한국가금학회지 제 43권 제 1호, 21~29 (2016)
Korean J. Poult. Sci. Vol.43, No.1, 21~29 (2016)
http://dx.doi.org/10.5536/KJPS.2016.43.1.21

고온 환경 조건에서 액상 라스베라트롤의 급여가 육계의 생산성, 육질 및 회장 형태에 미치는 영향

이영주[1] · 유재홍[2] · 사미루[2] · 김은주[2] · 구본진[2] · 허정민[2,†]
[1]전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부, [2]충남대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부

Effect of Dietary-Liquid Resveratrol on Growth Performance, Meat Quality Traits, and Ileum Morphology of Broiler Chickens under Moderate Heat Stress

Young-Joo Yi[1], Jaehong Yoo[2], S. Wickramasuriya Samiru[2], Eunjoo Kim[2], Bonjin Koo[2] and Jung Min Heo[2,†]
[1]*Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea*
[2]*Division of Animal and Dairy Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea*

ABSTRACT A total of 144 one-day-old male broilers (ROSS × Ross 308) (42±0.1 g) were used in a completely randomized design and allotted to one of three dietary treatments to give 6 replicates per treatment (8 birds per cage). The three watery dietary treatments were 1) a corn-soybean meal-based relation [Negative control (NC); no antimicrobial compounds added] with tab water, 2) 8 ppm liquid-alpha-lipoic acid [Positive control (PC)] or 3) 100 ppm liquid-resveratrol. All dietary treatments were continuously provided as a liquid form. Birds were housed in a battery cage (n=48), and were offered liquid dietary treatments at all times. The ambient temperature was maintained at 32±1℃ for the first 3 weeks and decreased gradually to 28±1℃ by the end of the experiment (d 35) to induce moderate heat stress. One bird per pen (n=6) was euthanized via cervical dislocation at day 21 to obtain terminal ileum to measure villous height and crypt depth, while another bird per pen (n=6) was similarly euthanized at day 35 and used to harvest breast meat and drumsticks to evaluate meat quality traits. Birds fed liquid-resveratrol did not improve (P>0.05) body weight and average daily gain compared with those fed other dietary treatments from day 1 to day 35. Birds fed liquid-resveratrol had no effect (P>0.05) on villous height compared with birds were in other dietary treatments at day 21. Liquid-resveratrol had no effect (P>0.05) on thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in drumsticks compared with other dietary treatments at day 35. Furthermore, birds fed liquid-resveratrol had no effect (P>0.05) on DPPH radical scavenging activity both in breast meat and drumsticks compared with those fed other dietary treatments at day 35. Morphological changes of ileum were not observed by immunofluorescence, and the level of occludin protein from ileum extracts also did not differ among groups. Our results suggested that liquid form of antioxidant compounds used in the current study such as alpha-lipoic acid (8 ppm) or resveratrol (100 ppm) did not improve growth performance, meat quality traits and histology of terminal ileum compared with those fed negative control in broiler chickens under moderate heat stress for 35 days.

(Key words : alpha-lipoic acid, broilers, growth performance, heat stress, intestinal morphology, meat quality, resveratrol)

서 론

현재 국내 사료 자원이 부족한 실정에서 사료의 이용성 개선과 기능성 증진을 목적으로 하는 사료 첨가제의 개발은 매우 중요한 연구 분야이다. 더불어 여름철 높은 온도와 습도는 국내 양계산업의 발전을 저해하는 요소로 지목되어 왔다. 닭은 몸 전체가 깃털로 쌓여 있고, 땀샘의 발달이 미약하여 체온조절이 용이하지 않아 고온에 취약한 것으로 알려져 있다. 더불어 닭의 높은 대사율과 높은 평균체온(병아리 39℃, 성계 40~41℃)은 혹서기(30℃ 이상)의 성장과 생산성을 저하시키며, 더 나아가 생존을 어렵게 만든다. 고온 환경은 닭의 음수량을 증가시키고, 사료섭취량을 감소시켜 1) 체내 영양/호르몬 불균형, 2) 비타민/필수영양소 합성능력 저하, 3) 탈수로 인한 전해질 불균형, 4) 면역능력 저하가 일어나

† To whom correspondence should be addressed : jmheo@cnu.ac.kr

생산성과 육질의 품질이 저하되게 하고, 더 나아가 폐사로 이어지게 한다(Deyhim and Teeter, 1991; Mahmoud et al., 1996; Bonnet et al., 1997; Smith, 2003). 이와 같은 고온 스트레스로 인한 육계의 성장률에 대한 피해와 경제성의 저하는 앞으로 더 증가할 것으로 보인다(Mahmoud, 2015).

육계의 비약적인 성장을 위하여 양계 사료 내 지방의 함량이 증가하게 되었다. 이로 인한 산화스트레스가 증가함에 따라 과산화지방질(lipid peroxidation)과 반응 산소 종(reactive oxygen species) 등이 증가하게 되었다(Halliwell, 1994; Gokce et al., 2000). 이러한 지방의 일부 성분은 공기와 접촉하면서 쉽게 산화되어 사료의 품질을 저하시키는 원인이 되기도 한다. 따라서 사료 첨가제로서 항산화제는 가축의 체조직의 항산화, 면역력 증진 등과 같은 생리작용에 중요한 기능을 할 뿐만 아니라, 사료 내 지방산의 산패를 억제하며, 사료의 품질을 보호하는 기능을 가져야 하므로, 이에 관련된 많은 연구가 진행되고 있다(Rice-Evans and Paganga, 1997; Lauridsen et al., 1999; Frei and Higdon, 2003).

Alpha-lipoic acid(ALA)는 고온 스트레스를 저감시킬 수 있는 항산화제로 알려져 있다. ALA는 활성산소를 제거하거나 활성산소를 생산하는 다양한 종류의 Fe^{2+}을 킬레이트 시키는 등 직/간접적으로 항산화제 역할을 수행한다(Packer et al., 1995). 이는 소화 및 흡수가 용이하고, 사료에 손쉽게 적용 가능한 것으로 알려져 있다. ALA는 지용성과 수용성을 모두 포함하고 있으며, 세포막으로의 수동 전달이 매우 용이한 것으로 알려져 있다(Srilatha et al., 2010). 이렇게 세포막 안으로 전달되어진 지방산은 dihydrolipoic acid로 산화되고, 이는 vitamin E, vitamin C, gultathione peroxidase 등을 재생산한다(Biewenga et al., 1997).

식물성 polyphenolic compound로 알려진 라스베라트롤(3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene)은 지방산화작용을 억제하는 또다른 항산화제로 알려져 있다(Rubiolo and Vega, 2008). 라스베라트롤은 free radical reactions을 통하여 glutathione disulfide의 합성을 저해하고, glutathione을 저수준을 유지함으로써 세포의 손상을 방지하는 것으로 알려졌다(Hung et al., 2000).

따라서 본 실험은 음수 급이를 통한 ALA(8 ppm)과 액상 라스베라트롤(100 ppm)이 실험적 고온 환경 아래에서 육계의 생산성, 면역반응, 육질의 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

본 실험은 충남대학교의 동물윤리위원회의 검증 절차를 거쳐 수행되었다(CNU-00521).

본 실험에 공시된 닭의 사양은 본 대학교 닭 사육 관리 지침에 따랐으며, 동물의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험 윤리위원회의 규정을 준수하고, 승인을 받았다.

1. 공시동물 및 시험설계

본 시험에 이용된 공시계는 1일령 육계 수평아리(Ross × Ross 308) 144수를 선별하여 육계초기(0~3주령)과 육계후기(3~5주령)의 35일 동안 시험을 실시하였다. 시험설계는 3처리구를 처리구당 6반복, 반복당 8수씩으로 나누어 완전임의 배치하였다. 기초사료는 한국가금사양표준(2012)에 근거한 옥수수-대두박 위주의 육계사료를 초기(CP 20%, ME 3,200 kcal/kg)와 후기(CP 19%, ME 3,200 kcal/kg)로 나누어 급여하였다(Table 1). 시험음수 사료는 1) 수돗물(Tab water; NC), 2) 8 ppm liquid-ALA(PC) 그리고 3) 100 ppm 액상 라스베라트롤을 매일 9:00 h와 16:00 h에 1일 권장 음수량을 초과하도록 급이하였다.

2. 사양관리

사양관리는 배터리 케이지(86×57×35 cm^2)에서 8수씩 수용하여 35일간 사양하였다. 사료는 무제한 급이하였고, 시험음수 사료는 간이 음수 급이기를 통하여 공급하였다. 점등시간은 24시간 연속점등으로 하였으며, 입추 시에 32±1℃ 조절한 후, 3주 후에 28±1℃로 낮추었다. 계사 내 습도는 60~70%를 35일간 동안 유지하여, 인위적 고온 환경을 연출하였다.

3. 시료채취

회장의 villous 길이와 crypt 깊이를 측정하기 위하여, 시험 21일째 처리구당 반복별로 평균 체중에 가까운 육계(1 birds per pen; n=6)를 선정하여 안락사하였다. 안락사 후 회장을 적출하여 0.2 M PBS(phosphate buffer solution, pH 7.4)로 희석한 10% formalin으로 고정하여, microtome(Clinicut 60 Cryostat, Bright Co. Ld., England)으로 10 μm 두께로 −40℃에서 절편하였다. 절편은 HE 염색(hematoxylin-eosin stain)후 micrometer를 광학현미경에 장착하여 소장 villous의 길이와 crypt 깊이를 측정하였다(Bio-Rad Microscience, UK). 육질 측정을 위한 시료를 채취하기 위하여 시험 종료 시(실험 35일째) 각 처리구당 반복별로 평균 체중에 가까운 육계(1 birds per pen; n=6)를 선정하여 안락사하였다. 도체는 육질 측정을 위해 즉시 −20℃에 보관하였다.

Table 1. Composition of the experimental diets (as-fed basis)

	Item	Diets	
		1~3 weeks	3~5 weeks
Ingredient (%)	Corn	29.64	32.26
	Wheat	30.00	30.00
	Soybean meal	28.67	26.71
	Canola meal	4.00	4.00
	Vegetable oil	4.05	4.30
	Salt	0.26	0.29
	Limestone	1.02	1.51
	Choline	0.12	0.10
	Dicalcium phosphate	1.04	0.88
	Vit.-Min. premix[1]	0.26	0.26
	L-Lysine	0.66	0.38
	DL-Methionine	0.29	0.30
Calculated analysis	CP (%)	20.0	19.0
	ME (kcal/kg)	3,200	3,200
	Lysine (%)	1.17	1.07
	Methionine (%)	0.56	0.53

[1] Provided the following nutrients (per kg of air-dry diet): Vitamins: A 12,000 IU, D 33,000 IU, E 15 mg, K 2 mg, thiamine 2 mg, riboflavin 6 mg, pyridoxine 2 mg, calcium pantothenate 0.03 mg, folic acid 0.2 mg, niacin 45 mg, biotin 0.15 μg. Minerals: calcium 0.5%, Co 0.5 mg (as cobalt sulphate), Cu 10 mg (as copper sulphate), iodine 0.9 mg (as potassium iodine), iron 80 mg (as ferrous sulphate), Mn 80 mg (as manganous oxide), Se 0.2 mg (as sodium selenite), Zn 80 mg (as zinc oxide).

4. 조사항목

1) 증체량, 사료섭취량, 사료 요구율

시험기간 동안 1주일 단위로 체중을 측정하여 개체별 증체량을 산출하였으며, 사료섭취량은 반복별로 사료잔량을 측정하여 섭취량을 구하였다. 조사된 사료섭취량과 증체량을 통해 사료 요구율을 산출하였다.

2) Western Blotting

Western blotting에 이용될 단백질은 200 μL RIPA buffer (#IBS-BR004, Intron, Seongnam, Gyeonggi-do)에 phosphatase protease cocktail inhibitor(#1861281, Thermo Scientific, Seoul)를 넣고 1분간 균질기(400 Lab blender, Seward, England)를 이용하여 균질화시키고, 원심분리기(Hanil model Union 5kr, Korea)를 이용하여 5분간 13,000 rpm에서 원심 분리하여 추출하였다. 각 샘플들은 10% SDS-PAGE gel에 loading한 후 (20 μg/lane), poly vinylidene fluoride membrane(Hybond-PVDF; #RPN303F, Amersham, Bucks, UK)에 이동시켰다. 세포막은 TBS-5% skim milk에서 1 시간 동안 blocking 시키고, 0.05% Tween-20(TBST)에 rabbit polyclonal anti-occludin antibody (#40-6100, Thermo scientific) 또는 mouse monoclonal anti-actin antibody(#ab3280, Abcam, Cambridge, MA, USA)를 각각 1:1,000 희석한 뒤 4℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 세포막은 TBST로 5회 이상 세척한 뒤 anti-rabbit 또는 anti-mouse-HRP conjugated secondary antibody(#31402 & #62-6520, Thermo scientific)를 1:10,000로 희석하여 넣은 TBST에서 1시간 동안 실온에서 교반하였다. SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit(#1862890, Thermo Scientific)를 첨가한 후, LAS-4000(Fuji film, Tokyo, Japan)을 이용하여 사진을 찍은 뒤 단백질 bands를 확인하였다.

3) Immunofluorescence

조직 샘플은 paraffin에 고정하고, 5-μm로 절편한 뒤 슬라이드에 부착시키고, amino silane(APS)으로 코팅하였다. 그리고 xylene으로 deparaffin화 시킨 뒤, 에탄올에 침지하여 수화시키고, PBS로 세척하였다. 슬라이드는 citric acid buffer (pH 6.0)에서 20분간 boiling 시켜 antigen retrieval한 후, PBS-0.1% Triton X(PBS-TX)에서 30분간 incubation한 후 5% normal goat serum(NGS)이 포함된 PBS-TX에서 30분간 blocking 시키고, 1% NGS PBS-TX에 rabbit polyclonal anti-occludin antibody와 mouse monoclonal anti-actin antibody를 각각 1:100로 희석하여 첨가한 후 슬라이드에 소적한 뒤 4℃에서 12시간 동안 정치시켰다. PBS로 세척한 후 goat anti-rabbit IgG secondary antibody Alexa Fluor® 488, anti-mouse IgG secondary antibody TRITC conjugate(Thermo Scientific), 2.5 mg/mL DAPI(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)가 포함된 PBS-TX로 1시간 동안 incubation한 후, 다시 PBS로 세척 후 coverslip을 덮고 매니큐어로 사방을 sealing하여 슬라이드를 완성하였다. 형광 염색된 조직의 관찰은 형광현미경 (Nikon Eclipse Ci microscope, Nikon Instruments Inc., Seoul, Korea)하에서 관찰하였으며, 이미지는 현미경에 장착된 카메라(Nikon DSFi2)를 이용하여 캡쳐한 후 imaging software(NIS-Elements BR, version 4.3, Nikon)에서 사진을 확인하였다.

4) pH

가슴육에서 근막, 지방 등을 제거한 후 세절한 시료 3 g을 증류수 27 mL와 함께 균질기(400 Lab blender, Seward, England)로 14,000 rpm에서 1분간 균질하여 pH-meter (WTW pH 720, Germany)로 측정하였다.

5) DPPH Radical 소거능

다리육과 가슴육의 시료에서 항산화 효과를 측정하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl(DPPH)에 대한 전자 공여능은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 150 μM DPPH 용액 1 mL에 농도별로 조제한 시료 200 μL와 ethanol 800 μL를 혼합하고, vortex mixer로 10초간 진탕한 후 30℃의 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후 UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1601PC, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 비교 항산화 물질로 ascorbic acid를 이용하였다.

6) 지방산패도

지방산패도(TBARS)는 Wittee et al.(1970)의 방법으로 측정하였으며, 시료를 칼로 작게 세분한 후, 세분한 시료 10 g에 butylated hydroxytoluence(BHT) 50 μL와 증류수 15 mL를 가해 균질기(400 Lab blender, Seward, England)로 10,000 rpm에서 10초간 균질하였다. 균질액 2 mL에 TBA/TCA 혼합용액 4 mL를 넣고 교반기에서 10초간 혼합한 후 90℃ 항온조에서 15분간 가열 반응시켰다. 냉각수로 식힌 시료는 3,000 rmp에서 15 분간 원심분리(Hanil model Union 5kr, Korea)를 시킨 후, 상층액을 회수하여 UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-1601PC, Japan)로 529 nm의 흡광도를 측정하였다. 지방산패도는 milligram malonaldehyde(MA) per 1 kg sample(mg MA/kg)으로 표기하였으며, 표준함수는 다음과 같다.

$y = 0.1975x + 0.0011$ ($R = 0.999$)

지방산패도 = 흡광도 × x + 0.0011

5. 통계분석

처리 간 성장 능력, 육질의 특성에 대한 모든 자료의 통계분석은 SPSS 22.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program의 GLM(general linear model)을 이용하여 실시하였고, Battery cage를 통계 단위로 계산하였으며, 육질과 회장의 형상은 개별처리 하여 계산하였고, Block은 Radom factor로 계산하였다. 각 처리구간의 표준 값을 Tukey's Test를 통하여 다중검정하였으며, 95% 신뢰수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 연구기간 동안 시험 육계는 원만한 음수와 사료를 섭취하였으며, 급사증후군(sudden death syndrome; SDS), 스트레스 등에 의한 폐사 혹은 질병의 증상은 발견되지 않았다.

1. 사육단계별 증체량, 섭취량 및 사료 요구율

본 실험에서 발생된 육계의 1일에서 35일간의 증체량, 사료섭취량 및 사료 요구율은 Table 2에 나타내었다. 육계 발생 후 전 일령에 걸쳐 처리구와 대조구 간의 증체량, 사료섭취량 및 사료 요구율은 유의적인 차이가 없는 결과를 보였다(P>0.05). 많은 스트레스 요인 중 특히 고온 스트레스는 닭의 사료 섭취량, 증체량, 사료 효율 등을 모두 모두 감소시킨다(Smith, 2003). Liu et al.(2014)은 고온 환경의 닭에게 분말형 라스베라트롤을 200 mg/kg 이상 급여하였을 때 대조구에 비해 증체량은 증가하고, 사료효율은 감소한다고 보고한 바 있다. 본 실험과 비교하였을 때 급여한 라스베라트롤의 양이 약 2배 차이가 나고, 급여형태가 달라 본 연구의 결과와 직접적으로 비교하긴 어려우나, 라스베라트롤의 급여량을 늘렸을 때 유의적 차이가 생길 가능성이 있을 것으로 사료된다.

2. 장내 융모의 형태학적 관찰

본 실험에 사용된 육계의 융모의 형태학적 관찰을 위하여, 처리구 당 6수의 육계를 21일령에 안락사시켜 시료를 채취하였으며, 융모의 형태학적 관찰은 Table 3에 나타내었다. 장내 환경과 그 형태학적 구조는 섭취한 사료의 기능을 알 수 있는 지표가 된다. 길이가 길어진 융모는 장 건강의 증진과 연관이 있다(Pluske et al., 1997). 육계의 장 내 상피세포는 외부에서 유입된 유해미생물이나 독소 등의 흡수를 막아주는 장벽 역할을 한다(Bouchama and Knochel, 2002). 따라서 장 내 상피세포가 손상되면 박테리아에 대한 저항성에 해로운 영향을 미치게 된다. 저항성이 낮아짐에 따라 장 내 항원, 박테리아 그리고 바이러스의 통과가 증가하게 되면 체 내 항균 또는 항염증 반응의 불균형이 일어나 성장에 부정적으로 작용할 수 있다(Deng et al., 2012). 본 실험에서 융모 길이의 처리구가 대조구와 비교하여 높긴 하나, 유의적인 영향을 미치지는 않았다(P>0.05). 이와 비슷한 실험으로 라스베라트롤 등의 폴리페놀 물질이 다량 함유된 포도씨 추출물 60 g/kg을 육계에게 급여했을 때 융모의 길이가 길어지고, 음와는 깊어지는 등 장내 건강이 증진되었다고 보고된

Table 2. Effect of dietary antioxidant on growth performance and mortality rate of broiler chickens for 1 to 35 days of age

Item		NC	PC	Resveratrol	SEM[1]	*P*-value
Body weight (g/bird)	d 1～7	182.2	185.7	186.0	0.940	NS[2]
	d 8～14	481.4	482.9	495.3	4.940	NS
	d 15～21	898.8	912.7	894.9	6.340	NS
	d 22～28	1,485.6	1,528.7	1,497.9	11.520	NS
	d 29～35	1,912.7	1,964.6	1,900.8	12.360	NS
	d 1～35	992.1	1,014.9	997.4	5.950	NS
Average daily gain (g/bird)	d 1～7	26.0	26.5	26.6	0.150	NS
	d 8～14	68.8	69.0	72.5	0.760	NS
	d 15～21	128.4	130.4	127.8	1.120	NS
	d 22～28	212.2	218.4	214.0	1.580	NS
	d 29～35	273.2	280.7	271.5	1.580	NS
	d 1～35	141.7	145.0	142.5	0.670	NS
Average daily feed intake (g/bird)	d 1～7	23.2	22.3	23.5	0.250	NS
	d 8～14	67.1	63.6	68.8	1.520	NS
	d 15～21	82.0	77.1	78.8	4.480	NS
	d 22～28	128.5	127.9	125.1	1.640	NS
	d 29～35	150.8	151.6	151.5	3.580	NS
	d 1～35	90.3	88.5	88.3	1.880	NS
Feed conversion (g/g)	d 1～7	1.13	1.19	1.13	0.012	NS
	d 8～14	1.04	1.10	1.05	0.018	NS
	d 15～21	1.68	1.72	1.78	0.089	NS
	d 22～28	1.66	1.71	1.72	0.021	NS
	d 29～35	1.82	1.89	1.79	0.041	NS
	d 1～35	1.44	1.52	1.50	0.018	NS

NC; Negative control, PC; positive control.
[1] Pooled standard error of mean.
[2] NS: Not significant.

Table 3. Effect of dietary antioxidant on villous height and crypt depth of broiler chickens on day 35

Item	NC	PC	Resveratrol	SEM[1]	*P*-value
Villous height (μM)	439.9	463.6	482.3	5.57	NS[2]
Crypt depth (μM)	99.8	110.2	113.0	2.43	NS
Villous height : Crypt depth	4.5	4.3	4.3	0.09	NS

NC; Negative control, PC; positive control.
[1] pooled standard error of mean.
[2] NS: Not significant.

바 있다(Viveros et al., 2011). 이는 증체량의 결과와 마찬가지로 라스베라트롤을 본 실험의 100 ppm보다 더 많이 급여했을 때 결과에 유의성이 나타난 것으로 보아 라스베라트롤 급여량의 차이에 따른 결과로 판단된다.

3. pH, DPPH Radical 소거능, 지방산패도

본 실험에 사용된 육계의 pH, DPPH radical 소거능, 지방산패도를 측정하기 위하여 육계를 35일령에 처리구당 6수씩 안락사 시켜 시료를 채취하였으며, pH, DPPH radical 소거능, 지방산패도는 Table 4에 나타내었다. 식육의 물리적 특성 중 pH는 육색, 보수성, 조직감 등에 큰 영향을 미치므로 육질의 평가 시에 반드시 측정해야 하는 요소이다(Bendall and Swatland, 1988). 균질한 시료의 pH 측정 결과, 처리구와 대조구 간에 유의적 차이는 관찰되지 않았다(P>0.05). 시료가 가지고 있는 항산화력을 추정하기 위해 DPPH 용액을 사용하여 DPPH radical이 감소되는 정도를 측정하면 특정 물질의 항산화 능력을 간접적으로 알 수 있다(Brand-Williams et el., 1995). 다리육과 가슴육에서 채취한 시료를 *in vitro*에서 DPPH 방법으로 radical 소거능을 관찰한 결과, 라스베라트롤과 ALA는 항산화제로써 특이적 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 식육의 지방산패도는 산화에 의해 생성된 과산화물이 2차 산화생성물인 malondialdehyde로 분해되어 지방분해효소 및 미생물 대사 등에 의해 지질이 분해됨에 따라 증가한다(Brewer et al, 1992). 일반적으로 melondialdehyde는 고온스트레스를 받은 육계의 산화스트레스 정도를 판단하는 척도로 사용되고 있다(Lin et al., 2006). 본 실험에서 처리구와 대조구간의 지방산패도의 유의적 차이는 나타나지 않았다(P>0.05). Aengwanich and Suttajit(2010)는 고온 환경의 육계에게 본 실험에서 사용한 라스베라트롤과 같은 폴리페놀계 물질인 tamarind 껍질 추출물을 100 mg/kg을 급여하였던 군에서 melondialdehyde 정도에 유의적 차이가 없었으나, 200 mg/kg 이상 급여하였을 때 유의적으로 감소하였다고 보고한 바 있다. 이와 같은 결과로 보아 라스베라트롤의 급여량이 증가할 때 유의적 차이가 발생할 것으로 보인다.

4. Immunofluorescence에 의한 Occludin의 Localization

Tight junctions(TJs)은 세포막내에 존재하는 단백질 복합체로써 상피나 내피세포층에서 인접한 세포들 간의 연결에 관여하고, 거대분자 전이를 조절하는 장내점막의 장벽을 구성하는 중요한 단백질이다(Cummins, 2012), Occludin은 TJs 단백질 중 한 가지로 세포-세포간의 연결에 관여하는 transmembrane linker 단백질로 장 내막의 형태 유지에 관여하는데, 최근 occludin의 분포로 장 내 형태학적 변화를 관찰할 수 있는 것으로 보고되었다(Song et al., 2014; Chen et al., 2015). Fig. 1과 같이 각 NC, ALA, 라스베라트롤(Fig. 1, A~C) 그룹의 ileum 조직은 고정과 염색과정을 거친 뒤 형광현미경하에서 관찰되었다. 핵(nucleus)은 blue 형광(DAPI; Fig. 1, A~C)을 나타내며 occludin은 green 형광(Fig. 1, A'~C')으로 표지되었다. 각 조직의 actin은 red 형광(Fig. 1, A''~C'')으로 표지되어 점막의 전반적인 형태를 나타내었다. 특히 occludin은 actin과 세포들 간의 결합 부위에 고루 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Merge; Fig. 1, A'''~C'''). 본 실험에 있어서 immunofluorescence에 의한 각 그룹 당 occludin과 actin의 비정상적 분포와 위치의 차이점은 관찰되지 않았다.

5. Western Blotting에 의한 Occludin 단백질 확인

사람과 동물에서 설사 발병 시 장내 투과성(intestinal per-

Table 4. Effect of dietary antioxidant on meat quality traits of broiler chickens on day 35

Item	NC	PC	Resveratrol	SEM[1]	*P*-value
L-pH	6.61	6.60	6.57	0.150	NS[2]
B-pH	6.24	6.24	6.22	0.032	NS
L-DPPH	0.57	0.58	0.59	0.030	NS
B-DPPH	0.63	0.64	0.67	0.024	NS
L-TBARS	0.49	0.49	0.50	0.021	NS
B-TBARS	0.29	0.33	0.36	0.036	NS

NC; Negative control, PC; positive control, L; leg, B; breast.
[1] Pooled standard error of mean.
[2] NS: Not significant.

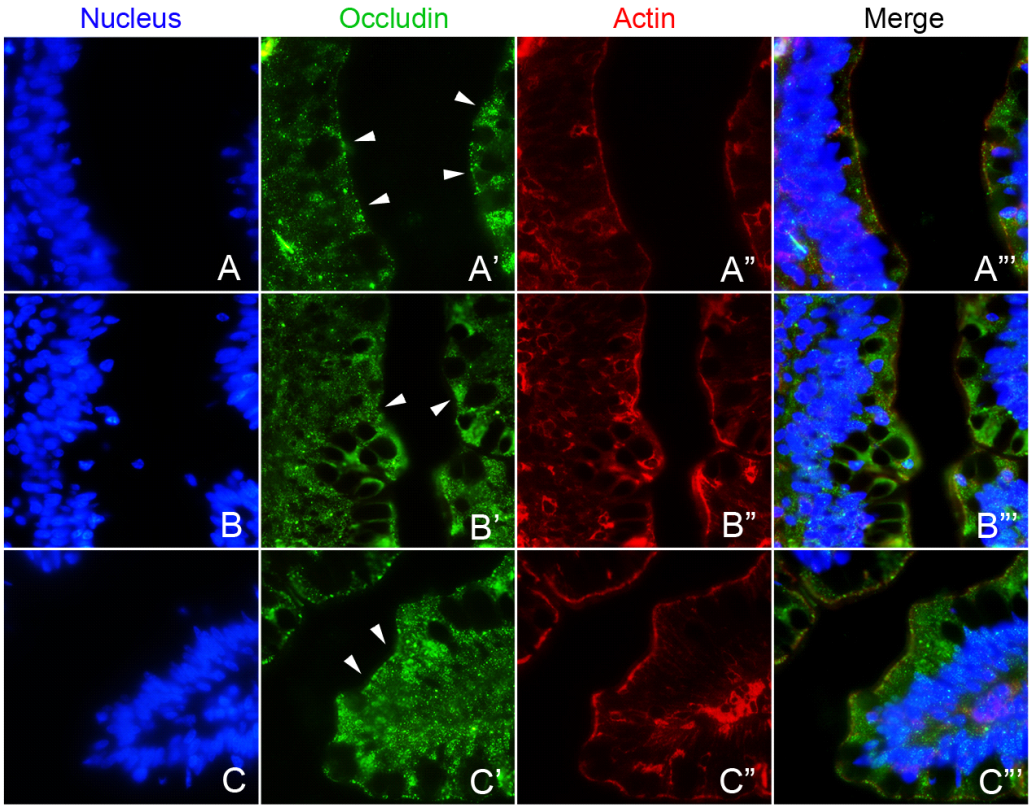

Fig. 1. Verification of occludin localization with immunofluorescence. Each group (A~C) showed in nucleic (blue; A~C), occludin (green, arrow; A'~C'), actin (red; A"~C"), and merged (merge; A'''~C''').

meability)이 증가되는 것으로 알려져 있는데(Smecuol et al., 1997; Sturniolo et al., 2002), 이유 후 돼지(post-weaning piglets)의 설사 발병 연구에서 설사억제제(ZnO 또는 tetrabasic zinc chloride)를 급여하였을 시, 돼지 장내 투과성이 감소되고, occludin 단백질량이 증가되는 것으로 확인되었다(Zhang and Guo, 2009). 이는 설사억제제가 손상 또는 약화된 장 내막을 회복시킴으로써 장 내막 세포 단백질인 occludin의 분포량도 증가하는 것으로 알 수 있다(Zhang and Guo, 2009). 본 연구의 상기의 결과, occludin은 ileum 내에 존재하는 단백질임을 확인할 수 있었다. 따라서 추출한 조직 샘플을 western blotting 방법을 이용하여 occludin 단백질 여부를 재확인하였다(Fig. 2). 그 결과, 각 A, B, C 그룹의 조직에서 occludin의 band들이 65 kDa 부근에서 모두 확인되었다. Actin을 이용하여 재 탐지한 결과, 42 kDa에서 일정한 밴드 패턴을 나타내었다. 그룹 간 occludin의 패턴 차이는 관찰되지 않았으며, occludin은 ileum 내에 존재하는 단백질임을 알 수 있었다.

결과적으로 본 실험에서는 고온환경에서 육계에게 액상 라스베라트롤과 ALA를 각각 100 ppm, 8 ppm을 급여한 결과, 음성대조군과 비교하여 성장률, 회장 말단의 조직, 육질 그리고 면역반응에서 개선되는 효과가 없었음을 확인하였다.

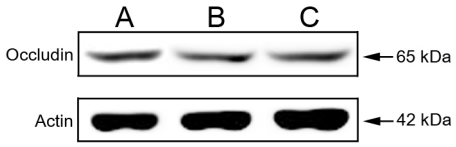

Fig. 2. Verification of protein with western blotting. Occludin (65 kDa) and actin (42 kDa; control) found in the tissue of each group (A~C).

사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(NRF-2013-R1A6A3A04063769). 본 연구는 충남대학교 자체연구(CNU 학술연구지원사업)에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Aengwanich W, Suttajit M 2010 Effect of polyphenols extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on physiological changes, heterophil/lymphocyte ratio, oxidative stress and body weight of broilers (*Gallus domesticus*) under chronic heat stress. Animal Science Journal 81(2): 264-270.

Bendall J, Swatland H 1988 A review of the relationships of ph with physical aspects of pork quality. Meat Science 24 (2):85-126.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A 1997 The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. General Pharmacology. The Vascular System 29(3):315-331.

Blois, MS 1958 Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1199-1200.

Bonnet S, Geraert P, Lessire M, Carre B, Guillaumin S 1997 Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. Journal of Poultry Science 76(6):857-863.

Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C 1995 Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 28(1):25-30.

Brewer MS, Ikins W, Harbers C 1992 Tba values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long term frozen storage: Effects of packaging. Journal of Food Science 57(3):558-563.

Chen J, Tellez G, Richards JD, J Escobar 2015 Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. Frontiers in Veterinary Science 2:14.

Cummins PM 2012 Occludin: One protein, many forms. Molecular and Cellular Biology 32(2):242-250.

Deng W, Dong X, Tong J, Zhang Q 2012 The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. Journal of Poultry Science 91(3):575-582.

Deyhim F, Teeter R 1991 Research note: Sodium and potassium chloride drinking water supplementation effects on acid-base balance and plasma corticosterone in broilers reared in thermoneutral and heat-distressed environments. Journal of Poultry Science 70(12):2551-2553.

Frei B, Higdon JV 2003 Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: Evidence from animal studies. The Journal of Nutrition 133(10):3275S-3284S.

Gokce R, Akkus IM, Yontem M, Ay M, Gurel, Caglayan O, Bodur S, Ergun S 2000 Effects of dietary oils on lipoproteins, lipid peroxidation and thromboxane A2 production in chicks. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 24(5):473-478.

Halliwell B 1994 Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? The Lancet 344 (8924):721-724.

Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ 2000 Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. Cardiovascular Research 47(3):549-555.

Lambert G, Gisolfi CV, Berg DJ, Moseley PL, Oberley LW, Kregel KC 2002 Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. Journal of Applied Physiology 92(4): 1750-1761.

Lauridsen C, Nielsen JH, Henckel P, Sørensen MT 1999 Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper. Journal of Animal Science 77(1):105-115.

Lin H, Decuypere E, Buyse J 2006 Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 144(1):11-17.

Liu L, He J, Xie H, Yang Y, Li J, Zou Y 2014 Resveratrol induces antioxidant and heat shock protein mRNA expression in response to heat stress in black-boned chickens. Journal of Poultry Science 93(1):54-62.

Mahmoud K, Beck M, Scheideler S, Forman M, Anderson K, Kachman S 1996 Acute high environmental temperature and calcium-estrogen relationships in the hen. Journal of Poultry Science 75(12):1555-1562.

Mahmoud UT, Abdel-Rahman MAM, Darwish MHA, Applegate TJ, Cheng H-w 2015 Behavioral changes and feathering score in heat stressed broiler chickens fed diets containing different levels of propolis. Applied Animal Behaviour Science 166:98-105.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ 1995 Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine 19(2):227-250.

Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH 1997 Factors influencing the structure and function of the small intestine in

the weaned pig: A review. Livestock Production Science 51(1):215-236.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G 1997 Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2(4): 152-159.

Rubiolo J, Vega F 2008 Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. Biomedicine & Pharmacotherapy 62(9):606-612.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA 2007 A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. The Journal of Nutritional Biochemistry 18(9):567-579.

Smecuol E, Bai JC, Vazquez H, Kogan Z, Cabanne A, Niveloni S, Pedreira S, Boerr L, Mauriño E, Meddings JB 1997 Gastrointestinal permeability in celiac disease. Gastroenterology 112(4):1129-1136.

Smith M 2003 Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. Journal of Poultry Science 82(10):1580-1588.

Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, Shi B, Zou XT 2014 Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. Journal of Poultry Science 93(3): 581-588.

Srilatha T, Redely V, Qudratullah S, Raju M 2010 Effect of alpha-lipoic acid and vitamin e in diet on the performance, antioxidation and immune response in broiler chicken. Int Journal of Poultry Science 9:678-683.

Sturniolo GC, Fries W, Mazzon E, Di V Leo, Barollo M, D'inca R 2002 Effect of zinc supplementation on intestinal permeability in experimental colitis. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 139(5):311-315.

Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A 2011 Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. Journal of Poultry Science 90(3):566-578.

Witte VC, Krause GF, Baley ME 1970 A new extraction method for determining 2 thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. Journal of Food Science 35(5): 582-585.

Zhang B, Guo Y 2009 Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. British Journal of Nutrition 102(5):687-693.

Received Jan. 18, 2016, Revised Feb. 4, 2016, Accepted Feb. 19, 2016