취한 사료중 질소 총량에서 배설된 질소 총량을 빼낸 값이다. NB는 대사체중당 값(NB/kg^{0.75})으로 표현하였다. 분뇨혼합물중 노산태 질소(UAN; uric acid nitrogen)의 배설량은 노산의 자외선 흡수에 기초한 흡광 광도계

법(Marquardt 등, 1983)으로 측정하였다. 분뇨혼합물중 노산태 질소의 배설량은 대사체중당 노산태 질소배설량(UAN/kg^{0.75})으로 표현하였다.

균질화한 분뇨혼합물은 105°C에서 통풍 건조한 것과 사료를 단일식 폭발 열량계(PARR Instrument)로 연소열가를 측정하였다. 에너지의 이용성(ME)은 섭취한 사료 에너지 총량에서 배설된 에너지의 총량을 감한 것이다. 에너지의 이용성은 각각 대사체중당 대사에너지 이용성(ME/kg^{0.75})과 사료 g당 대사에너지 값(ME/g diet)으로 나타내었다.

2. 실험 2 : 미역산물 2.0% 사료와 급성기 반응

2-1. 실험 사료, 실험 동물 및 실험 설계

실험 2는 실험 1의 결과를 기초로 생산성과 영양소 이용성이 유의하게 향상된 미역산물 2.0% 사료를 1일령부터 4주령까지 육계병아리에 급여하면서 타고난 면역(급성기반응)에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 2의 기초사료는 실험 1과 동일하다. 실험사료는 Table 1에 표시한 바와 같이 기초사료와 기초사료 중 밀기울대신 2.0%의 미역산물을 대치한 두개의 사료이다. 갓 부화된 Ross종 육계 병아리에게 온도와 습도가 조절되는 케이지 환경의 사육실에서 1 일령부터 4주령까지 실험사료를 자유섭취(*ad libitum*)케 하였다.

2-2. 실험설계와 급성기 반응의 유도

한 사료당 각각 6개 우리(4수/우리)씩 총 12 개 우리로 육계병아리를 분구하고 4주령까지 기초사료와 미역산물 2.0% 사료를 급여하면서 사육하였다. 육계병아리 2주령에는 급성기 반응을 유도하기 위해 각 실험구의 절반인 3개 우리의 육계병아리들의 복강내에 *Salmonella typhimurium* LPS(lipopolysaccharide)용액을 1수당 3.0mL (300ug/bird)씩 주입하였다. 급성기 반응동안의 체중, 사료섭취를 기록하여 육계병아리의 생산성(증체, 사료섭취, 사료효율)을 조사하였다.

2-3. 면역반응의 평가

1) **혈장 분리와 간장과 비장의 무게** : LPS 주입에 의한 급성기 반응 유도 24 시간 뒤에 우리별로 1 수의 육계병아리를 임의로 선발하여 헤파린(heparin) 처리된 주사기로 심장천자하여 혈액을 수집하고, 원심하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 혈장은 TNF- α , 오보트렌스페린(ovotransferrin)의 측정시까지 -80°C 에 저장하였다.

병아리는 경추골을 분리하여 희생시킨 뒤 복부를 절개하여 간장과 비장을 적출해 세척 후 그 무게를 측정하였다. 간장과 비장의 무게는 체중에 대한 간장과 비장의 비율로 평가하였다.

2) **혈중 TNF- α 수준의 측정** : 혈중 TNF- α 수준은 Flick등 (1984)의 방법에 따라 10%의 FBS가 첨가된RPMI-1640배양액에서 배양한 L929 세포주(ATCC)를 96 웰 플레이트에 2.5×10^4 cells/well의 농도로 접종하고 혈장과 함께 배양하였다. L929 세포주의 괴사정도를 TNF- α 표준물질(human recombinant TNF- α ; Sigma)의 그것과 비교하여 혈장 중의 TNF- α 농도를 평가하였다.

3) **혈중 오보트렌스페린 수준의 측정** : 혈중 오보트렌스페린 수준은 Laemli등 (1970)의 방법에 따랐다. 10배 희석한 혈장을 10% acrylamide gel, 시료의 비환원(non-reducing)조건하에서 SDS PAGE로 혈장내 단백질을 전개시킨 뒤 쿠마시블루(coomassie blue)용액으로 염색하였다. 전기영동상에 나타난 분자량 65 kDa의 단백질인 오보트렌스페린을 영상분석장치(Vilber lourmat Co.)의 농도계법(densitometry)으로 정량하였다.

65 kDa 단백질의 오보트렌스페린 확인은 젤상의 혈장단백질을 NC막(nitrocellulose membrane)으로 이전시킨 뒤 anti chicken ovotransferrin 항체(Accurate chemical Co.)와 ECL용액을 이용하여 western blotting을 실시하였다(Xie등, 2002).

4) **PBMC(polymorphonuclear cell)의 분리** : 육계병아리 4 주령에 각 우리별로 1수를 임의선발하고 각각 헤파린처리 주사기로 3mL의 혈액을 채혈하여 PBS로 2배 희석 후 동량의 비중액 (Histopaque, $d=1.077\text{g/mL}$, Sigma)을 첨가한 뒤 800 g, 15 분의 조건하에서 원심분리하였다. Buffy coat층을 수집하여, RPMI-1640(5%FBS)으로 세척하여 PBMC를 분리하였다.

5) **PBMC 증식도** : PBMC는 RPMI-1640(5% FBS)으로 세포 농도를 조정된 후 웰당 10^5 개의 세포를 96 웰 플레이트에 분배하여 10ug/mL농도의 Concanavalin A(Sigma)와 함께 41 °C, 5.0 % CO₂ 에서 20시간동안 배양하고 10%의 알라마블루(alar blue, Serotec)를 첨가하여 다시 4시간 배양하였다. 24시간 배양 후 ELISA리더(Biotek)로 알라마블루의 환원정도인 570nm와 600nm간의 광학밀도차를 측정하여 PBMC 증식도를 평가하였다(Zhi-Jun, 1997).

6) **Macrophage/monocyte의 IL-1분비량** : Macrophage/monocyte의 IL-1분비량은 Klasing등 (1987)의 Thymocyte co-mitogenesis방법을 응용하였다. 처리구별로 10^7 개의 PBMC 농도로 24 웰 플레이트에 접종하고, 41 °C, 5.0 % CO₂에서 1.5 시간동안 배양한 뒤 상등액중의 T, B 임과구를 제거하였다. 남아있는 Macrophage/monocyte에 LPS가 함유된 PRMI-1640 배양액을 넣고 IL-1(interleu-kin-1)분비를 자극배양하였다. 배양상등액을 13,000 g, 10분간 원심 후 상등액을 취하여 IL-1 분석시까지 -80°C에 저장하였다.

7) **Thymocyte의 분리 및 Thymocyte Co-mitogenesis** : 5~6주령 육계병아리로부터 흉선을 채취한 후 흉선세포(thymocyte)를 분리하여 96 웰 플레이트의 웰당 10^6 개 세포씩 접종하였다. 96웰 플레이트의 흉선세포와 시료인 Macrophage/monocyte 배양액 100uL, Concanavalin A를 41 °C, 5.0 % CO₂ 조건에서 24 시간동안 함께 배양하였다. 여기에 5.0% 알라마블루를 넣고 다시 24 시간동안 배양 후 ELISA리더로 570nm와 600nm간의 광학밀도차를 측정하여 흉선세포의 증식도를 평가하였다. IL-1 분비량의 평가는 Macrophage/monocyte배양액을 첨가하지 않은 흉선세포 증식도에 대한 각 처리구의 Macrophage/monocyte 배양액 첨가 후 증식도의 값인 자극지수(stimulating index)로 표현하였다.

3. 통계분석

실험 1과 2의 데이터는 SAS 프로그램(8.1 version, 2000)에서 GLM(general linear model)으로 요인분석하고, 실험값사이의 유의차는 LSD(least significant difference)와 Student t-test검정으로 95% 신뢰수준에서 유의차를 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 실험 1 : 사료중 미역산물 수준과 생산성

1-1. 육계병아리 생산성

사료중 미역산물 수준에 따른 일당 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Figure 1, 2 및 3에 각각 나타내었다. 일당 증체량은 기초사료나 미역산물 1.0 및 2.0% 사료급여구에 비해 미역산물 4.0% 사료 급여시 감소하였다($p < 0.05$). 사료섭취량은 미역산물 사료를 급여하면 기초사료에 비해 감소하는 경향을 나타냈다. 사료 효율은 사료중 미역산물 함량에 따라 증가하여 미역산물 2.0% 사료급여시 유의하게 ($p < 0.05$) 가장 높았다. 미역산물 4.0% 사료 급여시에는 가장 낮은 사료효율을 나타내었다. 이때 미역산물 2.0% 사료급여시 가장 높은 사료효율은 사료섭취가 감소하는데 반해 일당 증체는 유의한 차이가 없었기 때문이다.

Gudiel-Urbano와 Goni등 (2002)도 렛트에서 미역 급여는 기호성 감소로 사료섭취가 감소하는 것을 관찰하였다. 이와는 반대로 Bocanegra등 (2003)은 렛트에 미역을 급여해도 사료섭취량의 감소를 관찰하지 못했다. 이들은 사료중 높은 수준(7.0%)의 미역을 첨가하여 사료중 에너지의 부족에 따른 렛트의 자발적인 사료섭취 증가에 기인한다고 추정된다.

1-2. 영양소 이용성

대사체중당 질소밸런스(NB)를 Figure 4에 그리고 분뇨혼합물중 뇨산태 질소의 배설량($UAN/kg^{0.75}$)은 Figure 5에 나타내었다. NB는 섭취한 질소총량에서 배설된 질소 총량을 감한 것으로서 실제 동물체내에 축적된 질소 총량의 외관상 값을 나타낸다. 대사체중당 NB는 사료중 미역산물 1.0 및 2.0% 사료 급여시 기초사료에 비해 증가하여 미역산물 2.0% 사료급여로 유의하게($p < 0.05$) 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 미역산물 4.0% 사료를 급여시는 낮았다. 가금의 단백질 대사 최종산물은 뇨산(uric acid), 크레아틴(creatinine), 암모니아(ammonia)의 형태로 배출되며, 뇨산은 이중 65~70%를 차지한다. 따라서 뇨산 배설량은 가금의 단백질 분해량을

나타낸다. Figure 5에 보이고 있는 바와 같이 뇨산 배설량은 미역산물 2.0% 사료를 급여했을 때 다른 실험사료들을 급여한 것보다 낮았다. 이것은 Figure 4에 나타난 미역산물 2.0% 사료급여시 NB의 증가가 체내 단백질 분해량을 감소시켜서 단백질 축적량을 높이고 있다는 것은 Figure 5의 뇨산 배설량 데이터로 증명된다.

사료 g당 대사에너지 값(ME/g diet)과 가끔 1 수당 대사에너지 이용성(ME/kg^{0.75})은 Figure 6과 Figure 7에 각각 나타내었다. 사료 g당 ME값은 미역산물 1.0 및 2.0% 사료급여시 증가하였다. 미역산물 4.0% 사료급여는 기초사료에 비해 낮아지는 경향을 나타내었다. 대사체중당 ME 이용성은 미역산물 사료의 급여로 증가하였다(p<0.05).

이미 지적한 바와 같이 Figure 3에서 미역산물 2.0% 사료급여시 사료효율이 가장 높은 것은 사료섭취는 감소하나 일당 증체는 미역산물 4.0% 사료를 제외한 실험사료 사이에 차이를 나타내지 않았기 때문이다. 이 성적은 미역산물 2.0% 사료급여시 영양소 이용성의 증가를 의미한다.

미역중 다량 함유된 가용성 섬유소중 하나인 후코이단은 FGF-2(fibroblast growth factor-2)와 결합하여 FGF-2가 목적조직(target tissue)에 도달하기 전 체내의 단백질 분해작용(proteolysis)에 의해 소멸되는 것을 방지한다(Belford등, 1993). 또한 후코이단은 FGF-2의 반감기를 증가시킨다(Lazarous등, 1997). FGF-2는 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 증가시킬 뿐만 아니라 *in vitro*상에서 장내 상피세포(epithelial cell)증식을 촉진한다(Giroux등, 1998). 따라서 미역산물 2.0% 사료급여에 의한 육계병아리의 사료효율 증가는 미역에 함유된 후코이단에 의한 FGF-2의 기능향상에 기인 할 수도 있다. 왜냐하면 기능이 향상된 FGF-2가 장내 상피세포를 발달시키면 발달된 상피세포는 단백질 소화 및 흡수등 질소의 이용성을 개선시킬 것이라 추정되기 때문이다. 그러나 이것은 앞으로의 연구과제에 해당된다.

미역산물 4.0% 사료급여는 사료효율을 감소시켰다. 이러한 현상은 다른 실험구들에 비해 미역산물 4.0% 사료에서 낮은 에너지이용성과 질소이용성것에 기인한다. 높은 수준의 알긴산 섭취는 소화관내에서 점성 겔(viscous gel)을 형성하여 영양소의 흡수를 저해한다고 하였다(Beresford등, 2000). 따라서 미역산물 4.0% 사료섭취시에는 소화관중 알긴산 수준의 증가로 영양소의 흡수가 저해되었다고 추정된다.

한편 Inakagi와 Sakata등(2001)의 연구에 의하면 맹장내 미생물들은 섬유소를 발효시켜 단쇄 지방산을 생성하고 생성된 단쇄 지방산은 상피세포의 탈락을 촉진하여, 장내 염증이나 부종을 발생시키는 것으로 알려져 있다(Bocanegra등, 2003). 본 연구에서는 사용한 미역의 조섬유 분석을 실시하지 않았으나 Table 2에서 보는 바와 같이 미역에 함유된 알긴산, 후코이단, 레미나란등 가용성 섬유소의 함량이 건물

량 기준으로 약 33.9%에 달한다(정, 2001). 따라서 미역산물 4.0% 사료 급여시 나타난 질소와 에너지이용성의 감소는 다른 실험구들에 비해 육계 병아리의 섬유소섭취가 증가함에 따라 장내 단쇄지방산의 증가에 의한 상피세포의 기능저하 및 염증이 에너지급원과 단백질의 소화 및 흡수를 감소시켰을 것이라고 생각된다.

실험 1의 성적을 종합하면 미역산물 2.0% 사료 급여는 육계병아리의 단백질 축적량을 증가시켜 사료효율을 향상시킨다는 것을 나타낸다. 미역산물 4.0% 사료는 단백질 이용성을 감소시켜 사료효율을 감소시키는 것 같다. 본 연구성적은 육계 병아리 사료로서의 미역산물의 첨가수준은 2.0%가 적정선이라는 것을 나타낸다. 본 성적을 실험 2에 적용하여 면역기능에 관한 실험을 실시하였다.

2. 실험 2 : 미역산물 2.0% 사료와 급성기 반응

2-1. 급성기 반응시 육계병아리의 생산성

급성기반응시 일당 증체량, 사료섭취량 및 사료효율의 변화를 각각 Figure 8, 9 및 10에 나타내었다. 일당 증체량은 급성기 반응으로 사료의 종류와 관계없이 감소하였다. 급성기반응은 기초사료를 급여하면 정상적인 병아리에 비해 사료섭취를 감소시켰다. 그러나 미역산물 2.0% 사료의 섭취량은 급성기 반응시 정상적인 병아리에 비해 차이가 발생하지 않았다. 사료효율은 사료의 종류에 관계없이 급성기 반응에 의해 감소하는 경향을 나타내었다. 미역산물 2.0% 사료를 급여시 급성기반응에 의한 사료효율은 기초사료와 비교해 유의한 차이가 없었다(Figure 10).

간장과 비장의 무게는 각각 Figure 11과 12에 나타내었다. 간장과 비장의 무게는 급성기반응으로 실험사료에 관계없이 증가하였다($p < 0.05$).

2-2. 혈중 TNF- α 와 오보트렌스페린 농도

Figure 13에는 혈중 TNF- α 수준에 미치는 미역산물 2.0% 사료의 영향을 나타내었다. 기초사료를 급여한 육계병아리에서 급성기반응은 정상적인 병아리에 비해 유의하게($p < 0.05$) 증가한 TNF- α 농도를 나타내었다. 한편 미역산물 2.0% 사료를 급여한 육계병아리에서는 기초사료에 비해 매우 낮은 수준의 TNF- α 농도를 나타내었다. 그리고, 미역산물 2.0% 사료를 급여했을 때 급성기반응시의 TNF- α 농도는 정상적인 병아리와 거의 비슷하였다.

Figure 14는 오보트렌스페린에 대한 western blotting의 그림이다. 전기영동상에 전개된 분자량 65kDa의 단백질이 대조로 사용된 표준 오보트렌스페린(Sigma)과 비교하여 동일한 라인에서 발광하고 있으므로 동일한 오보트렌스페린임을 증명하고 있다. 전기영동상의 농도를 농도계(densitometry)로 측정한 혈중 오보트렌스페린의 수준은 Figure 15에 나타내었다. 기초사료와 미역산물 2.0% 사료급여구 양쪽에서 급성기반응은 오보트렌스페린 농도를 높였다. 그러나 실험사료에 의한 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

급성기 반응은 동물이 감염원의 공격시 동물체내에서 한 시간 이내에 나타나는 생리적 및 대사적 항상성(homeostasis)의 변화들이다(Xie등, 2002). 대식세포는 감염원을 인지하여 활성화하면 IL-1, IL-6 및 TNF- α 등 친염증성 사이토카인들을 분비한다. 이들 사이토카인의 혈중 수준의 증가는 감염부위로 면역세포들을 모이게 하는 염증반응이 시작되게 한다(Gauldie등, 1991). 과다한 염증의 발현은 친염증성 사이토카인을 더욱 증가시켜 체내에서 열발생과 사료섭취량 감소(Koh등, 1996; Klasing과 Korver, 1997), 간장과 비장의 상대적인 무게 증가 (고등B, 2003), 골격근 단백질의 분해증가 (Klasing등, 1987)등 전신적인 염증반응을 일으키고, 영양소의 이용성을 감소시켜 동물의 생산성을 감소시킨다(임등, 2003). 한편 급성기반응은 간장에서 헤모펙신(hemopexin;Grieneringer등, 1986), 메탈로티오네인(methallothionein; Hallquist와 Klasing, 1994), 오보트렌스페린(Xie등, 2002)등의 급성기 단백질의 합성을 증가시킨다(Gaby와 Kushner, 1999). 급성기 반응시 동물체는 체내 영양소를 성장보다는 간장에서 급성기 단백질의 합성에 우선적으로 이용하여 동물의 생산성을 감소시키는 요인이 된다(Korver와 Klasing, 1997).

염증반응은 대식세포에서 분비된 TNF- α 가 감염부위 상피세포들의 세포막에서 ICAM-1(interacellular adhesion molecule-1), E-selectin등의 세포표면 수용체 분자들을 발현해 혈액중 면역세포들을 감염부위로 이동시키는 현상이다(Lawrence등, 1993). 미역에 다량 함유된 알긴산은 *in vitro*에서 상피세포들의 세포표면 수용체들의 발현을 억제하여 급성기반응을 완화하는 것으로 알려져 있다(Son등, 2001).

본 연구는 미역중 다량 함유된 알긴산이 급성기반응을 완화 할 것이라 기대하였다. 혈액중 TNF- α 감소는 급성기 반응을 완화한 결과로 사료섭취량이 증가하는 원인이라 생각된다. 이러한 미역산물 2.0% 사료에 의한 급성기반응의 완화효과는 실험 1의 생산성 향상과 일치하였다.

2-3. 미역산물 2.0% 사료와 PBMC 증식 및 IL-1의 분비

미역산물 2.0% 사료가 4주령 육계병아리의 Macrophage/monocyte에 의한

IL-1 분비량과 PBMC의 증식도에 미치는 영향을 Figure 16과 17에 각각 나타내었다.

Macrophage/monocyte에 의한 IL-1 분비량은 미역산물 2.0% 사료의 급여로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Figure 16). 주로 활성화된 단구 식세포(mononuclear phagocyte)에 의해서만 분비된다고 알려져 있는 IL-1은 NK cell의 활성화, T 임파구의 증식(Lichtman 등, 1988), Th 임파구의 IL-2분비(Kaye 등, 1984)를 증진시키는 등 동물의 타고난 면역을 조절하는 사이토카인으로 알려져 있다. 따라서 미역산물 2.0% 사료급여시 Macrophage/monocyte의 IL-1분비증가는 Macrophage/monocyte의 농도가 높다는 것을 나타낸다. 이것은 미역산물 2.0% 사료가 육계병아리의 타고난 면역을 조정하고 있다는 것을 나타낸다.

Figure 17은 4주령 육계병아리 혈액중 PBMC의 *in vitro* 증식도의 변화를 관찰한 것이다. PBMC의 증식도는 미역산물 2.0% 사료를 급여했을 때 기초사료에 비해 증식도가 약 1.5배 증가하였다($p < 0.05$). PBMC는 70~80%의 T 임파구, 15~20%의 B 임파구, 10% Macrophage/monocytes로 구성된다(Boyum, 1968). 증가된 PBMC의 증식도는 Macrophage/monocyte의 IL-1 분비증가에 따라 Concanavalin A의 자극시 더 많은 양의 IL-1을 대식세포가 분비함으로써 T 임파구등의 증식을 자극한 것이라 추정된다. Otterlei 등 (1991)은 인간 Monocyte를 *in vitro*상에서 미역유래 알긴산과 배양하면 IL-1의 분비를 높인다고 하였다. 조등 (1998)은 미역급여시 렛트의 비장세포의 증식이 증가한다고 하였다. 이러한 연구성적들은 포유류에서 얻어진 것이나 본 연구에서 가금을 이용한 실험성적들과 일치한다고 생각한다.

실험 2의 연구결과들을 종합하면 미역산물 2.0% 사료급여는 육계병아리의 TNF- α 농도를 감소시켜 급성기반응시 급성기반응 완화효과를 나타내었다. 또한 미역산물 2.0% 사료의 4주간 급여는 IL-1 분비와 PBMC의 증식을 증가시켰다. 따라서 미역산물 2.0% 사료는 육계병아리의 타고난 면역을 조정하고 있다는 것을 나타낸다.

본 연구의 실험 1과 실험2는 사료자원으로서의 미역산물의 가치를 면역조정능력으로 평가하였다. 동시에 생산성과 영양소 이용성에 미치는 영향도 평가하였다. 사료중 미역산물을 0.0, 1.0, 2.0 및 4.0% 함유한 사료를 급여하면 미역산물 2.0% 사료는 단백질 축적량과 사료효율을 높였으며, 급성기반응을 완화하고, IL-1의 분비와 PBMC증식을 증가시켜 타고난 면역을 조정하였다. 이것은 동물의 강건성을 높이는 기능성 사료원료로서 미역이 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

IV. 사사

본 연구를 수행하는데 학문적, 정신적으로 항상 큰 가르침을 주신 건국대학교 축산대학 고태송 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 본 연구는 2003~2004년도 농림부 농림기술관리센터(ARPC)의 연구비 지원으로 건국대학교와 서울대학교가 협동으로 수행하는 연구중 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

V. 참고 문헌

- Batova K. and K. Ganovski, 1982. Effect of Black Sea algae on chicken egg production and on chick embryo development. *Vet Med Nauki*. Vol. 19:99~105.
- Belford D. A., I. A. Hendry and C. R. Parish, 1993. Investigation of the ability of several naturally occurring and synthetic polyanions to bind to and potentiate the biological activity of acidic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*. Vol. 157:184~189.
- Beresford, N. A., R. W. Mayes, P. M. Colgrove, C. L. Barnett, L. Bryce, B. A. Dodd and C. S. Lamb, 2000. A comparative assessment of the potential use of alginates and dietary calcium manipulation as countermeasures to reduce the transfer of radiostontium to the milk of dairy animals. *J. Environ. Radioactivity*. Vol. 51: 321~334.
- Bocanegra A., A. Nieto, B. Blas and F. J. Sanchez-Muniz, 2003. Diets containing a high percentage of Niri or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food and chemical toxico*. Vol. 41:1473~1480.
- Boyum A, 1968. Isolation of leukocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, supplement 97, 31~50.
- Favorov, V. V., E. I. Vozhova, V. A. Denisenko and L. A. Elyakova, 1979. Study of the reaction catalysed by alginate lyase VI from the sea mollusc, *Littorina* sp. *Biochim Biophys Acta*. 569(2):259~66.
- Flick, D. A., and G. E. Gifford, 1984. Comparison of In vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor, *J. Immuno. Meth.* 68 : 167-175.
- Gaby, C., and I. Kushner, 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* Vol. 340:448~454.
- Gauldie, J., and H. Baumann, 1991. Cytokines and acute phase protein synthesis. In : *Cytokines and inflammation*. E. S. Kimball, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp. 275~305.
- Giroux J. L., S. Matou, A. Bros, J. Tapon-Breaudiere, D. Letourneur, and A. M. Fischer, 1998. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. *Eur J Cell Biol*. Vol. 77:352~359.
- Goni, I., L. Valdivieso and A. Garcia-Alonso, 2000. Nori seaweed consumption modifies glycemic response in healthy volunteers. *Nutr Res*. Vol. 20:1367~1375.

- Gudiel-Urbano M. and I. Goni, 2002. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori and Wakame as a source of dietary fibre. *Food chemistry*. Vol. 76:281~286
- Gurevich G. P., 1959. Experience with enriching of eggs with iodine by supplementing chicken feed with seaweeds and fish meal. *Vopr Pitan*. Vol. 18:66~70.
- Hallquist, N. A., and K. C. Klasing, 1994. Serotransferrin, ovotransferrin and metallothionein levels during an immune response in chickens. *Comp. Biochem. Physiol. B* Vol. 108:375~384.
- Humprey, B. D., E. A. Koutsos and K. C. Klasing, 1997. Requirement and priorities of the immune system for nutrients.
- Humprey, B. D. and K. C. Klasing, 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system, *World's poultry science journal*, Vol. 60.
- Inagaki, A. and T. Sakata, 2001. Fermentation of oligosaccharides and influences of fermentation products. In: McCleary, B. V., Prosky, L., *Advanced Dietary Fibre Technology*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Kaye, J., S. Gillis, S. B. Mizel, E. M. Shevach, T. R. Malek, C. A. Dinarello, L. B. Lachman, and C. A. Janeway Jr. 1984. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2, *J. Immunol*. Vol. 133:1339.
- Kaufmann S., G. Wolfram, F. Delange and W. A. Rambeck, 1998. Iodine supplementation of laying hen feed: a supplementary measure to eliminate iodine deficiency in humans?. *Z. Ernährungswiss*. 37(3):288~93.
- Klasing, K. C., D. E. Laurin, R. K. Peng and D. M. Fry, 1987. Immunologically mediated growth depression in chicks: Influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1, *Nutrition and immunology*, 1629-1637.
- Klasing, K. C., 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious disease, *Poul. Sci*. Vol. 77:1119~1125.
- Koh T. S., R. K. Peng and K. C. Klasing, 1996. Dietary copper level affects copper metabolism during lipopolysaccharide-induced immunological stress in chicks, *Poul. Sci*. Vol. 75:867~872.
- Korver, D. R., and K. C. Klasing, 1997. Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune response, *J. Nutr*. 2039~2046.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawrence M. B. and T. A. Springer, 1993. Neutrophils role on E-selectin. *Immunology*. Vol. 151:6338~6346.
- Lazarous D. F., M. Shou, J. A. Stiber, D. M. Dadhania, V. Thirumurti, E. Hodge, and E. F. Unger, 1997. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res*. Vol. 36:78~85.
- Lichtman, A. H., J. Chin, J. A. Schmidt, and A. K. Abbas, 1988. Role of interleukin-1 in the activation of T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9685~9699.

- Marquardt, R. R., 1983. A simple spectrometric method for the direct determination of uric acid in avian excreta, *Poult. Sci.* 62 : 2106~2108.
- Murata, M., K. Ishihara and H. Saito, 1999. Hepatic fatty acid oxidation enzyme activities are stimulated in rats fed the brown seaweed, *Undaria pinnatifida*(wakame). *J. Nutr.* 132:742~747.
- Otterlei, M., K., Ostggard, G. Skjaek-Break, O., Smidsrod, P. Soon-Shiong and T. Espevik, 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunother.* Vol 10:286~291.
- Strnad A., O. Herstad and S. Liaaen-Jensen, 1998. Fucoxanthin metabolites in egg yolks of laying hens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* Vol. 119(4):963~974.
- Pell, J. M. and R. Aston, 1995. Principles of immunomodulation, *Livestock production science*, Vol. 42:123~133.
- Pueyo, M. E., S. Danquy, F. Capron and G. Reach, 1993. *In vitro* activation of human macrophage by alginate polylysine microcapsules. *J. Biomater. Sci.* Vol. 5:197~203.
- Reen, D. V., D. H. Attaway and O. R. Zaborsky, 1993. Pages 181~196 in *Marine biotechnology*, Plenum press, New York, USA.
- Roitt, I. J. Brostoff, and D. Male, 2002. chapter 1 in *Immunology* fourth edition, Mosby press, USA.
- Son E. W., C. K. Cho, D. K. Rhee and S. Pyo, 2001. Inhibition of gamma-irradiation induced adhesion molecules and NO production by alginate in human endothelial cells. *Arch Pharm Res.* Vol. 24: 466~471.
- Soon-Shiong P., M. Otterlei and G. Skjaek-Braek, 1991. An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplant Proc.* Vol. 23:758~759.
- Xie H., L. Newberry, F. D. Clark, W. E. Huff, G. R. Huff, J. M. Balog, and N. C. Rath, 2002. Change in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and disease. *Avian disease*, 46 : 122-131.
- Zhi-Jun Y., 1997, A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. *J. Immunol. Methods* Vol. 26:39.
- 고태송A, 임진택, 박인경, 김재환, 2004. 급성기 반응중인 육계병아리의 생산성에 미치는 사료중 크릴밀의 영향. *한국동물자원 과학회지* Vol. 46:173~182.
- 고태송B, 김재환, 임진택, 박인경, 고만석, 최진혁, 2003. 사료중 크릴밀은 살모넬라 LPS로 면역반응을 일으킨 육계의 에너지 이용성을 증가시킨다. 2003 한국동물자원과학회 학술발표회 Proceeding 174.
- 김창혁, 이성기, 이규호, 2004. Xanthophylls과 해조 부산물 첨가 급여가 육계의 사양성적, 육색 및 항산화 특성에 미치는 영향, *한국식품과학회지* Vol. 24:128~134.

임진택, 김재환, 박인경, 고태송, 2003. 살모넬라 LPS를 주입한 육계병아리의 생산성과 질소밸런스 및 대사에너지 이용성에 미치는 사료중 크릴밀의 영향. 한국동물자원 과학회지 Vol. 45: 957~966.

정금주, 2001. 식품성분표(제 6 개정판), 농촌진흥청 농촌생활연구소, 상록사, 수원.

조성희, 양경미, 배복선, 임선아, 유리나, 1998. 다시마 섭취가 정상과 당뇨쥐의 비장세포 증식에 미치는 영향. 한국영양학회지 Vol. 31: 973~980.

Table 1. Composition (g/kg) of experimental diets (NRC, 1994).

Ingredients	Dietary seaweed levels (%)			
	0.0	1.0	2.0	4.0
Ground yellow corn (8.8 % Protein)	596	596	596	596
Soybean meal (48.5 % Protein)	305	305	305	305
DL-Methionine	2.5	2.5	2.5	2.5
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Wheat bran	50.0	40.0	30.0	10.0
Choline HCl (50 %)	1.5	1.5	1.5	1.5
(Iodized) Salt	5.0	5.0	5.0	5.0
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0	10.0
CaHPO ₄ 2H ₂ O	20.0	20.0	20.0	20.0
Vitamin mix ¹⁾	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineral mix ²⁾	2.5	2.5	2.5	2.5
brown seaweed	-	10.0	20.0	40.0
Energy (cal/g diet)	3681.2	3704.6	3648.1	3653.5
Crude protein (%/diet)	19.9	19.6	19.6	19.8
Total	1000g	1000g	1000g	1000g

1) Vitamin mix contain in kg diet Vitamin K 0.55 mg, Antioxidant 125 mg, Vitamin E 10 IU, Vitamin D₃ 400 IU, Vitamin A 1,500IU, Biotin 0.15 mg, Folacin 0.55 mg, Pyridoxine HCl 3 mg, Niacin 25mg, Calcium panthothen -ate 10 mg, Riboflavin 3.6 mg, Thiamin HCl 1.8 mg.

2) Mineral mix contain in kg diet MnSO₄ H₂O 170 mg. ZnSO₄ H₂O 110 mg, Ferric citrate 500 mg, CuSO₄ 5H₂O 16 mg, Na₂SeO₃ 0.2mg.

Table 2. Chemical composition of brown seaweed(*Undaria pinnatifida*) based on dry matter.

Ingredients		Contents in dry matters
Energy (kcal/g)	>	203
Protein (%)		20.0
Fat (%)		2.9
Moisture (%)		16.0
Water soluble fibre (%)		33.9
Water soluble fibre	Alginic acid	50%
	Fukoidan	
	Laminaran	20~50%

- Reference : 1. Food composition table (6th edition) from Korean National Rural Living Science institute, 2001
2. Tatiana N. Z., N. M. Shevchenko, I. B. Popivnich, V. V. Isakov, A. S. Scobun, E. V. Sundukova and L. A. Elyakova, 1999. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharide from brown seaweeds. Carbohydrate Research Vol. 322:32~39.

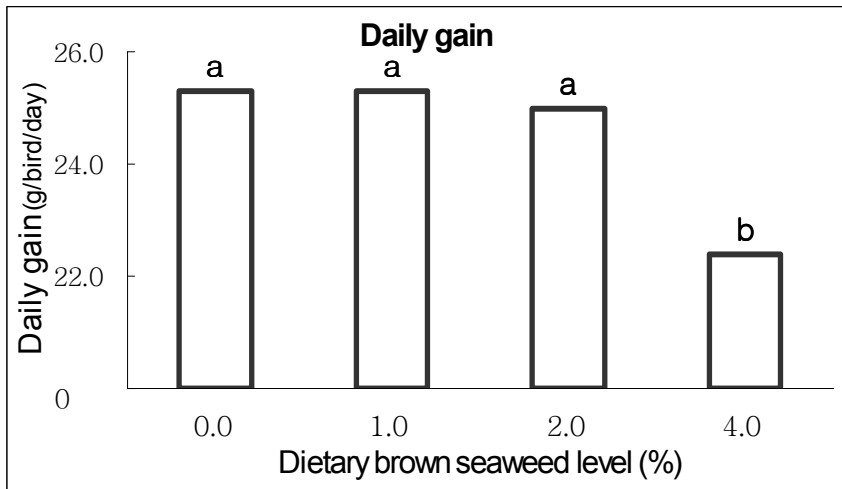


Figure 1. The effect of various brown seaweed levels on daily gain of broiler chicks at 2 weeks old. Values are Means of three replicates and means with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

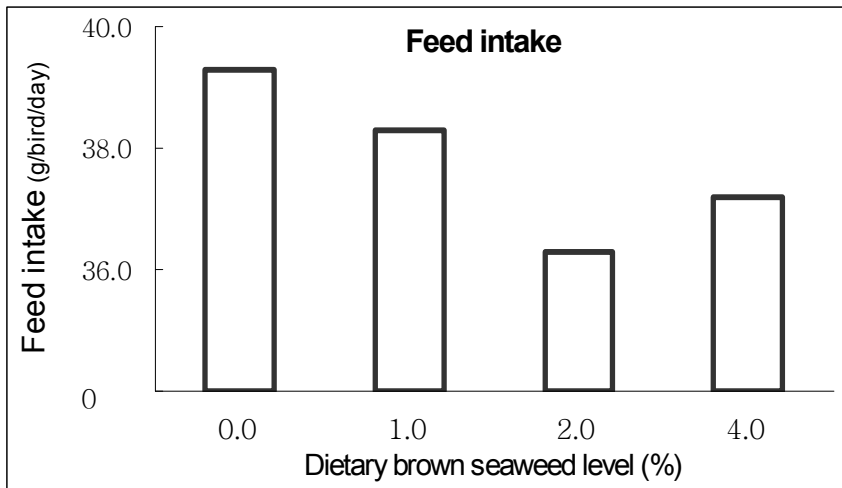


Figure 2. The effect of various brown seaweed levels on feed intake of broiler chicks at 2 weeks old.

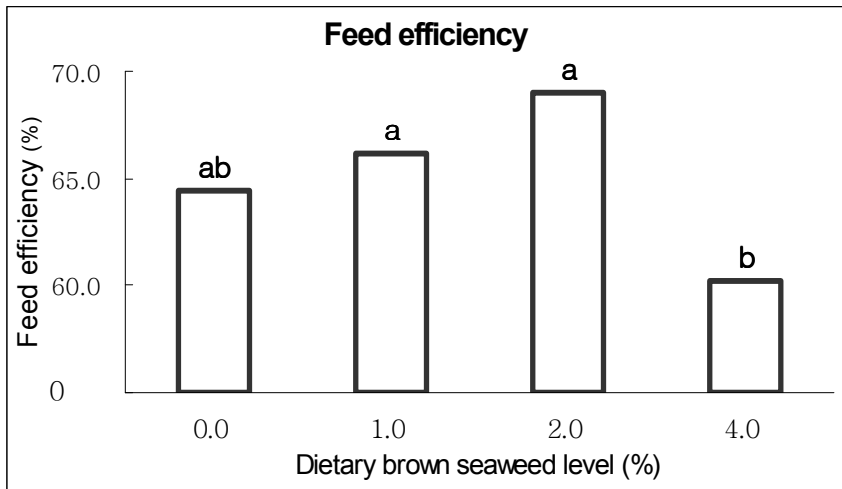


Figure 3. The effect of various brown seaweed levels on feed efficiency of broiler chicks at 2 weeks old. Values are Means of three replicates and means with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

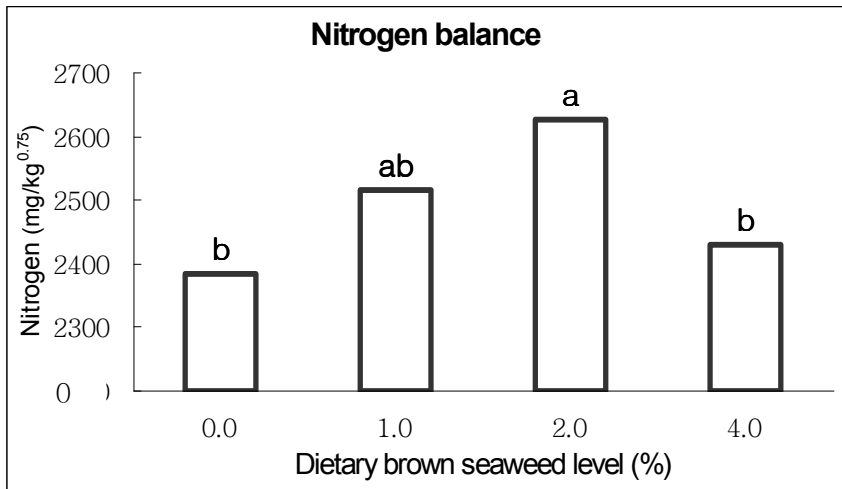


Figure 4. The effect of various brown seaweed levels on nitrogen balance of broiler chicks at 2 weeks. Values are Means of three replicates and means with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

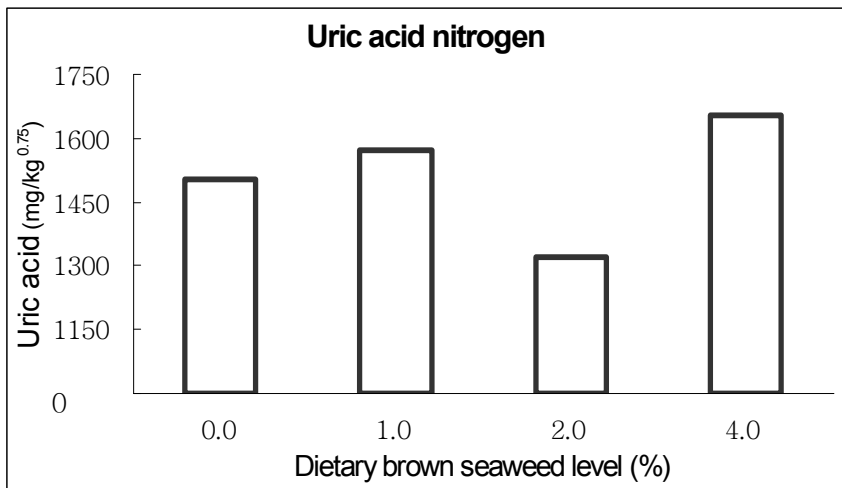


Figure 5. The effect of various brown seaweed levels on excretion of uric acid nitrogen (UAN) in broiler chicks at 2 weeks old.

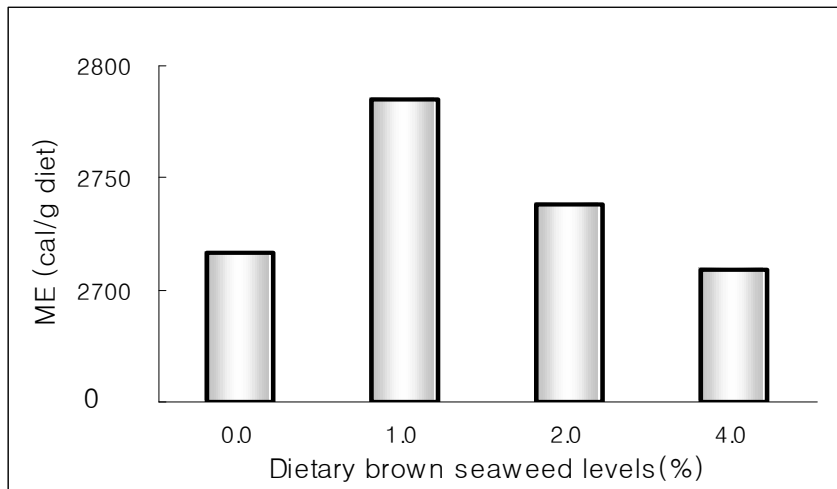


Figure 6. The effect of various brown seaweed levels on ME/g diet of broiler chicks at 2 weeks old.

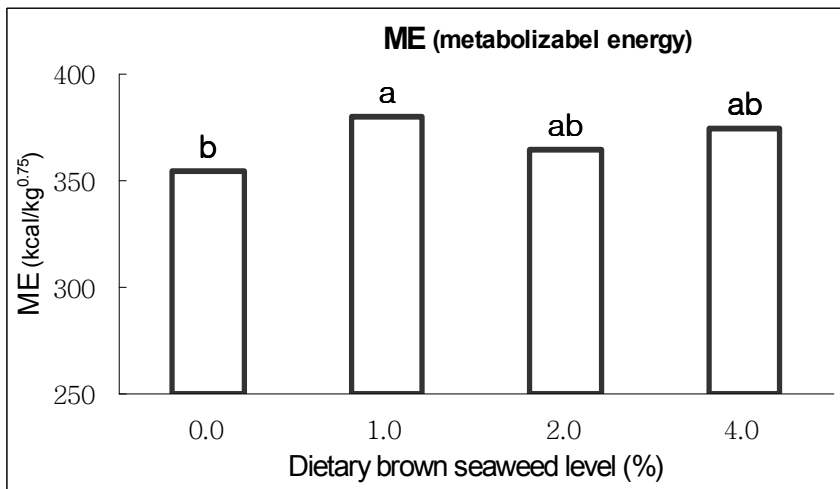


Figure 7. The effect of various brown seaweed levels on ME of broiler chicks at 2 weeks old.

Values are Means of three replicates and means with different superscript differ significantly at $p < 0.05$.

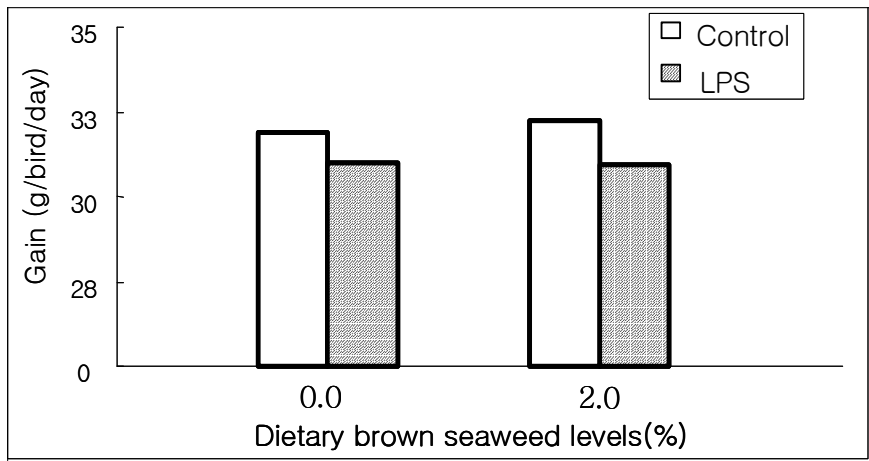


Figure 8. The effect of dietary brown seaweed on daily gain of broiler chicks during acute phase response.

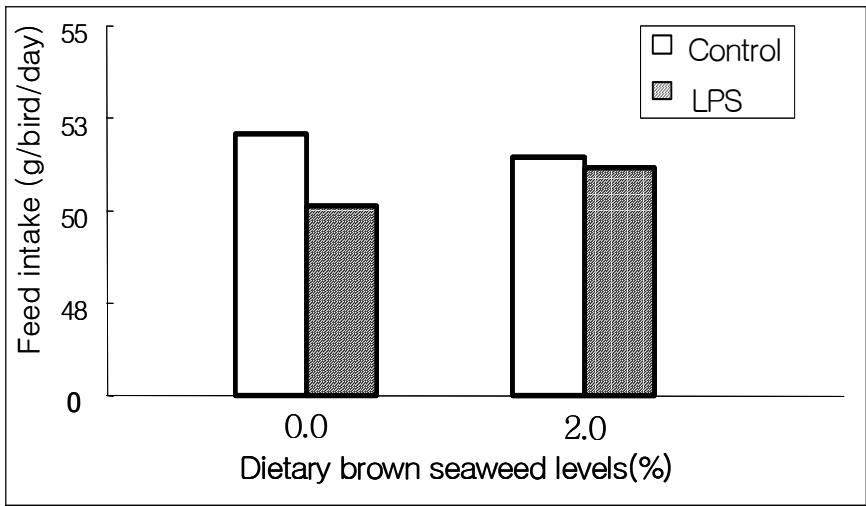


Figure 9. The effect of dietary brown seaweed on feed intake of broiler chicks during acute phase response.

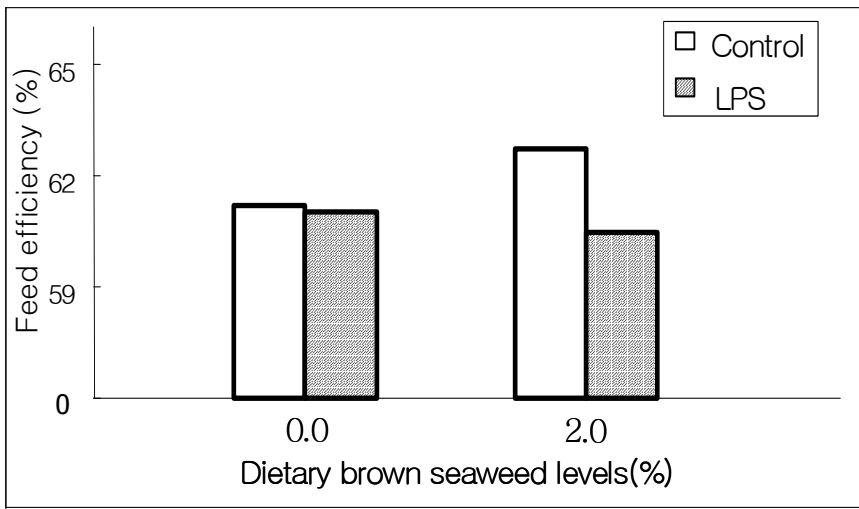


Figure 10. The effect of dietary brown seaweed on feed efficiency of broiler chicks during acute phase response.

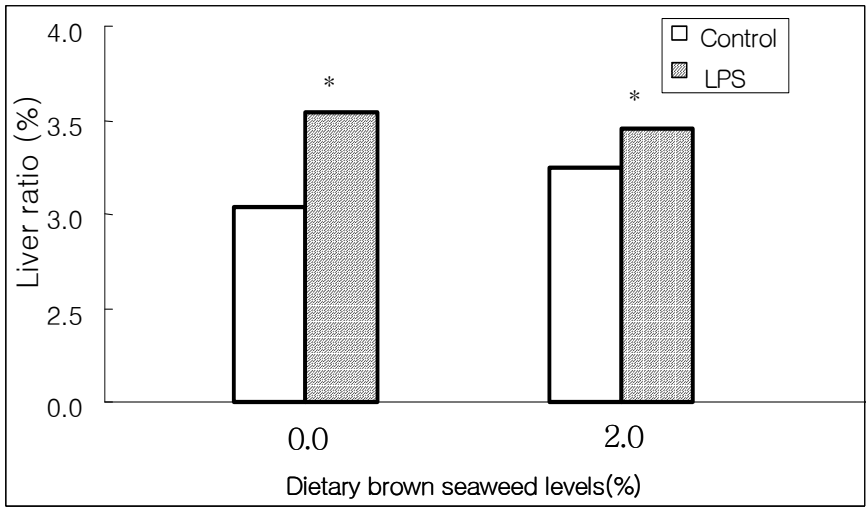


Figure 11. The effect of dietary brown seaweed on relative liver weight of broiler chicks during acute phase response.
 * represent significant difference between control and LPS at $p < 0.05$.

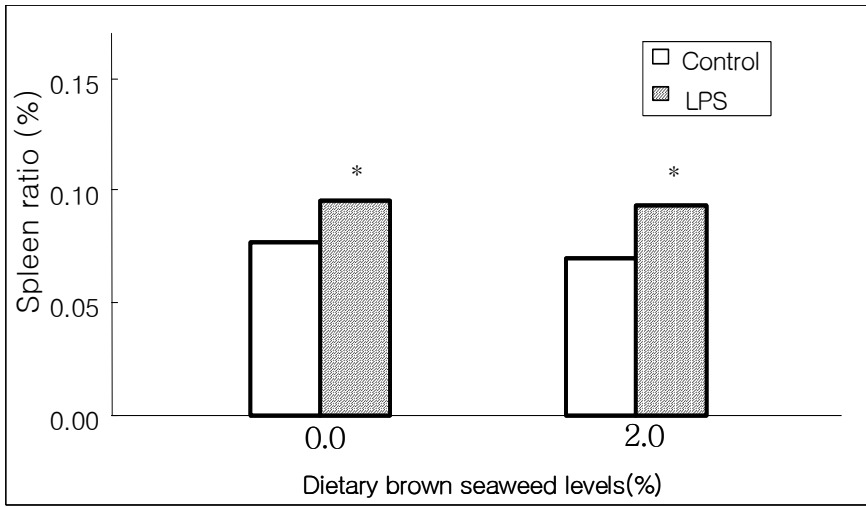


Figure 12. The effect of dietary brown seaweed on relative spleen weight of broiler chicks during acute phase response.
 * represent significant difference between control and LPS at $p < 0.05$.

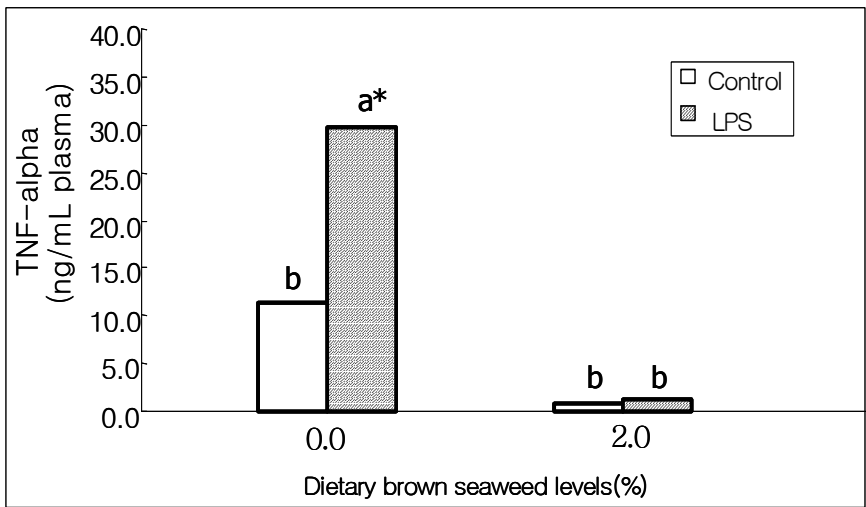


Figure 13. The effect of dietary brown seaweed on blood TNF- α level of broiler chicks during acute phase response.

Values are Means of three replicates, a~b represents significant difference between 0.0 and 2.0% at $p < 0.05$ and * represent significant difference between control and LPS at $p < 0.05$.

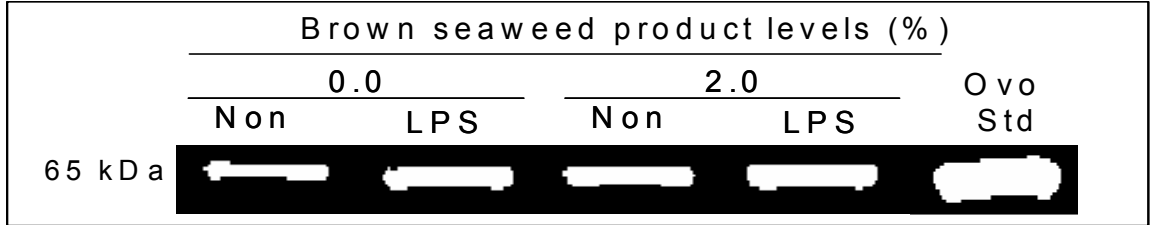


Figure 14. Identification of ovotransferrin with western blotting methods.



Figure 15. The effect of dietary brown seaweed on blood ovotransferrin level of broiler chicks during acute phase response.

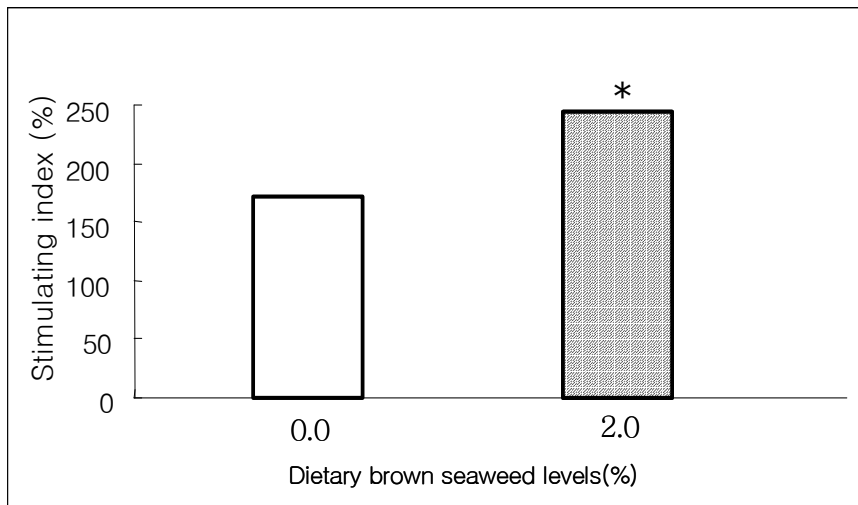


Figure 16. Effect of dietary brown seaweed on secretion of IL-1 from Macrophage/monocyte stimulated by the LPS in 4weeks old broiler chicks.
* represent significant difference between 0.0 and 2.0% at $p < 0.05$.

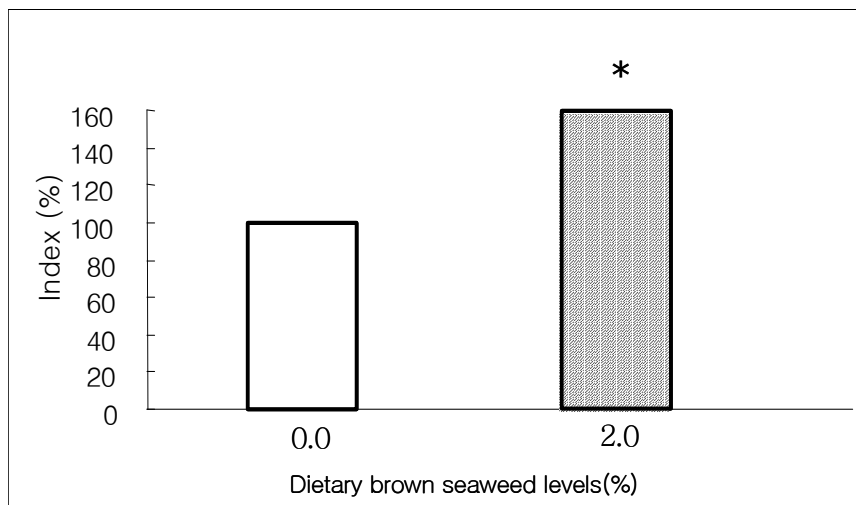


Figure 17. Effect of dietary brown seaweed on the proliferation of PBMC stimulated with concanavalin A in 4weeks old broiler chicks.

Values are Means of three replicates, and * represent significant difference between 0.0 and 2.0% at $p < 0.05$.