

육계에서 구멍갈파래의 항산화 및 면역조절 효과

홍준기^{1*} · 봉미희¹ · 박준철¹ · 문홍길¹ · 김동욱¹ · 이상철¹ · 이준현²

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²충남대학교 농업생명과학대학 동물자원생명과학과

Antioxidant and Immunomodulatory Effects of *Ulva pertusa kjellman* on Broiler Chickens

Joon Ki Hong^{1*}, Mi Hee Bong¹, Jun Cheol Park¹, Hong Kil Moon¹, Dong Wook Kim¹, Sang Cheul Lee¹ and Jun Heon Lee²

¹National Institute of Animal Science, R.D.A, Korea, ²Department of Animal Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to test the efficacy of *Ulva pertusa kjellman* as immunomodulators under lipopolysaccharide (LPS) challenge in broilers by investigating their effects on serum superoxide dismutase (SOD) like ability, immunoglobulin concentration, and splenic cytokine mRNA expression. A total of ninety six 1-d-old male broiler chicks (Ross 308) were divided into 4 treatment groups with 8 replicates of 3 birds in each group. NC (negative control, no immune substances), PC (positive control, β -glucan 25 ppm), *Ulva* P (*Ulva pertusa kjellman* Powder 3%), and *Ulva* E (Extract form *Ulva pertusa kjellman* 0.3%) were added in feed with respective substance. Heparinized venous blood and spleens were collected from five birds per dietary treatment at 5 wk of age. The SOD like activities in *Ulva* P and *Ulva* E were significantly increased in comparison with other groups ($P < 0.05$). The immunoglobulin M content was lower in the *Ulva* E than other groups ($P < 0.05$). Expression patterns of splenic cytokine mRNA in the IL-1 β , IL-2 and IL-6 were similar. Expression rate of IL-1 β , IL-2 and IL-6 in *Ulva pertusa kjellman* (*Ulva* P, *Ulva* E) were decreased ($P < 0.05$) in comparison to other groups. Expression rate of IL-1 β , IL-2 and IL-6 were significantly lower in groups treated with *Ulva* E than *Ulva* P. In conclusion, dietary supplementation of *Ulva pertusa kjellman* improved SOD like activity and affect immune system by inhibiting inflammatory response in broiler chicks. In addition, it is more effective to use *Ulva pertusa kjellman* extract than powder for immunomodulatory function. These results suggest the possibility that *Ulva pertusa kjellman* could be used as the immunomodulator for inflammatory response in broiler chicks.

(Key words : Chicken, *Ulva pertusa kjellman*, SOD, Immunoglobulin, Cytokine)

서 론

기후변화에 따라 제주 연안의 표면 수온이 1924년 이후 연평균 0.01°C 올라가 총 1.5°C 상승했으며, 2100년까지 우리나라 연근해 표층수온이 지금보다 3.04°C 상승할 것으로 예상된다(국립수산과학원, 2010). 지속적인 표층수온 상승으로 녹조현상(green tide)을 유발하는 구멍갈파래가 대량 증식하였으며 이로 인해 최근 제주지역의 환경생태학적 문제를 야기한 바 있다(환경부, 2008). 따라서 구멍갈파래 이상증식에 대한 대처방안을 강구하여 앞으로 지속적으로 야기될 환경문제를 해결하는 것이 매우 시급한 현실이다.

녹조식물 갈파래과에 속하는 구멍갈파래(*Ulva pertusa kjellman*)는 단독 또는 2~3가닥 뭉쳐서 나고 길이는 10 cm 그 이상에 달하며 제주도 연안 하부에 큰 군락을 이루며 계속 자라는 것으로 알려져 있다. 담수가 유입되는 지역에도 많이 생육하고 특히 겨울부터

늦봄까지 걸쳐 활발히 생육하며 여름에는 쇠퇴하여 해안선에 주로 부근에서 연중 생육한다. 다른 해조류와 마찬가지로 표면 전체를 통해 영양분을 흡수하여 수계에 비해 최대 수만 배까지 광물질을 농축하는 특징이 있다고 알려져 있다(Steinmetz와 Potter, 1991). 또한 다량의 미량성분이 함유되어 대사작용 개선에 관여하며, 식이 섬유에 의한 정장작용 효능이 입증되었다(Steinmetz와 Potter, 1991; Ray와 Lahye, 1995; Ayako 등, 1999). 갈파래의 주요특성의 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 함유한 다당을 다량 함유하고 있으며 이 산성 다당은 항 종양, 항 바이러스, 면역증강 및 혈액 항 응고 작용 등 다양한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다(Steinmetz와 Potter, 1991; Azuine 등, 1992; Yoo 등, 2001). 국내에서는 홑파래에서 추출한 당 단백질의 항암효과 및 면역활성이 연구 된 바가 있으나(Newmark, 1996) 구멍갈파래를 비롯한 해조류의 복합 산성 다당은 산이나 알칼리에 비교적 안정적이고 특

* Corresponding author : Joon Ki Hong, National Institute of Animal Science, R.D.A, Korea. Tel: 031-290-1619, Fax: 031-290-6719, E-mail: john8604@korea.kr

수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해되기 어려워 이용이 제한적인 것으로 알려져 왔다(Sugano 등, 1994). 최근 이러한 단점을 보완하기 위해 고압추출공정 방식 등 구멍갈파래의 산업적 이용도를 높이기 위한 연구가 수행되고 있다(Han 등, 2009).

이러한 선행 연구들을 통하여 구멍갈파래는 가축사료 자원으로서 충분한 가능성이 있는 것으로 사료되지만, 현재 국내에서 생산되는 구멍갈파래를 가축에 이용한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 구멍갈파래를 자원화시켜 환경문제를 해결하고 더 나아가 구멍갈파래 생리활성 효과를 가축에게 적용시키는 연구가 필요하다. 본 연구는 구멍갈파래가 새로운 가축사료 소재로서 향산화, 면역조절 효과가 있는지 확인하고자 실시하였으며, 이를 위해 LPS로 염증반응이 유도된 육계에서 혈액 superoxide dismutase (SOD) 유사 활성, immunoglobulin 농도 및 비장 조직 내 cytokine mRNA 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 구멍갈파래 영양가치 분석

(1) 일반성분 및 아미노산 조성

구멍갈파래 시료는 제주도 앞바다 주변에 서식하는 것을 채취하고 수 회 세척하여 소금성분을 최대한 제거한 후 건조·분쇄하여 사용하였다. 일반성분은 AOAC 방법(1995)을 기초로 하여 분석하였다(Table 1). 수분 함량은 105℃ 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조섬유 함량은 H₂SO₄-NaOH 분해법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 아미노산 함량은 6 N HCl로 110℃에서 16시간 동안 가수분해시킨 후(Mason, 1984), 아미노산 분석기(HITACHI L-8500A, Japan)를 이용하여 분석하였다.

(2) 진정대사에너지(Ture metabolizable energy; TME) 및 진정아미노산이용률(True amino acid availability; TAAA)

에너지 및 아미노산 이용률을 측정하기 위해 Sibbald(1976)가 고안한 강제급여(force-feeding) 방법을 사용하여 실시하였다. Ross중 6주령 육계 5수를 시판사료로 사육하고 강제급여를 시작하기 직전에 24시간 동안 절식 시켰다. 그 후 구멍갈파래 원료를 각각 10g씩 강제 급여시킨 후 24시간 동안 배설된 모든 배설물을 채취하였다. 또한 기초대사량 측정을 위하여 절식구를 배치하였다. 채취된 모든 배설물은 깃털과 이물질 등을 제거한 후 상온에서 48시간 동안 건조시키고 분쇄하여 분석에 이용하였다. 사료와 분뇨의 총 에너지(gross energy, GE) 함량은 bomb calorimeter(Parr 6200 Instrument, US)를 사용하여 측정하였다. TME는 절식과 사료급여 시험축에서 채취한 분뇨 배설물을 이용하여 다음 공식으로 산출되었으며, 1.74 kcal/g 이었다.

Table 1. Chemical and amino acid compositions of *Ulva pertusa kjellman*

| Item | <i>Ulva pertusa kjellman</i> |
|------------------------|------------------------------|
| Chemical composition | % |
| Moisture | 20.53 |
| Crude protein | 20.40 |
| Crude fat | 0.71 |
| Crude fiber | 7.46 |
| Crude ash | 14.68 |
| Amino acid composition | |
| Cysteine | 0.40 |
| Methionine | 0.36 |
| Aspartic acid | 2.39 |
| Threonine | 1.08 |
| Serine | 1.28 |
| Glutamic acid | 1.90 |
| Glycine | 1.22 |
| Alanine | 1.85 |
| Valine | 1.01 |
| Isoleucine | 0.71 |
| Leucine | 1.24 |
| Tyrosine | 0.53 |
| Phenylalanine | 1.25 |
| Lysine | 0.93 |
| Histidine | 0.24 |
| Arginine | 0.93 |
| Proline | 0.75 |

$$TME(kcal/g) = \{(A \times B) - (C - D)\} / A$$

A = 시험사료 급여량(g)

B = 시험사료의 GE(kcal/g)

C = 사료급여 시험축의 배설 GE(kcal/g)

D = 절식 시험축의 배설 GE(kcal/g)

TAAA는 Sibbald(1976)가 제시한 TME 측정 방법과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다(Table 2).

2. 실험설계

(1) 구멍갈파래 제형화

구멍갈파래 분말은 세척을 통해 소금성분을 제거한 후 건조하고 곱게 분쇄하여 제조하였으며, 구멍갈파래 추출물은 세척된 시료를 5기압 120℃의 조건으로 6시간 추출하여 제조하였다.

Table 2. True amino acid availability of *Ulva pertusa kjellman* in Broiler chickens

| Amino acid | Availability | |
|---------------|--------------------|--|
| | (Dry matter basis) | |
| | % | |
| Cysteine | 60.8 | |
| Methionine | 73.2 | |
| Aspartic acid | 79.6 | |
| Threonine | 75.7 | |
| Serine | 75.5 | |
| Glutamic acid | 80.3 | |
| Glycine | 65.7 | |
| Alanine | 78.7 | |
| Valine | 75.6 | |
| Isoleucine | 67.9 | |
| Leucine | 79.4 | |
| Tyrosine | 78.6 | |
| Phenylalanine | 78.5 | |
| Lysine | 72.0 | |
| Histidine | 16.8 | |
| Arginine | 79.9 | |
| Proline | 82.3 | |
| Mean | 71.8 | |

(2) 공시축 및 사양관리

공시계로는 1일령 Ross종 육계수컷 96수를 선별하여, 육계전기(0~3주), 육계후기(3~5주)의 5주 동안 사양시험을 실시하였다. 처리당 24수(3수×8반복)씩 4처리구에 총 96수를 임의배치하여 실시하였다. 시험구 배치는 무첨가구(Negative Control; NC), 시판면역증강제 첨가구(Positive Control; PC, β-glucan 25 ppm), 구멍갈파래 분말 3% 첨가구(*Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva P*) 및 구멍갈파래 추출물 0.3% 첨가구(*Ulva pertusa kjellman* Extract; *Ulva E*)로 배치하였다. 실험사료는 한국사양표준(가금, 2007)에서 제시한 옥수수-대두박 위주의 기초 사료로 구멍갈파래의 TME를 고려하여 전기(CP 21%, ME 3,100 kcal/kg)와 후기(CP 19%, ME 3,150 kcal/kg)로 나누어 동일한 수준으로 급여하였다(Table 3, 4). 물을 니플급수에 의해 자유로이 음수할 수 있도록 하였다.

(3) Lipopolysaccharide (LPS) 처리 및 시료채취

5주간의 사양기간이 종료된 후 염증반응을 유도하기 위해 LPS (*Excherichia coli*; SIGMA L2630)를 처리당 5수를 선별하여 개체당 1 mg/ml 복강 주사하였다. 혈액은 LPS 주사 전과 후 2회(0, 2 h)에 걸쳐 익하정맥에서 채취하고, 원심분리(2,000 rpm×10 min)를 통해 혈청을 분리하여 분석에 이용하였다. 비장조직은 LPS

Table 3. Formula and chemical compositions of experimental diets in starter period* (0~3 weeks)

| | NC | PC | <i>Ulva P</i> | <i>Ulva E</i> |
|---------------------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| Ingredients, % | | | | |
| Corn | 49.25 | 49.25 | 49.45 | 49.40 |
| Soybean Meal | 31.00 | 31.00 | 28.60 | 31.00 |
| Corn Gluten Meal | 8.20 | 8.20 | 9.60 | 8.50 |
| Wheat bran | 3.50 | 3.49 | 1.30 | 2.95 |
| Soybean oil | 3.70 | 3.70 | 3.70 | 3.50 |
| Limestone | 1.30 | 1.30 | 1.30 | 1.30 |
| Tricalcium phosphate | 1.70 | 1.70 | 1.70 | 1.70 |
| Salt | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| DL-Methionine | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| Lysin-HCl | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Vitamin-mineral mixture ¹⁾ | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Calculated value | | | | |
| ME, kcal/kg | 3,051 | 3,051 | 3,051 | 3,051 |
| Crude Protein, % | 23.02 | 23.02 | 23.01 | 23.25 |
| Methionine, % | 0.56 | 0.56 | 0.56 | 0.56 |
| Lysine, % | 1.20 | 1.20 | 1.13 | 1.20 |
| Ca, % | 1.01 | 1.01 | 1.07 | 1.02 |
| Available P, % | 0.45 | 0.45 | 0.44 | 0.45 |

¹⁾ Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D3, 1,500IU; vitamin E, 20.0 mg; vitamin K3, 0.70 mg; vitamin B12, 0.02 mg; niacin, 22.5 mg; thiamin, 5.0 mg; folic acid, 0.70 mg; pyridoxin, 1.3 mg; riboflavin, 5 mg; pantothenic acid, 25 mg; choline chloride, 175 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; I, 1.25 mg; Cu, 10.0 mg; Fe, 72 mg; Co, 2.5 mg.

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

Table 4. Formula and chemical compositions of experimental diets in finisher period* (3~5 weeks)

| | NC | PC | <i>Ulva</i> P | <i>Ulva</i> E |
|---------------------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| Ingredients, % | | | | |
| Corn | 59.15 | 59.14 | 59.70 | 59.05 |
| Soybean Meal | 21.00 | 21.00 | 20.80 | 20.80 |
| Corn Gluten Meal | 8.00 | 8.00 | 8.35 | 8.00 |
| Wheat bran | 4.00 | 4.00 | 0.30 | 4.00 |
| Soybean oil | 3.50 | 3.50 | 3.50 | 3.50 |
| Limestone | 1.30 | 1.30 | 1.30 | 1.30 |
| Tricalcium phosphate | 1.70 | 1.70 | 1.70 | 1.70 |
| Salt | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| DL-Methionine | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| Lysin-HCl | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Vitamin-mineral mixture ¹⁾ | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Calculated value | | | | |
| ME, kcal/kg | 3,150 | 3,150 | 3,150 | 3,150 |
| Crude Protein, % | 19.32 | 19.32 | 19.45 | 19.33 |
| Methionine, % | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 |
| Lysine, % | 0.94 | 0.94 | 0.92 | 0.94 |
| Ca, % | 0.98 | 0.98 | 1.05 | 0.99 |
| Available P, % | 0.43 | 0.43 | 0.42 | 0.43 |

¹⁾ Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D3, 1,500IU; vitamin E, 20.0 mg; vitamin K3, 0.70 mg; vitamin B12, 0.02 mg; niacin, 22.5 mg; thiamin, 5.0 mg; folic acid, 0.70 mg; pyridoxin, 1.3 mg; riboflavin, 5 mg; pantothenic acid, 25 mg; choline chloride, 175 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; I, 1.25 mg; Cu, 10.0 mg; Fe, 72 mg; Co, 2.5 mg.

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva* P, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva* E, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

주사 후(2 h)에 채취하여 diethyl pyrocarbonate (DEPC, 티엔티 리서치 1004W-500) 처리한 생리식염수로 세척하고 액체질소를 이용하여 급속 냉동시켜 분석에 이용하기 전까지 -76℃에서 보관하였다.

비색계를 이용하여 420 nm의 흡광도를 측정하였고(At), 동일한 실험방법으로 Tris-HCl buffer와 pyrogallol만 첨가한 후 측정된 흡광도(Ac)와 Tris-HCl buffer와 혈장만 첨가한 후 측정된 흡광도(Ao)를 이용하여 SOD like activity를 구하였다.

3. 조사항목

(1) 육계 생산성

매주 동일한 시간에 체중을 측정하여 증체량을 구하였다. 사료는 매일 급여량과 잔량을 조사하였으며, 매주 급여된 사료와 사료 잔량의 수분을 측정하여 보정 계산한 후 사료섭취량을 구하였다. 조사된 사료섭취량과 증체량을 통해 사료요구율을 산출하였다.

(2) 혈액 내 항산화 활성

혈액 내 항산화도는 Stefan과 Gudrun(1974)의 방법을 응용하여 superoxide dismutase(SOD) like activity를 구하였다. 먼저 유리 시험관에 pH 8.5의 Tris-HCl buffer 1.5 ml과 준비된 혈장을 0.1 ml 첨가하고, 5 mM의 pyrogallol을 0.1 ml을 첨가한 후, 25℃에서 30분간 배양하였다. 1N의 HCl 0.1 ml로 반응을 정지시킨 후,

$$\text{SOD-like activity (\%)} = [1 - \{ (At - Ao) / Ac \}] \times 100$$

(3) 혈액 내 immunoglobulin 함량

혈액 내 immunoglobulin 함량은 chicken IgA, IgG, IgM kit (Bethyl Laboratories, Inc. USA)를 사용하여 측정하였다. Goat anti-chicken IgA IgG, IgM을 coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate)에 1:100 비율로 희석한 후, 96 well microplate에 100 µL씩 넣고 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, 96 well microplate 각 well의 coating buffer를 제거하고 washing solution (50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% tween 20)으로 3회 세척하였다. 이어서 blocking solution (50 mM tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA)을 넣고 37℃에서 30분간 반응시키고 washing solution으로 3회 세척하였다. Sample diluent solution (50 mM tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, 0.05% tween 20)으로 희석된 혈

청을 각 well에 100 µL씩 넣고 60분간 37°C에서 반응시킨 다음 5회 세척하고 HRP conjugate 100 µL를 넣고 반응(37°C, 60분)시켰다. 이를 다시 5회 세척한 후, enzyme substrate (TMB peroxidase substrate, peroxidase solution B)를 100 µL씩 넣고 반응시켰다. 5~30분간 반응에 따른 색 변화를 관찰하여 색이 고정되면 2 M H₂SO₄를 넣고 반응을 정지시킨 후, microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad Laboratories, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 작성된 표준곡선을 이용하여 IgA, IgG, IgM의 함량을 산출하였다.

(4) 비장 내 cytokine mRNA 발현

LPS 주입 후 채취된 비장은 Chomczynski와 Sacchi (1987)의

acid/guanidium/phenol/chloroform법 (TRizol[®] reagent, Invitrogen[™], USA)을 사용하여 비장 조직으로부터 total RNA를 추출하였으며, 추출한 total RNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRon, Korea)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)로 합성하였다. 위 과정을 통해 얻어진 cDNA로 Accupower[®] HotStart PCR-PreMix (Bioneer, Korea)를 사용하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 1β (IL-1β), interleukin-2 (IL-2) 및 interleukin-6 (IL-6) mRNA에 대한 primer와 β-actin mRNA에 대한 primer를 사용하여 Touch down PCR을 통해 DNA를 증폭하고 1.7% agarose gel (Takara, Japan)에서 전기영동을 수행하였다. β-actin, iNOS, IL-1β, IL-2 및 IL-6의 primer sequence와 PCR 조건은 Table 5에 나타내었다. DNA marker와 전기영동 후 DNA band

Table 5. Primers for the expression analysis of cytokines. β-actin expression was used as an expression control

| Gene* | Primer sequence (5' → 3') | PCR conditions | | Cycle | Size |
|---------|--------------------------------|----------------|-----------|-------|-------|
| | | Temp, °C | Time, min | | |
| β-actin | (Forward) | 94 | 5:00 | 30 | 248bp |
| | CCCCCGTGCTGTGTTCCCATCTATCG | 94 | 0:30 | | |
| | (Reverse) | 64 | 0:45 | | |
| | GGGTGCTCCTCAGGGGCTACTCTCAG | 72 | 30:00 | | |
| | | 72 | 7:00 | | |
| | | 4 | ∞ | | |
| iNOS | (Forward) | 94 | 5:00 | 32 | 230bp |
| | TGATCTTTGCTGCCAAACAG | 94 | 0:30 | | |
| | (Reverse) | 64 | 0:45 | | |
| | GCTGTTCCAAACACGGAAAT | 72 | 30:00 | | |
| | | 72 | 7:00 | | |
| | | 4 | ∞ | | |
| IL-1β | (Forward) | 94 | 5:00 | 30 | 795bp |
| | ATGGCGTTCGTTCCCGACCTGGACGTGCTG | 94 | 0:30 | | |
| | (Reverse) | 64 | 0:45 | | |
| | ACTTAGCTGTAGGTGGCGATGTTGACCTG | 72 | 30:00 | | |
| | | 72 | 7:00 | | |
| | | 4 | ∞ | | |
| IL-2 | (Forward) | 94 | 5:00 | 31 | 233bp |
| | GGGTCTAAATCACACCGGAAG | 94 | 0:30 | | |
| | (Reverse) | 64 | 0:45 | | |
| | GAGCATAACAGTGGTCCAGAA | 72 | 30:00 | | |
| | | 72 | 7:00 | | |
| | | 4 | ∞ | | |
| IL-6 | (Forward) | 94 | 5:00 | 30 | 164bp |
| | CTCCTCGCCAATCTGAAGTC | 94 | 0:30 | | |
| | (Reverse) | 64 | 0:45 | | |
| | GGATTGTGCCCGAACTAAAA | 72 | 30:00 | | |
| | | 72 | 7:00 | | |
| | | 4 | ∞ | | |

* iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL, interleukin.

를 비교하여 target gene임을 확인한 후, image analyzer (Bio-capt ver. 99.4, Vilber Loumat, France)를 사용하여 β -actin의 DNA band의 OD(optical density) 값과 iNOS, IL-1 β , IL-2 및 IL-6의 OD 값을 측정하였으며, β -actin의 DNA band의 OD 값으로 각각의 iNOS, IL-1 β , IL-2 및 IL-6 OD 값을 나누어 상대적 비율을 구하여 비교 분석하였다.

4. 통계처리

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS Institute, 2008)의 General Linear Model (GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 육계 생산성

구멍갈파래 급여가 육계 생산성에 미치는 영향은 Table 6에 나타내었다. 증체량에서 구멍갈파래 추출물 첨가구가 다른 처리구에 비해 다소 높게 나타났지만 유의적인 차이가 없었다. 또한 구멍갈파래 추출물 첨가구는 구멍갈파래 분말 첨가구보다 증체량이 유의적으로 높았으며 (P<0.05), 사료섭취량에서는 구멍갈파래 추출물이 3,893 g으로 무첨가구 3,726 g 보다 유의적으로 높았다(P<0.05). 구멍갈파래 분말 첨가구는 유의적인 차이는 없지만 다른 처리구에 비해 수치상 대체로 낮은 생산성을 나타내었다. 본 실험 결과 구멍갈파래는 전반적으로 육계 생산성에 부정적인 영향은 없는 것으로

나타났다. 하지만 생산성 지표를 확인 하기 위한 처리구별 수수가 적었기 때문에 구멍갈파래가 육계 생산성에 미치는 영향과 최적 첨가수준에 대해서는 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.

2. 혈액 내 항산화 활성

항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 세포에 유해한 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 분해됨으로써, 결론적으로 SOD는 유해산소로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Pryor WA, 1986). Phytochemicals에 속하며 superoxide의 반응성을 억제하는 SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 한다.

구멍갈파래가 혈중 항산화 활성에 미치는 영향은 Table 7에 나타내었다. 혈액 내 SOD 유사 활성을 분석한 결과 구멍갈파래 첨가구 (*Ulva P*, *Ulva E*)는 무첨가구와 면역제제 첨가구보다 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났으며 (P<0.05), 구멍갈파래 분말과 추출물 첨가구간의 항산화 활성은 유의적인 차이가 없었다. 위와 같은 결과는 구멍갈파래 내 tocopherol 같은 다량의 항산화 물질이 함유되어 있어 (Ortiz 등, 2005), 육계 혈액 내 항산화 활성을 증대시킨 것으로 사료된다. Kim 등 (2006)은 DPPH 방법에 의해 항산화 활성을 조사한 결과 산성 다당을 함유한 구멍갈파래 추출물의 농도가 높아질 수록 농도 의존적으로 자유 라디칼 소거능이 증가한다고 보고하였다. Hanaa 등 (2009)도 갈파래에서 추출한 산성 다당은 높은 항산화 활성을 가진다고 보고한 바 있다. 또한 구멍갈파래 추출물을 쥐에게 급여할 시 독성물질로부터 간세포를 보호하는 항산화 효소의 활성을 높인다고 보고된 바 있다 (Nam 등,

Table 6. Effects of dietary *Ulva pertusa* on growth performance in broiler chickens*

| Item | NC | PC | <i>Ulva P</i> | <i>Ulva E</i> | SEM |
|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Initial BW, g/bird | 44.7 | 44.6 | 44.6 | 44.6 | 0.02 |
| Final BW, g/bird | 2203 ^{ab} | 2180 ^{ab} | 2067 ^b | 2302 ^a | 27.70 |
| BW gain, g/bird | 2248 ^{ab} | 2224 ^{ab} | 2112 ^b | 2346 ^a | 28.11 |
| Feed intake, g/bird | 3726 ^b | 3699 ^b | 3586 ^b | 3893 ^a | 32.23 |
| Feed/gain | 1.66 | 1.66 | 1.71 | 1.66 | 0.01 |

^{a,b} Means with the different superscripts differ significantly (P<0.05).

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

Table 7. Effects of dietary *Ulva pertusa* on antioxidation of serum in broiler chickens*

| Item | NC | PC | <i>Ulva P</i> | <i>Ulva E</i> | SEM |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|
| SOD like activity, % | 26.06 ^b | 23.12 ^b | 30.73 ^a | 33.46 ^a | 1.19 |

^{a,b} Means with the different superscripts differ significantly (P<0.05).

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

2006). 따라서 항산화 활성을 가지는 구멍갈파래는 쥐뿐만 아니라 육계 생체 내에서도 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

3. LPS 접종에 대한 혈액 내 immunoglobulin 변화

가금류에서 공인된 immunoglobulin의 종류는 immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM)의 3가지로 명명되고 있으며, 이들은 포유동물과 생물학적 특성이 유사한 것으로 보고되었다(Higgings, 1975).

본 실험에서 먼저 LPS 처리 효과를 확인하기 위해 공시동물의 immunoglobulin 변화를 Table 8에 나타내었다. LPS 접종 전과 후를 비교해보면, 접종 후 전체집단의 IgM과 IgG의 농도가 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있다(P<0.05). IgM은 외부로부터 침입된 모든 항원에 대한 일차적 면역반응 성분이며 (Szen-berg 등, 1965), IgG는 세포외부에서 toxin과 virus를 중화시키는 생물학적 기능을 가진다(Fellenberg, 1978). IgA는 horse spleen ferritin과 streptococcal antigen에 대하여 항체능력을 가진다고 보고된 바는 있으나 병원성 항원에 대한 임상적 가치에 대해서는 명확하게 규명되지 못한 실정이다(Higgings, 1975). 따라서 LPS 주입으로 IgM과 IgG의 변화를 일으켜 체액성 면역자극을 유도할 수 있었다.

Table 9은 LPS 접종 후(2 h) 처리구별 immunoglobulin 농도를 나타내었다. IgA와 IgG 농도는 처리구간의 차이가 나타나지 않았지만 IgM 농도에서 구멍갈파래 추출물 처리구가 무첨가구에 비해 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다(P<0.05). IgM은 다른 immunoglobulin 보다 특화된 급성반응을 나타내며(Koenen 등, 2002), 항체에 대한 indirect haemagglutination test에서 가장 활성화된 immunoglobulin이다(Dreesman 등, 1965). Table 9의 결과는 구멍갈파래 추출물이 LPS 자극으로 인한 IgM의 농도 변화를 억제하고 구멍갈파래 분말 형태는 억제 효과가 부족하다는 것을 시

사한다. 구멍갈파래를 비롯한 해조류의 복합 산성 다당은 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해되기 어렵기 때문에 (Sugano 등, 1994), 분말보다 가압열수로 추출한 형태가 산성다당의 효과를 높일 수 있는 것으로 사료된다. Kim 등(2006)은 구멍갈파래 항균 및 항산화 효과 구명을 위해 다양한 추출방법을 시도하였으며, Han 등(2009)은 구멍갈파래를 고압열수로 추출하는 방식이 면역작용, 항암 등에 효과가 있다고 하였다.

4. 비장 내 cytokine mRNA 발현

LPS와 Monocyte, macrophage 세포의 상호작용 결과 IL-1 β , IL-6 및 IL-8과 같은 친염증성 싸이토카인(proinflammatory cytokine)들의 분비가 일어난다(Rietschel 등, 1998). 가금에서 LPS 주입은 감염부위의 대식세포와 헤테로필(heterophil) 등 면역세포들을 활성화하고 IL-1 β , IL-6, 또는 TNF- α 등 친염증성 싸이토카인들을 분비하며, 이들은 사료섭취와 활성성을 감소시키고(Leshchinsky와 Klasing, 2001; Klasing, 1994), 간장에서 오보트렌스페린(ovotransferrin) 등 급성기 단백질을 합성하여 분비하는 신호로 작용한다(Xie 등, 2000).

본 시험에서 LPS 처리 후 비장 조직 내 cytokine의 mRNA 발현양상은 Fig. 1에 나타내었으며, OD값 측정 후 house keeping gene인 β -actin에 대한 상대적 비율을 Table 10에 나타내었다. IL-1 β , IL-2 및 IL-6에서 처리구별 공통적인 차이를 나타내었는데 구멍갈파래 처리구(*Ulva P*, *Ulva E*)의 mRNA 발현 비율이 무첨가구와 면역제제 처리구에 비해 낮았으며, 구멍갈파래 처리 간 비교에서 구멍갈파래 추출물이 분말보다 더 낮았다(P<0.05). iNOS의 경우 구멍갈파래 분말 첨가구는 무첨가구와 유의적인 차이가 없었지만 구멍갈파래 추출물 첨가구는 모든 처리구보다 iNOS의 발

Table 8. Serum immunoglobulin level of broiler chicks during 2 h after challenge with LPS at 5 weeks of age*

| Item | Before (0 h) | After (2 h) | SEM |
|------------|-------------------|-------------------|------|
| IgA, mg/ml | 0.39 | 0.42 | 0.03 |
| IgG, mg/ml | 1.33 ^b | 2.10 ^a | 0.15 |
| IgM, mg/ml | 0.35 ^b | 0.75 ^a | 0.04 |

^{a,b} Means with the different superscripts differ significantly (P<0.05).

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

Table 9. Effects of dietary *Ulva pertusa* on immunoglobulin level of serum in broiler chicks after challenge with LPS at 5 weeks of age*

| | NC | PC | <i>Ulva P</i> | <i>Ulva E</i> | SEM |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------|
| IgA, mg/ml | 0.48 | 0.42 | 0.41 | 0.35 | 0.04 |
| IgG, mg/ml | 2.81 | 1.63 | 1.64 | 2.31 | 0.23 |
| IgM, mg/ml | 0.87 ^a | 0.75 ^{ab} | 0.75 ^{ab} | 0.63 ^b | 0.04 |

^{a,b} Means with the different superscripts differ significantly (P<0.05).

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

Table 10. Effects of dietary *Ulva pertusa* on on spleen cytokines mRNA expression in broiler chickens after challenge with LPS at 5 weeks of age*

| | NC | PC | <i>Ulva P</i> | <i>Ulva E</i> | SEM |
|-------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|------|
| Cytokine/ β actin ratio | | | | | |
| iNOS** | 100 ^{ab} | 103 ^a | 97 ^b | 92 ^c | 1.22 |
| IL-1 β | 100 ^a | 98 ^a | 58 ^b | 34 ^c | 6.57 |
| IL-2 | 100 ^a | 96 ^a | 52 ^b | 38 ^c | 7.16 |
| IL-6 | 100 ^a | 86 ^a | 35 ^b | 19 ^c | 8.20 |

^{a,b} Means with the different superscripts differ significantly (P<0.05).

* NC, Negative Control; PC, Positive Control; *Ulva P*, *Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva E*, *Ulva pertusa kjellman* Extract.

** iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL, interleukin.

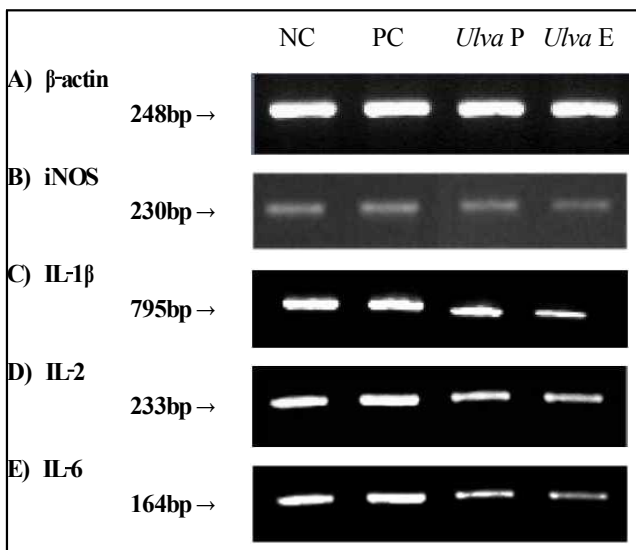


Fig. 1. Effects of dietary supplementation of *Ulva-pertusa* on splenic cytokines mRNA expression in broiler chickens. cDNAs were amplified using primers specific for interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and β -actin. The sizes of the respective PCR fragments are indicated by arrows.

현이 낮았다 (P<0.05). 위의 결과로 구멍갈파래 분말과 추출물은 LPS 주입에 의한 염증 관련 사이토카인 mRNA 발현을 억제하는 경향을 나타내며, 특히 구멍갈파래 추출물이 발현억제 효과가 더 높은 것으로 확인되었다. 앞선 immunoglobulin 분석결과에서 언급한 바와 같이 구멍갈파래를 가압열수로 추출한 방식이 산성다당의 이용도를 더 높일 수 있는 것으로 사료된다. Ivanova 등 (1994)은 갈파래에서 추출한 산성다당은 사람이나 조류의 인플루엔자 바이러스를 억제하여 항바이러스 효과가 있다고 보고하였으며, Margret 등 (2009)은 쥐에서 갈파래 메탄올추출물의 염증억제 효과를 밝힌 바 있다.

요 약

본 연구는 구멍갈파래 급여가 육계 혈액 내 항산화, 면역조절 효과에 미치는 영향을 구명하기 위해 실시 하였으며, 이를 위해 LPS로 염증반응이 유도된 육계에서 혈액 SOD 유사 활성, immunoglobulin 농도 및 비장 조직 내 cytokine mRNA 발현을 조사하였다. 공시계로는 1일령 Ross종 육계수컷 96수를 선별하여, 육계전기 (0~3주), 육계후기 (3~5주)의 5주 동안 사양시험을 실시하였다. 처리당 24수 (3수×8반복)씩 4처리구에 총 96수를 임의배치하여 실시하였다. 시험구 배치는 무첨가구 (Negative Control; NC), 시판 면역증강제 첨가구 (Positive Control; PC, β -glucan 25 ppm), 구멍갈파래 분말 3% 첨가구 (*Ulva pertusa kjellman* Powder; *Ulva P*) 및 구멍갈파래 추출물 0.3% 첨가구 (*Ulva pertusa kjellman* Extract; *Ulva E*)로 배치하였다.

혈액 내 SOD 유사 활성을 분석한 결과 구멍갈파래 첨가구 (*Ulva P*, *Ulva E*)는 무첨가구와 면역제제 첨가구보다 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났다 (P<0.05). immunoglobulin 농도에서 IgA와 IgG 농도는 처리구간의 차이가 나타나지 않았지만 IgM 농도에서 구멍갈파래 추출물 처리구가 무첨가구에 비해 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다 (P<0.05). 이는 구멍갈파래 추출물이 LPS에 대한 면역자극을 조절하여 과잉면역반응을 억제한 것으로 사료된다. 비장 조직 내 cytokine mRNA 발현량을 조사한 결과 IL-1, IL-2 및 IL-6에서 처리구별 공통적인 차이를 나타내었는데 구멍갈파래 처리구 (*Ulva P*, *Ulva E*)의 mRNA 발현 비율이 무첨가구와 면역제제 처리구에 비해 낮았으며, 구멍갈파래 처리 간 비교에서 구멍갈파래 추출물이 분말보다 더 낮았다 (P<0.05). iNOS의 경우 구멍갈파래 분말 첨가구는 무첨가구와 유의적인 차이가 없었지만 구멍갈파래 추출물 첨가구는 모든 처리구보다 iNOS의 발현이 낮았다 (P<0.05). 구멍갈파래 분말과 추출물은 LPS 주입에 의한 염증 관련 사이토카인 mRNA 발현을 억제하는 경향을 나타내며, 특히 구멍갈파래 추출물이 발현억제 효과가 더 높은 것으로 확인되었다 (P<0.05).

본 연구 결과 육계에서 구멍갈파래 급여는 염증, 질병의 원인인 활성산소 제거에 효과가 있다고 사료된다. 특히 구멍갈파래 추출물은 혈액 내 IgM의 농도를 조절하여 외부항원에 대한 과잉면역반응을 억제하고 염증 관련 cytokine mRNA 발현을 억제하여 육계 면역조절에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

(주제어: 육계, 면역, 구멍갈파래, SOD, Immunoglobulin, Cytokine)

인 용 문 헌

- AOAC 1995 Official method of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC USA P1-43.
- Ayako, Y., Koichi, Y. and Keiichi, O. 1999. Iodine distribution in blades of several laminarias grown in the same sea area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 58:1373-1379.
- Azuine, M. A., Goswami, U. C. and Katal, J. J. 1992. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of carotenoids and dietary palm oil. Nutr. Cancer 17:287-295.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
- Dreesman, G., Larson, C., Pinckard, R. N., Groyon, R. N. and Benedict, A. A. 1965. Antibody activity in different chicken globulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140:1289-1293.
- Fellenberg, R. von. 1987. Kompendium derallgemeinen Immunologie. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Han, J. G., Ha, J. H., Choi, Y. B., Go, J. L., Kang, D. H. and Lee, H. Y. 2009. The Comparison of Extraction Process for Enhancement of Immunomodulating Activities of *Ulva pertusa kjellman*. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 41(4):380-385.
- Hanaa H. Abd El-Baky, Farouk K. El Baz and Gamal S. El Baroty. 2009. Potential Biological Properties of Sulphated Polysaccharides Extracted from the Macroalgae *Ulva lactuca* L. Academic Journal of Cancer Research. 2(1):01-11.
- Higgings, D. A. 1975. Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. The Vet. Bull. 45:139-154.
- Ito, K., Hori, K. 1989. Seaweeds; chemical composition and potential food uses. Food Rev. Int. 5:101-144.
- Ivanova, V.R., M. Rouseva, J. Kolarove Serkedjieva and N. Manolova. 1994. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. Preparative Biochem. Biotechnol. 24:83-97.
- Kim, I. H., Lee, H. H., Jang, J. S., Lee, S. H., Ha, J. M., Ha, B. J. and Lee, J. H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Seaweed, *Ulva lactuca*. Environmental Mutagens & Carcinogens. 26(2):48-52.
- Klasing, K. C. 1994. Avian leukocytic cytokines. Poult. Sci. 73:1035-1043.
- Koenen, M. E., Boonstra-Blom, A. G. and Jeurissen, S. H. M. 2002. Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 89:47-56.
- Leshchinsky, T. V. and Klasing, K. C. 2001. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. Develop. and Comp. Immunol. 25:629-638.
- Margret, R. J., Kumaresan, S. and Ravikumar, S. 2009. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. Journal of Environmental Biology. 30(5):899-902.
- Mason, V. C., 1984. Metabolism of nitrogen compound in the large gut: Emphasis on recent findings in the sheep and pig. Proc Nutr Soc. 43:45-53.
- Nam, C. S., Kang, K. S., Ha, J. M., Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, D. G., Jang, J. S., Kang, H. Y. and Ha, B. J. 2006. Anti-Oxidative Effects of *Ulva lactuca* Extract Fractions Against CCl₄ Toxication. J. Toxicol. Pub. Health. 22(4):333-338.
- Newmark, H. L. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents, Adv. Extract obtained from seaweeds. Bull. Korean. Fish. Soc. 19: 502-508.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernandez, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. and Rio, A. 2005. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. Food Chemistry, 99:98-104.
- Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions. Annu. Rev. Physiol. 48:67-657.
- Ray, B. and Lahye, M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvaes, chlorophyta), extraction and chemical composition. Carbohydr. Res. 274:251-261.
- Rietschel, E. T., Schletter, J., Weidemann, B., El-Samalouti, V., Mattern, T., Znhringer, U., Seydel, U., Brade, H., Flad, H. D., Kusumoto, S., Gupta, D., Dziarski, R. and Ulmer, A. J. 1998. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. Microb. Drug Resist. 4:37-44.
- SAS, 2008 SAS User's guide, Statistical Analysis System Inst. Inc Cary NC.
- Sibbald, I. R. 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. Poultry Sci. 48:41-43.
- Stefan, M. and Gudrun, M. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47:469-474.
- Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. 1991. Vegetable, fruit, and cancer II mechanism. Cancer Causes Aontril. 2:427-442.
- Sugano, Y., Kodama, H., Terada, I., Yamajaki, Y. and Noma, M.

1994. Purification and characterization of a novel enzyme, α -neogargarooligosaccharide hydrolase, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* 176:6812-6818.
- Szenberg, A., Lind, P. and Clarke, K. 1965. IgG and IgM antibodies in fowl serum. *Aust Exp Biol Med Sci.* 43:451-454.
- Xie, H., Rath, N.C., Huff, G. R., Balog, J. M. and Huff, W. E. 2000. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult. Sci.* 79: 33-40.
- Yoo, J. S., Cheun, B. S. and Kim, N. G. 2001. Determination of Na^+ channel blocker in seaweeds. *Korean. J. Environ. Biol.* 19:107- 112.
- 국립수산과학원. 2010. 기후변화에 따른 수산업 대응방안. 기후변화 대응사업 추진성과 보고회.
- 환경부. 2008. 연안 녹조(綠潮)를 유발하는 해조류 갈파래의 생육 지도 작성. 보도자료.
- 한국사양표준. 2007. 농촌진흥청 축산과학원.

(Received Apr. 18, 2011; Revised Sep. 30, 2011; Accepted Oct. 10, 2011)