

최 종 보 고 서

최 종  
연구보고서

해조류 중 갈조류를 이용한 면역기능성  
사료첨가제 개발 연구

Studies on Immunological Bioactivities of Brown Marine  
Algae and Their Immunoregulator Extracts and  
Their Utilization for Animal Feeding

건국대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “해조류 중 갈조류를 이용한 면역기능성 사료첨가제 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 27일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 강창원

세부연구책임자 : 허 역

세부연구책임자 : 박근규

연 구 원 : 황성구

연 구 원 : 심재민

연 구 원 : 김은집

연 구 원 : 권순관

연 구 원 : 장성호

연 구 원 : 김성권

# 요 약 문

## I. 제 목

해조류 중 갈조류를 이용한 면역기능성 사료첨가제 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 해조류 중 갈조류로부터 분리한 여러 종류의 면역활성물질의 약리적 효능과 면역학적 작용기전을 규명하고 이를 가축용 면역기능성 첨가제 개발 및 사료제조공정을 개발하여 면역기능성 첨가사료가 가축의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 평가함

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 추출 및 면역활성 연구
  - 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성물질의 분리조건 확립 및 1차 면역기능성물질(BAIA-I) 분리 및 면역활성 검사
  - 면역기능성 물질의 부분정제(2차 단계 물질 분리) 및 부분 정제된 면역기능성물질(BAIA-II)의 면역활성효과 검사
  - 부분 정제된 면역기능성물질 중 면역효과가 탁월한 물질(BAIA-III) 분리(3차 단계 물질 분리), 정제 및 화학적 동정
  
- 해조류 중 갈조류 및 면역기능성물질 추출부산물 첨가 사료의 제조 및 산업화
  - 해조류 중 갈조류의 사료가치 분석 및 안정성 분석
  - 축종별 사양실험에 적용할수 있도록 기초자료로 제공
  - 면역기능성물질 추출부산물에 대한 생체 이용성을 평가하여 사료 첨가제로서의 이용성 조사

- 갈조류로부터 면역기능성 추출부산물과 면역기능성 추출물질을 첨가한 실험사료를 다양한 형태로 가공하여 가공사료로서의 이용 가능성 조사
  - 최적의 생산공정을 개발하기 위해 실제 사료생산 현장에서 다양한 조건하에서 해조류 추출부산물 첨가사료를 반복 제조 및 다량 생산을 위한 제반연구를 통한 산업화
- 해조류 중 갈조류 및 면역기능성물질 첨가사료의 가속내병성 및 생산성 연구
    - 해조류 중 감태의 첨가가 육계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구
    - 해조류 중 감태로부터 면역기능성 추출부산물의 첨가가 산란계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구
    - 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 추출물질 첨가가 돼지의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 해조류 중 갈조류 추출물인 BAIA-II와 BAIA-III는 독성이 없는 좋은 면역증강제로서 작용을 보이므로 면역기능성 동물사료 첨가제, 동물용 adjuvant, 면역약리 의약품 등에 이용가능성을 제시하고 있고, 또한 현존의 부작용이 많은 면역증강제로 인한 문제들을 보완 해결하는데 일부 분이나마 기여하기를 기대한다.
- 3종의 갈조류 즉, 감태, 다시마, 툇 및 감태부산물은 다양한 영양성분을 갖고 있으면서 수산물 중금속 잔류 허용량에 있어서 안전한 사료 원료로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 다만, 감태와 감태부산물은 에너지와 아미노산의 생체이용률이 낮기 때문에 정확한 이용률 평가가 필요하다.
- 감태부산물과 감태에서 추출한 면역기능성 물질의 육계사료 내에 첨가하

여 크립블 및 펠렛 사료 가공시 생산성이나 제조 품질에 큰 차이가 나타나지 않았다.

- 감태에서 추출한 면역기능성 물질은 여러 축종에 사용되고 있으며, 다양한 여러 가지 조건에서 가공특성을 조사한 결과에서도 생산성이나 제조 품질에 큰 변화를 나타내지 않아 산업화의 가능성이 있을 것으로 판단된다. 추후 여러 사료회사와의 연계를 통한 면역 능력 강화 및 생산성 증진을 위한 사료 첨가제로의 산업화가 이루어져야 한다.
- 감태, 감태부산물 및 감태에서 추출한 면역기능성 물질을 각각 육계, 산란계, 돼지 사료 내에 첨가하여 가축의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사한 결과 감태와 감태부산물은 안전하고 환경친화적이며 부존자원을 활용한 경제적인 원료로서 인정되었으며, 감태부산물과 감태에서 추출한 면역기능성 물질은 가축의 면역능을 강화시키고 저비용의 무항생제 축산물의 생산이라는 측면에서 훌륭한 사료 자원이라고 생각된다.
- 따라서, 본 연구는 당초의 연구 목표를 충분히 달성하였다고 판단되면 추후 학술지와 세미나 발표 및 논문화 등의 방법으로 연구 결과를 발표하고 산업현장에 보급할 예정이다. 그러나 다양한 갈조류를 통한 반복된 가축의 생산성 실험을 통한 적정 수준과 다양한 방법을 통한 가축의 면역반응에 미치는 효과에 대한 정확한 기전에 대한 추가적인 연구가 요망된다.

# SUMMARY

## I. Title

Studies on Immunological Bioactivities of Brown Marine Algae and Their Immunoregulator Extracts and Their Utilization for Animal Feeding

## II. Objective and Importance

The studies were made to investigate pharmacological characterizations and immunological mechanisms of brown marine algae abundant in Korea and their immunoregulator extracts in chicken and hog and thus to utilize them for animal feeding as immunocompetent feed additives

## III. Procedures

- Extraction of immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of its immune action
  - To investigate optimum conditions for extraction of immunoagent from brown marine algae and to examine their immunocompetencies
  - To separate immunoagent from the extractants and examine their immunocompetencies
  - To investigate physicochemical characterizations and mechanism of immunobiological activities of the extracts
  
- Utilization of brown marine algae and their extract residue for animal feeding
  - To determine nutritional compositions and stabilities of brown

- marine algae
- To examine feeding values of the algae and their extract residue
  - To evaluate bioavailabilities of nutrients in the algae and extract residue
  - To examine physical characteristics of the algae, immunoregulator extract residue and extracts for feed manufacturing
  - To examine the effects of dietary supplementation of the immunoregulator extract residue and extracts on feed qualities
- Effects of dietary supplementation of brown algae and their extracts on immunocompetences and animal performances
    - To investigate dietary effects of *Ecklonia cava* on immunocompetences and performances in broiler chickens
    - To investigate dietary effects of *Ecklonia* residues on immunocompetences and performances in laying hens
    - To investigate dietary effects of immunoregulator extracts on immunocompetences and performances in hogs

#### IV. Results

Brown algae grow abundantly along the coast of Korean peninsula, of which some algae such as *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme* are used for human consumption, others such as *Ecklonia cava kjellman* are inedible and wasted. However, algae in general are known to have immunoregulator substances such as lectins. The lectin has been reported by researchers to be a glycoprotein and to be able to protect a plant from bacteria, molds and some insects. Therefore, it is also called a defence molecule.

Therefore, the objectives of present studies were to investigate immunological characterizations of brown algae and their extracts and thus

to utilize them for animal feeding as immunocompetent feed additives.

I. Extraction of immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of it's immune action

A large amount of research work have been done on physicochemical properties immunopharmacological mechanisms and functions of immunoregulator(lectins) of land plants. However, studies on those of marine algae lectins are very limited. Therefore, lectins were extracted from brown marine algae harvested from the coast of korean peninsular and their immunological actions were studied.

1. Among the crude immunoagents(BAIA-I) extracted from brown algae (*Hizikia fusiforme*, *Sargassum fulvellum*, *Ecklonia cava*) of sea weeds, BAIA-I from *Hizikia fusiforme* had the highest immune effect on macrophages.

2. In the hemagglutination examination of BAIA-I, it had much higher lectin function at non-heating state than at heating state.

3. By means of electrophoresis, BAIA-II had broad molecular range of proteins. In reduced state of electrophoresis BAIA-III had two molecular weight proteins (32 kD and 33kD), but in non-reduced state it had 65kD protein.

4. All of BAIA-I, BAIA-II, and BAIA-III had the effect of agglutinin, Especially BAIA-III had the highest agglutinin action among them. Minimum dose of BAIA-III for the B type RBC agglutination was 2.5 $\mu$ g/ml. RBC agglutination effect of BAIA-III was inhibited by galactose, N-acetylgalactosamine, and mannose, suggesting that BAIA-III might be



the galactose, N-acetylgalactosamine, and mannose specific lectin.

5. All of BAIA-I, BAIA-II, and BAIA-III induced the macrophages to release tumor necrosis factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$ , suggesting that all of them might be used as immunoagent.

6. Final refined extract from brown algae, BAIA-III induced the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  mRNA from macrophages, confirming induction effect on tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  from the macrophages.

7. BAIA-III activated the macrophages to release Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6, suggesting that BAIA-III might be used as gut associated immunoagent.

8. BAIA-III had not both cytotoxic effect on splenocytes and inhibitory effect of body weight increment in mice

As results, BAIA-III extracted from brown algae of sea plants might be a lectin having immune function, suggesting that it might be used for the immune functional feed add and immunopharmaceutical drug for animals.

## II. Utilization of brown marine algae and their immunoregulator extract residues for animal feeding

Nutritional values of air-dried *Ecklonia cava kjellman*(EC) and immunoregulator extracted residues(IEEC) were evaluated by analyzing chemical compositions and determining the true metabolizable energy (TME), nitrogen corrected TME (TME<sub>n</sub>) and true available amino acid

(TAAA) contents. According to the chemical analysis, the EC contained on the average 10.29% of crude protein, 0.73% of ether extract, 34.41% of crude fiber, 27.23% of ash, 10.61% of NaCl and 54.82% of KOH solubility as fed basis. IEEC contained 13.83% of crude protein, 0.43% of ether extract, 10.85% of crude fiber, 16.87% of ash, 1.11% of NaCl and 23.4% of KOH solubility(as fed basis). The value of TME and TME<sub>n</sub> for EC determined by force-feeding 24 roosters (ISA-Brown) were 1,849 kcal/kg and 1,577 kcal/kg, respectively. The average values of TME and TME<sub>n</sub> for IEEC were 1,190 kcal/kg and 996 kcal/kg on dry matter basis, respectively. The average TAAA values of 13 amino acids for EC and IEEC measured by the force-feeding technique were 31.99% and 11.72%, respectively. EC contained 99.6 mg/kg of vitamin E, 56.3 mg/kg of vitamin B<sub>2</sub>, 7,658 mg/kg of Mg and 2.0 mg/kg of Cd. Cr was not detected. These values were used for formulating experimental diets containing various levels of EC and IEEC for broiler chicks and laying hens.

### III. Effects of dietary brown marine algae and their extracts on immunocompetences and performances in monogastric animals.

The first experiment was conducted to examine the effects of dietary EC on the growth performance, relative organ weight, meat quality and mortality after *Salmonella* challenge at 37 day of age in broiler chicks fed four different diets containing 0, 0.1, 1.0 and 3.0% EC for 4 weeks. A total of two hundreds twenty-five 1 day old male broiler chicks (Ross) were randomly divided into 4 groups of 20 birds each. The inclusion of EC into broiler chick diets at 1.0 and 3.0% level significantly ( $P<0.05$ ) improved daily feed consumption. Daily weight gains were significantly ( $P<0.05$ ) improved at all the treatment levels of dietary EC. The inclusions of EC into broiler chick diets did not affect the meat quality parameters (cooking loss, shear force value, meat color, flavour, taste, tenderness and juiciness),

relative organ weight, and mortality after *Salmonella* challenge. None of the meat quality parameters and relative organ weights in broiler chicks examined were affected by the EC inclusion indicating that EC can be added into broiler feed up to 3% without any adverse effect, if its nutritional values are well evaluated prior to use.

The second experiment was carried out to assess the effects of IEEC inclusion into laying hen (Hy-Line Brown variety) diet on laying performances, egg quality, blood parameters of GOT, GPT and cholesterol, relative organ weights, and TNF- $\alpha$  and mortality after *Salmonella* challenge at 39 day old.

A total of sixty-four 37 week old laying hens were divided randomly into 4 groups of 16 birds each and assigned to four experimental diets containing 0, 0.1, 1.0 and 3.0% IEEC for 4 weeks. The inclusion of IEEC into laying hen diets at 0.1 and 1.0% levels did not affect egg production rate, but the rate was significantly ( $P<0.05$ ) decreased at 3.0% of IEEC diet. Egg weight tended to decrease slightly in laying hens fed IEEC compared to the control diet without significant difference but egg mass were significantly ( $P<0.05$ ) decreased. The dietary incorporation of IEEC did not affect egg shell strength, egg shell thickness, Haugh unit, yolk color, total lipid and cholesterol contents and fatty acid profile in egg yolk. Relative organ weights and mortality after *Salmonella* challenge for 39 day old laying hens were significantly ( $P<0.05$ ) lowered by the supplementation of IEEC at 3.0% level. The concentrations of TNF- $\alpha$  in serum were rapidly increased in accordance with the level of IEEC. These results suggest that IEEC can be used as a feed additive for enhancement of immunocompetence and productivity without any adverse effects.

The third experiment was conducted to investigate dietary effects of immunoregulator extracts from brown algae(IEBA) on immunocompetences and performances in pigs. A total of 180 pigs(90 males, 90 females) with average body weight of 12.25 kg/pig were assigned to 3 treatments with 3

replicates of 20 pigs each. They were fed 0, 0.1, and 0.3% IEBA diets for 30 days and vaccinated against PRRS(porcine reproductive and respiratory syndrome), APP(*actinobacillus pleuropneumoniai*), AR(atrophic rhinitis) according to their dosage directions.

Significant differences were not observed in the average values of growth rate, feed intake and feed conversion rate among the treatments during the experimental period. Blood measurements of glucose, GOT, GPT, triglyceride, cholesterol, BUN, Ca and P were not significantly different among the treatments. However, examination of immunocompetence by blood test revealed that IL-1 $\beta$  was significantly activated at 0.3% IEBA group(P<0.05). The results indicate that IEBA can be utilized as a feed additive for immunocompetence in pigs.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Research Objectives and Justification</b> .....	24
I . Research Objectives .....	24
II . Research Justification .....	24
III. Research Contents and Range .....	26
1. Extraction of immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of it's immune action .....	26
2. Utilization of brown marine algae and their immunoregulator extracts for animal feeding .....	26
3. Effects of dietary brown marine algae and their extracts on immunocompetences and performances in monogastric animals .....	27
<b>Chapter 2. Extraction of immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of it's immune action</b> .....	29
I . Overview .....	29
II. Technique establishment for the extraction of a crude immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of it's immune action .....	31
1. Materials and methods .....	31
2. Results and discussion .....	35
III. Extraction of a partial refined immunoagent from brown algae of sea weeds and the study of it's immune action .....	42
1. Materials and methods .....	42

2. Results and discussion .....	48
IV. Extraction of the refined immunoagent from brown algae of sea weeds, and the study of it's chemical character and immune action .....	53
1. Materials and methods .....	53
2. Results and discussion .....	61
V. Abstract .....	72
VI. References .....	74
<b>Chapter 3. Utilization of brown marine algae and their immunoregulator extract residues for animal feeding .....</b>	<b>78</b>
I. Studies on nutritional values of brown marine algae .....	78
1. Overview .....	78
2. Materials and methods .....	80
3. Results and discussion .....	85
4. Abstract .....	98
5. References .....	99
II. Investigationd of feeding values and physical properties of <i>Ecklonia</i> residues and immunoregulator extracts for feed manufacturing .....	102
1. Overview .....	102
2. Materials and methods .....	104
3. Results and discussion .....	110
4. Abstract .....	126
5. References .....	127

**Chapter 4. Effects of dietary brown marine algae and their extracts on immunocompetences and performances in monogastric animals ..... 129**

I. Dietary effects of *Ecklonia cava* on immunocompetences and performances in broiler chickens ..... 129

1. Overview ..... 129

2. Materials and methods ..... 132

3. Results and discussion ..... 137

4. Abstract ..... 144

5. References ..... 145

II. Dietary effects of *Ecklonia* residues on immunocompetences and performances in laying hens ..... 148

1. Overview ..... 148

2. Materials and methods ..... 149

3. Results and discussion ..... 155

4. Abstract ..... 165

5. References ..... 166

III. Dietary effects of immunoregulator extracts on immunocompetences and performances in hogs ..... 169

1. Overview ..... 169

2. Materials and methods ..... 170

3. Results and discussion ..... 177

4. Abstract ..... 185

5. References ..... 187

# 목 차

제 1 장 연구개발의 목적과 필요성 .....	24
제 1 절 연구개발의 목적 .....	24
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	24
제 3 절 연구개발의 내용과 범위 .....	26
1. 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 추출 및 면역활성 연구 ..	26
2. 해조류 중 갈조류, 면역기능성 추출부산물 및 면역기능성 추출물질 첨 가 사료의 제조 및 산업화 연구 .....	26
3. 해조류 중 갈조류, 감태부산물 및 면역기능성 추출물질 첨가 사료의 가축 생산성 및 내병성 연구 .....	27
제 2 장 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 추출 및 면역활 성 연구 .....	29
제 1 절 서 론 .....	29
제 2 절 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 분리 조건 확립과 1차 기능성물질(BAIA-I) 분리와 면역활성 검사 .....	31
1. 재료 및 방법 .....	31
2. 결과 및 고찰 .....	35
제 3 절 해조류 중 갈조류로부터 면역활성 기능성 물질의 부분정제 (BAIA-II) 및 면역 활성효과 검사 .....	42
1. 재료 및 방법 .....	42
2. 결과 및 고찰 .....	48



제 4 절	해조류 중 갈조류로부터 부분정제된 기능성물질 중 면역효과가 탁월한 물질(BAIA-III) 분리와 정제, 화학적 동정 .....	53
1.	재료 및 방법 .....	53
2.	결과 및 고찰 .....	61
제 5 절	적 요 .....	72
제 6 절	참고문헌 .....	74
<b>제 3 장</b>	<b>해조류 중 갈조류 및 면역기능성 추출부산물의 첨가사료의 제조 산업화 연구</b> .....	<b>78</b>
제 1 절	해조류 중 갈조류의 영양적 가치에 관한 연구 .....	78
1.	서론 .....	78
2.	재료 및 방법 .....	80
3.	결과 및 고찰 .....	85
4.	적요 .....	98
5.	참고문헌 .....	99
제 2 절	감태부산물과 감태의 면역기능성 추출물질의 영양적 가치와 사료의 가공 특성 조사 .....	102
1.	서론 .....	102
2.	재료 및 방법 .....	104
3.	결과 및 고찰 .....	110
4.	적요 .....	126
5.	참고문헌 .....	127

제 4 장	해조류 중 갈조류 및 편역기능성물질 첨가사료의 가축 내병성 및 생산성 연구 .....	129
제 1 절	절 감태의 사료 내 첨가가 육계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향 .....	129
1.	서 론 .....	129
2.	재료 및 방법 .....	132
3.	결과 및 고찰 .....	137
4.	적요 .....	144
5.	참고문헌 .....	145
제 2 절	절 감태 부산물의 사료 내 첨가가 산란계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향 .....	148
1.	서 론 .....	148
2.	재료 및 방법 .....	149
3.	결과 및 고찰 .....	155
4.	적요 .....	165
5.	참고문헌 .....	166
제 3 절	편역기능성 추출물질의 사료 내 첨가가 돼지의 생산성 및 내병성에 미치는 영향 .....	169
1.	서 론 .....	169
2.	재료 및 방법 .....	170
3.	결과 및 고찰 .....	177
4.	적요 .....	185
5.	참고문헌 .....	187

## List of Table

Table 1. Primers used in RT-PCR for the TNF- $\alpha$ mRNA .....	58
Table 2. Primers used in RT-PCR for the IL-1 $\beta$ mRNA .....	59
Table 3. The effect of BAIA-III on B type RBC agglutination .....	63
Table 4. The blocking effect of sugars on hemagglutination by BAIA-III .....	64
Table 5. Nutritional value, KOH solubility and gross energy of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> and <i>Hizikia fusiforme</i> (as fed basis) .....	86
Table 6. Vitamin contents of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> and <i>Hizikia fusiforme</i> (as fed basis) .....	88
Table 7. Pigment contents of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> and <i>Hizikia fusiforme</i> (as fed basis) .....	88
Table 8. Mineral contents of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> and <i>Hizikia fusiforme</i> (as fed basis) .....	89
Table 9. Fatty acid compositions of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> , and <i>Hizikia fusiforme</i> .....	91
Table 10. Energy values of <i>Ecklonia cava</i> (dry matter basis) .....	93
Table 11. Amino acid composition of <i>Ecklonia cava</i> , <i>Kjellmaniella crassifolia</i> and <i>Hizikia fusiforme</i> (as fed basis) .....	94
Table 12. Amino acid composition and true amino acid availability of <i>Ecklonia cava</i> (as fed basis) .....	95
Table 13. Particle size and bulk specific weight of <i>Ecklonia cava</i> .....	97
Table 14. Nutritional value, KOH solubility and gross energy of <i>Ecklonia</i> residue and Immunoregulator .....	111
Table 15. Energy values of <i>Ecklonia</i> residue(dry matter basis) .....	112
Table 16. Amino acid composition of <i>Ecklonia</i> residue and Immunoregulator(as fed basis) .....	114
Table 17. Amino acid composition and true amino acid availability of <i>Ecklonia</i> residue(as fed basis) .....	115

Table 18. Particle size and bulk specific weight of <i>Ecklonia</i> residue	117
Table 19. Particle size and bulk specific weight of Immunoregulator	118
Table 20. Dietary <i>Ecklonia</i> residue supplementation on the production per hour and bulk specific weight of crumble	120
Table 21. Dietary <i>Ecklonia</i> residue supplementation on the particle size test of crumble	120
Table 22. Dietary Immunoregulator supplementation on the production per hour and bulk specific weight of crumble	121
Table 23. Dietary Immunoregulator supplementation on the particle size test of crumble	121
Table 24. Dietary <i>Ecklonia</i> residue supplementation on the processing characteristic of pellet	123
Table 25. Dietary Immunoregulator supplementation on the processing characteristic of pellet	123
Table 26. The composition of experimental diet for broilers	136
Table 27. Effect of dietary supplementation of <i>Ecklonia cava</i> on performance of broiler chicks	138
Table 28. Effect of dietary supplementation of <i>Ecklonia cava</i> on relative organ weight of broiler chicks	139
Table 29. Effects of dietary supplementation of <i>Ecklonia cava</i> on meat quality in broiler chicks	140
Table 30. Effects of dietary supplementation of <i>Ecklonia cava</i> on microflora in broiler chicks litters	141
Table 31. Effects of dietary <i>Ecklonia cava</i> on relative organ weights and mortality after 7 days of <i>Salmonella</i> challenge in broiler chicks	143
Table 32. The composition of experimental diet for laying hen	154
Table 33. Effects of dietary <i>Ecklonia</i> residue on feed intake, egg production, egg weight and egg mass in laying hens	156
Table 34. Effects of dietary <i>Ecklonia</i> residue on eggshell strength,	

eggshell thickness, yolk color and Haugh Unit in laying hens .....	157
Table 35. Influence of <i>Ecklonia</i> residue on the total lipid of egg yolk .....	158
Table 36. Influence of dietary <i>Ecklonia</i> residue on the fatty acid composition of egg yolk lipid .....	159
Table 37. Effects of dietary <i>Ecklonia</i> residue on plasma GOT, GPT, total lipid and total cholesterol in laying hens .....	160
Table 38. Effects of dietary <i>Ecklonia</i> residue on relative liver and spleen weights, TNF- $\alpha$ and mortality after 7 days of <i>Salmonella</i> challenge in laying hens1 .....	163
Table 39. Dietary compositions for the weaned pigs experiment .....	176
Table 40. Effect of dietary supplementation of Immunoregulator on performance of weaned pigs .....	178
Table 41. Effects of dietary Immunoregulator on plasma Glucose, GOT, GPT, total lipid, total cholesterol, triglyceride, BUN, Ca and P in weaned pigs .....	180
Table 42. Effects of dietary Immunoregulator on serum APP5, PmA and PmD in weaned pigs .....	182
Table 43. Effects of dietary Immunoregulator on plasma TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ in weaned pigs .....	184

## List of Figure

Figure 1. TNF- $\alpha$ production in heating BAIA-I stimulated M $\phi$ . 5 $\mu$ g and 50 $\mu$ g represent for 5 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, respectively .....	36
Figure 2. TNF- $\alpha$ production in non-heating BAIA-I stimulated M $\phi$ . 50 $\mu$ g expresses 50 $\mu$ g/ml .....	36
Figure 3. IL-1 $\beta$ production in heating BAIA-I stimulated M $\phi$ . 5 $\mu$ g and 50 $\mu$ g represent for 5 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, respectively .....	38
Figure 4. IL-1 $\beta$ production in non-heating BAIA-I stimulated M $\phi$ . 50 $\mu$ g expresses 50 $\mu$ g/ml .....	38
Figure 5. The cytotoxic effect of saline (control) and BAIA-I stimulated .. splenocytes measured by means of MTT method. 50 $\mu$ g .....	39
Figure 6. The cytotoxic effect of saline (A) and BAIA-I stimulated .. splenocytes detected by light microscope .....	40
Figure 7. The effect of Korean Sea-Weed extracts on agglutination of .. RBC. (A,A'), (B,B'), (C,C'), (D,D'), (E,E'), (F,F') express 1, 2, 4, 8, 16, 32 multiple dilution .....	41
Figure 8. SDS-PAGE of brown algae extracts, BAIA-II. ST represents .. the marker of standard proteins .....	48
Figure 9. The chromatogram for the BAIA-II at 280 nM UV detector .....	49
Figure 10. The dose dependent effect of BAIA-II on agglutination of B .. type RBC. The doses are 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu$ g/ml .....	50
Figure 11. The effect of BAIA-II on TNF- $\alpha$ release from macrophage. by means of ELISA technique .....	50
Figure 12. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS .. and BAIA-II stimulated macrophage using polyclonal antibody .. of rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ . M represents marker for TNF- $\alpha$ .....	51

Figure 13. The effect of BAIA-II on IL-1 $\beta$ release from macrophage by means of ELISA technique .....	52
Figure 14. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS ... and BAIA-II-treated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$ . M represents marker for IL-1 $\beta$ .....	52
Figure 15. SDS-PAGE of brown algae extract, BAIA-III, A and B .....	
represent the reduced (with mercaptoethanol) and non-reduced condition (without mercaptoethanol), respectively .....	61
Figure 16. The chromatogram for BAIA-III at 280 nM UV detector .....	62
Figure 17. The dose dependent effect of Immun- $\alpha$ ( $\alpha$ ) and Immun- $\beta$ ( $\beta$ ) on agglutination of B type RBC. The doses are 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	63
Figure 18. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS, ... BAIA-III stimulated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ . M represents marker for TNF- $\alpha$ .....	65
Figure 19. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS, ... BAIA-III stimulated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$ . M represents marker for IL-1 $\beta$ .....	66
Figure 20. RT-PCR for mRNAs of the TNF- $\alpha$ and $\beta$ -actin obtained .....	
BAIA-III treated macrophages .....	67
Figure 21. RT-PCR for mRNAs of the IL-1 $\beta$ and $\beta$ -actin obtained .....	
BAIA-III treated macrophages .....	67
Figure 22. The effect of BAIA-III on interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) release from IEC-6 cells .....	68
Figure 23. The effect of BAIA-III on IL-6 release from IEC-6 cells .....	69
Figure 24. The cytotoxic effect of medium alone and BAIA-III (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) -stimulated splenocytes .....	70
Figure 25. The effect of saline and BAIA-III on the body weight of mature mouse .....	71

Figure 26. Effects of dietary *Ecklonia* residue on TNF- $\alpha$  and mortality after 7 days of Salmonella challenge in laying hens ..... 164



## 제 1 장 연구개발의 목적과 필요성

### 제 1 절 연구개발의 목적

1. 해조류 중 갈조류로부터 분리한 여러 종류의 면역활성물질의 약리학적 효과와 면역학적 작용기전 구명
2. 다양한 갈조류의 영양학적 가치 평가 및 가축용 면역기능성 첨가제 개발과 사료제조 공정 개발
3. 갈조류 및 갈조류로부터 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가가 가축의 생산성 및 내병성에 미치는 영향 구명

### 제 2 절 연구개발의 필요성

1. 우리나라 축산업은 값비싼 사료비와 인건비뿐만 아니라 집약사육과 빈약한 양축 환경으로 연중 질병 발생율이 높고 이로 인한 무분별한 약제 남용은 가축의 내병성을 크게 떨어뜨릴 수 있으며 항생제 남용으로 축산물의 항생제 잔류로 인한 국민건강에 대한 위협을 줄 수 있으며, 유럽을 비롯한 축산 선진국에서는 항생제의 사용을 전면 금지 또는 엄격히 규제하고 있는 실정이므로 국내에 값이 싸고 원료공급이 풍부한 면역기능성 물질이 다량 함유한 해조류 중 갈조류 중에서 면역기능성 물질을 추출하여 사료 첨가제로 개발하고자 한다.
2. 현존하는 많은 기능성 물질들은 천연물로부터 유래하는데, 본 연구진의 예비 실험 결과 해조류에서 다량의 lectin과 polysaccharide가 검출되었고 이는 면역활성이 발견된 바, lectin이나 polysaccharide와 같은 면역기능성 물질의 면역활성 조절 작용을 체계적으로 연구 조사할 필요가 있다.

3. 국내 축산업은 질병 발생율이 높아 상당한 경제적 손실을 입고 있고 경영상의 어려움이 가중되고 있으며 따라서 가축의 면역 능력을 향상시키고 체내 대사를 활발히 촉진시킬 수 있는 기능성 성분을 중심으로 한 연구가 관심이 모아지고 있다. 이로 인한 면역 증강용 사료첨가제가 개발되면 양축업의 생산원가 절감과 생산성 향상으로 이 분야에서 국제 경쟁력의 확보가 가능하다.
4. 사료 첨가제 중 기능성 물질들은 대부분은 외국산으로 해외 의존도가 높는데, 해조류나 해조류에서 면역기능성 물질을 개발함으로써 부존자원의 활용과 수입 대체라는 효과를 얻을 수 있으며, 해조류 내에 다양한 영양성분들을 이용한 축산물에 대해 소비자들의 기호도를 충족시킬 수 있다.
5. 국내에서 연간 수집 가능한 갈조류의 총량은 약 20만톤으로 이로부터 면역기능성물질의 추출 수율은 5%로써 10,000톤의 면역기능성 물질을 얻을 수 있다. 추출 정제된 면역기능성 물질의 판매가격을 약 4,000원/kg 정도로 예상하였을 때, 갈조류 20만톤으로부터 연간 400억의 매출을 올릴 수 있게 된다. 또한 갈조류로부터 추출한 면역기능성 추출물질의 부산물 또한 사료의 부원료로서 사용가능할 것으로 예상되어 경제적 이익은 면역기능성 추출물질로 인한 이익 이상이 될 것이다.
6. 오래전부터 건강식으로 막연하게 이용하고 있는 해조류에 대한 생리적 기전과 효과를 영양학적·임상면역학적인 측면에서 일반에게 알릴 수 있다.
7. 항생물질에 오염되지 않은 고품질, 청정 축산물의 생산은 축산물의 소비 확대 측면에서 중요한 요소이며, 해조류로부터 추출한 면역기능성 물질이 항생제를 대체할 수 있다면 가축의 건강상태의 증진과 생리적 기능의 향상으로 고품질의 축산물 생산이 가능 할 것이다.

### 제 3 절 연구개발의 내용과 범위

#### 1. 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 추출 및 면역활성 연구

##### 가. 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성물질의 분리조건 확립 및 1차 면역기능성물질 분리 및 면역활성 검사

- 1) 해조류 수집 및 건조보관
- 2) 추출용매 조건확립 및 추출공정개발
- 3) 1차 기능성물질 분리
- 4) 1차 추출물질의 세포독성검사
- 5) 면역세포의 면역활성검사

##### 나. 면역기능성 물질의 부분정제(2차 단계 물질 분리) 및 부분 정제된 면역기능성물질의 면역활성효과 검사

- 1) 면역기능성 물질의 부분정제(2차 단계 물질 분리)
- 2) 부분 정제된 기능성물질의 면역세포의 활성 조사

##### 다. 부분 정제된 면역기능성물질 중 면역효과가 탁월한 물질분리(3차 단계 물질 분리), 정제 및 화학적 동정

- 1) 면역기능성 물질의 정제(3차단계 물질분리)
- 2) 분리동정된 정제물질의 면역활성 효과 검사
- 3) 분리동정된 정제물질의 독성검사

#### 2. 해조류 중 갈조류 및 면역기능성물질 추출 부산물 첨가 사료의 제조 및 산업화

##### 가. 해조류 중 갈조류의 사료가치 분석 및 안정성 분석

- 1) 갈조류의 영양성분 분석
- 2) 갈조류의 중금속 분석
- 3) 갈조류의 건조 및 분쇄에 따른 물리적 변화조사

- 나. 축종별 사양실험에 적용할수 있도록 기초자료로 제공
- 1) 갈조류 중 감태를 가지고 중계수탉을 이용한 대사에너지 및 아미노산 이용율 조사
- 다. 면역기능성물질 추출부산물에 대한 생체 이용성을 평가하여 사료 첨가제로서의 이용성 조사
- 1) 감태부산물의 일반성분 분석
  - 2) 감태부산물을 가지고 중계수탉을 이용한 대사에너지 및 아미노산 이용율 조사
- 라. 갈조류로부터 감태부산물과 면역기능성 추출물질을 첨가한 실험사료를 다양한 형태로 가공하여 가공사료로서의 이용 가능성 조사
- 1) 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 육계사료에 첨가하여 크럼블 및 펠렛 가공특성 조사
- 마. 최적의 생산공정을 개발하기 위해 실제 사료생산 현장에서 다양한 조건 하에서 해조류 추출부산물 첨가사료를 반복 제조 및 다량 생산을 위한 제반연구를 통한 산업화
3. 해조류 중 갈조류 및 면역기능성물질 첨가사료의 가축내병성 및 생산성 연구
- 가. 해조류 중 갈조류 첨가가 육계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구
- 1) 감태의 첨가가 육계의 생산성, 도체특성 및 장내 병변에 미치는 영향 조사
  - 2) 깔짚내 미생물 균총 검사 및 생산물의 관능검사
- 나. 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 추출부산물의 첨가가 산란계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구

- 1) 감태부산물의 첨가가 산란계의 생산성에 미치는 영향 조사
- 2) 감태부산물의 첨가가 산란계의 내병성에 미치는 영향 조사

다. 해조류 중 갈조류로부터 먼역기능성 추출물질 첨가가 돼지의 생산성 및 내병성에 미치는 영향에 관한 연구

- 1) 먼역기능성 추출물질의 첨가가 돼지의 생산성에 미치는 영향 조사
- 2) 먼역기능성 추출물질의 첨가가 돼지의 내병성에 미치는 영향 조사

## 제 2 장 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 추출 및 면역활성 연구

### 제 1 절 서 론

국민 식생활 패턴과 수준 향상으로 육류 수요가 급격히 늘고 있으나 국내 양축업을 통한 육류 공급량은 크게 늘지 않고 있는 실정이다. 이러한 원인에는 값비싼 사료비와 인건비 뿐만 아니라 집약사육과 빈약한 양축 환경으로 연중 질병 발생율이 높기 때문이다. 그리고, 무분별한 약제 남용은 가축의 내병성을 크게 떨어뜨릴 수 있으며 항생제 남용으로 국민건강에 대한 매우 큰 위협이 되고 있어 항생제 대체 물질의 개발이 시급하다. 더구나 유럽을 비롯한 축산 선진국들에서는 항생제의 사용이 전면 금지 또는 엄격히 제한되고 있으며, 이러한 규제가 가까운 장래에 우리에게도 적용될 것으로 이에 대한 대처방안이 절실히 필요하다. 또한 국내 축산업은 질병 발생율이 높아 상당한 경제적 손실을 입고 있으며 경영상의 어려움이 가중되고 있다. 따라서 가축의 면역능력을 향상시키고 체내 대사를 활발히 촉진시킬 수 있는 기능성 성분을 중심으로 하는 연구가 중요 연구분야로서 관심이 모아지고 있다.

갈조류(Brown algae; *Phaeophyta*)의 종류에는 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria*), 툫(*Hizikia fusiforme*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 감태(*Ecklonia cava*) 등이 있다. 갈조류에는 항산화 작용, 혈압 하강 및 고지혈증의 억제 작용, 변비의 예방 및 비만 억제, 및 항암작용이 있으며 특히, mineral과 요오드가 풍부하여 건강식품으로 개발 가능성이 매우 크다. 따라서, 건강식으로 막연하게 애용되어 오고 있는 해조류에 대한 생리적 기전과 효과를 영양학적, 임상면역학적인 측면에서 일반에게 알리며, 가축의 건강 상태의 증진으로 생리적 기능이 향상되고, 이는 고품질의 축산물 생산으로 연계될 것이다. 또한 항생물질에 오염되지 않은 고품질, 청정 축산물의 생산은 축산물의 소비 확대 측면에서도 중요한 요소가 될 것이다. 그러나, 사료 내에 첨가하는 기능성 첨가제의 대부분은 외국산으로 해외 의존도가 매우 높은 실정이다. 그러므로, 면

역 증강용 사료첨가제가 개발되면 양축업의 생산원가 절감 및 생산성 향상으로 이 분야에서의 국제경쟁력의 확보가 가능하다. 또한, 해조류 및 해조류 추출물을 첨가제로 개발 이용함으로써 부존자원의 활용과 수입 대체라는 효과를 얻을 수 있을 것이다. 따라서, 본 연구에서는 국내에서 값이 싸고 원료공급이 풍부하며, lectin을 다량 함유한 해조류 중 갈조류를 분리하여 면역기능성 사료첨가제로 개발하고자 한다.

## 제 2 절 해조류 중 갈조류로부터 면역기능성 물질의 분리 조건 확립과 1차 면역기능성 물질 (BAIA-I) 분리와 면역활성 검사

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 시약

세포배양을 위하여 배양액 RPMI-1640, fetal bovine serum, L-glutamine acid, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Culture plate인 96-well plate, 6-well plate, 250 ml flask와 각종 tube(15 ml, 50 ml)는 Falcon(Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  검사를 위한 ELISA kit와 rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ 항체, rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$ 항체, goat anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase는 Chemicon(Temecula, CA, USA)로부터 구입했다.

#### 2) 실험 동물

본 실험에서 사용된 macrophage의 추출을 위해 Balb/c 마우스를 사용하였다. Balb/c 마우스는 대한실험동물센터(음성대조군, 충북)로부터 분양 받아 항온 항습실에서 각종 실험을 위해 희생될 때까지 사육하였다. 항온 항습실의 조건은 온도 22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 습도 55 $\pm$ 5%, 조명 150 Lux 조건에서 사육하였다.

#### 3) 해조류 중 갈조류의 수집

갈조류는 남해안에서 직접 채취 수집하였다. 수집된 갈조류는 2일 동안 햇볕 건조하였고, 실험 전까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

#### 4) 갈조류로부터 1차 기능성 물질(BAIA-I) 추출방법

갈조류로부터 수용성 물질을 추출할 때, 열로 인해서 단백질 및 각종 물질들이 변성되는 것을 막기 위해 모든 추출과정이 cold room(4 $^{\circ}$ C)에서 수행



되었다. 4°C에 보관중인 갈조류 100 그램을 수돗물에 24시간 동안 cold room에서 배양하였다. 그 뒤 증류수로 행군 후, home mixer(솔잎 82, NUC, 대구)에 넣고 cold PBS를 첨가하면서 2.5 분씩 2회 잘게 부수었다. Homogenizer(dispenser, Jeil Scientific Inc. Co, Seoul)를 이용해 40 V의 속도에서 4 시간 동안 homogenizing한 후, 약 12 시간 동안(over night) cold room 탁상 위에 배양하면서 찌꺼기를 침전시켰다. 침전 후 녹갈색의 맑은 상층용액을 high speed centrifuge(Centrifon T-124, Kontron, Milano, Italy)를 이용해 12500 rpm(angle fixed rotor, 1500~2500 g), 30 min, 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리해서 얻은 상층액을 수집한 후 Whatman NO. 2(공극크기 8 $\mu$ m)로 여과한 후 NO. 5(공극크기 2.5 $\mu$ m)로 여과하여 deep freezer(Labconco, Kansa, MO, USA)에서 동결건조하여 갈색분말을 얻었으며, 이를 brown algae immune agent-I(BAIA-I)으로 칭하였다. 이 갈색분말을 효능검사, 성분분석, 등 각종 검사할 때까지 -20°C에 보관하였다.

##### 5) Mouse로부터 macrophage의 추출, 배양, 자극

Macrophage의 수를 증가시키기 위해 3% thioglycollate medium(Johnson et al., 1967)을 mouse 복강 내에 2 ml/mouse 투여하였다. 투여 3일 후 mouse를 경추 탈골시켜 RPMI-1640 medium 20 ml/mouse를 복강 내 주입해서 복강 삼출세포(peritoneal extract cell)를 수집하였다. 이 세포들을 500 $\times$ g에서 10분간 원심 분리한 후 pellet에 적혈구가 포함되어 있으면 0.2% hypotonic NaCl을 넣어 30 초동안 적혈구를 lysis한 후 1.6%의 NaCl용액을 첨가하여 0.9% isotonic NaCl을 만든 후 원심분리를 하여 lytic RBC를 제거하였다. 그 다음 RPMI-1640으로 24 well plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 macrophage를 plating하였다. 순수한 macrophage만을 모으기 위해 1 시간 정도 배양하고 2 회 washing한 후 complete RPMI-1640 (+L-glutamine, + penicillin-streptomycin,+fetal bovin serum)으로 3 일 동안 CO<sub>2</sub> incubator (NAPCO, Denmark)에서 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 조건으로 배양하였다.

갈조류에서 추출한 BAIA-I에 의한 macrophage 자극은 mouse로부터 추출 후 3 일간 배양한 후 각종 추출물로 자극하였다. 갈조류에서 추출한 물질에 의한 자극 전에 24 well plate를 incomplete RPMI medium으로 2 회 씻어

낸 후, serum free RPMI medium (+penicillin-streptomycin, + L-glutamine)을 1.5 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991; Jeffrey et al, 1990). 갈조류에서 추출한 물질을 각각(5 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml) designed 24 well에 첨가하여 8 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 자극시켰다. 각 세포들을 자극시켜 얻은 macrophage conditioned media(MCM)를 6 ml tube에 옮겨 ELISA로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 측정할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### 6) BAIA-I으로 자극된 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 분비 검사

본 실험은 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  test ELISA kit(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 검사하였는데, 간단히 설명하면 다음과 같다. TNF- $\alpha$  혹은 IL-1 $\beta$  standard solution과 MCM을 96 well(precoated with rat anti-mouse TNF- $\alpha$  혹은 IL-1 $\beta$ )에 100  $\mu$ l 넣었다. 그리고 난 뒤 primary antibody인 rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$  혹은 IL-1 $\beta$  25  $\mu$ l을 첨가하여 혼합한 뒤, room temp 에서 배양하였다. 배양한 후 second antibody인 50  $\mu$ l goat anti-rabbit conjugated alkaline phosphatase를 넣은 후 45 분간 배양하였다. 배양한 후 wash buffer(250  $\mu$ l/well)로 씻어낸 후, 여기에 color reagent를 넣고 각 well 별로 차별성이 있는 붉은 색깔이 나타나면 stop solution을 넣어 반응을 정지시켰다. 490 nm에서 ELISA reader(Bio-TEK; Winooski, Vermont, USA)로 측정하여 TNF- $\alpha$  혹은 IL-1 $\beta$  량을 분석하였다(Fomsgaard et al., 1988).

#### 7) BAIA-I의 세포독성 검사 위해 mouse로부터 splenocytes 추출

본 해조류 추출물이 면역활성에 지대한 효과가 있다해도 생체 내에 독성이 있으면 아니 되기에 세포 독성에 대한 안정성 검사를 위해 spleen cell를 추출하였다. 7주령인 Balb/c를 희생하여 비장을 추출하여 4 $^{\circ}$ C를 유지하면서 homogenizer( Wheaton, NJ, USA)로 비장을 분쇄 하였다. 분쇄할 때 사용한 배양액은 cold RPMI-1640(GibcoBRL, Grand Island, N.Y, USA)였으며, debris를 제거하기 위해 분쇄한 후 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 10min, 500 x g)하여 상층액을 수거하였다. 상층액에 오염된 RBC는 hypotonic sodium buffer를 사용하여 제거하였다. 최종처리 분리된 splenocytes을 96 well plate(FALCON, NJ, USA)에 plating한 후 각종 갈조류 추출물을 첨가(최종 농도 500  $\mu$ g/ml)한 후 24시간

배양한 후 세포독성을 MTT법으로 검사하였다. 그리고 세포의 형태 변화추세를 보기 위해 400배의 배율로 사진도 찍었다.

8) BAIA-I의 splenocytes 세포독성 검사

본 실험에서 splenocytes에 대한 viability와 세포독성은 MTT법에 의하여 실시하였다. MTT assay는 Francois 등(1986)이 실시했던 방법에 준하여 실시하였는데 간략히 설명하면 다음과 같다. 배양시간이 완료되면 MTT solution(1 mg/ml in HBSS ; SIGMA, St Louis, MO, USA)을 각 well당 50  $\mu$ l 씩 첨가하고 37°C에서 4 시간동안 다시 배양했다. 그후 원심분리(4°C, 10min, 500xg)한 후 배양 상등액은 모두 제거하고 침전되어 있는 불용성 formazan을 녹이기 위하여 dimethylsulfoxide(DMSO; SIGMA, St Louis, MO, USA)를 각 well당 100  $\mu$ l 씩 첨가한 후 15 분간 stirring하고 ELISA reader(Pharmasia, Sweden) 540 nm의 wavelength에서 흡광도(O.D)를 측정하여 다음과 같은 공식에 의해 % cytotoxicity와 viability(%)를 측정했다.

$$CYTOTOXICITY(\%) = \frac{O.D. CONTROLWELLS - ODTESTWELLS}{O.D. CONTROLWELLS} \times 100$$

$$VIABILITY(\%) = \frac{O.D. TESTWELLS}{O.D. CONTROLWELLS} \times 100$$

9) BAIA-I의 적혈구 응집반응 시험

갈조류에서 추출한 BAIA-I의 agglutinin으로서의 기능을 가지는지, 즉 렉틴(lectin)성분이 함유되어 있는지 알기 위해서 B형 적혈구 응집반응을 실시하였다. 응집반응 test는 B형 말초혈액 1 ml을 취하여 PBS에서 2%가 되게 현탁시킨 후, U-Type 96-well microtiter plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 연속적인 두 배 희석법으로 실시하였다. 갈조류에서 추출한 물질 BAIA-I과 B형 혈액을 96 well microtiter plate에서 1 시간 동안 배양하여 응집 정도를 관찰하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) BAIA-I의 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 분비효과

Macrophage는 면역작용에 관여하는 세포 중 주요한 항원제공세포이며, 또한 탐식세포이다. 그러기에 이 세포는 체액성 면역작용과 세포성 면역작용에 관여한다. 이 세포가 활성화되었을 때는 cytokine들이 분비되는데 이들 cytokine 중 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )가 대표적 cytokine이다 (Carswell et al., 1975; Goeddel et al., 1986; Wong and Goeddel, 1986; Duncombe et al., 1990). 어떠한 물질이 macrophages로부터 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 하면 이 물질을 면역 증강제라 칭해도 별 무리가 없다. 이러한 배경 위에 본 연구에서는 각 추출물에 의한 macrophage로부터 TNF- $\alpha$  분비 효능을 검사하였는데, 사료 가공 시 높은 열을 가한다는 것을 감안하여 열을 가하여 얻은 추출물이 TNF- $\alpha$  분비 능을 가지는 지를 알아보려고 하였고, 이와 더불어 non-heating 추출물의 TNF- $\alpha$  분비 능도 검사하였다.

실험결과 각 갈조류들로부터 얻은 heating 추출물들은 모두 TNF- $\alpha$  분비능 효과가 있었고, 톳이 가장 많은 TNF- $\alpha$ 를 분비하였다(Figure 1). 그리고 non-heating 추출물 중 톳이나 감태는 TNF- $\alpha$  분비능 효과를 보였으나 heating추출물의 TNF- $\alpha$  분비량보다 낮은 분비량을 보였으며, 모자반(듬북)에서는 non-heating 추출물 50 $\mu$ g/ml 농도로 자극 시켰음에도 불구하고 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비가 없었다(Figure 2). Macrophages로부터 TNF- $\alpha$  분비능 효과에서는 heating 추출물과 non-heating 추출물 양쪽 모두에서 TNF- $\alpha$  분비능 효과를 가지고 있으며, heating 추출물이 non-heating 추출물보다 더 좋은 TNF- $\alpha$  분비능을 보여 주고 있다(Figure 1, 2).

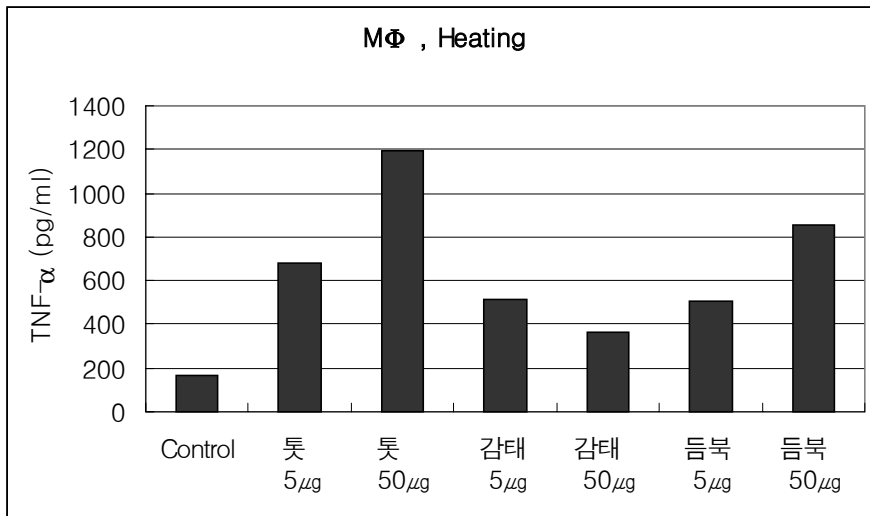


Figure 1. TNF-α production in heating BAIA-I stimulated MΦ. 5μg and 50μg represent for 5μg/ml, 50μg/ml, respectively.

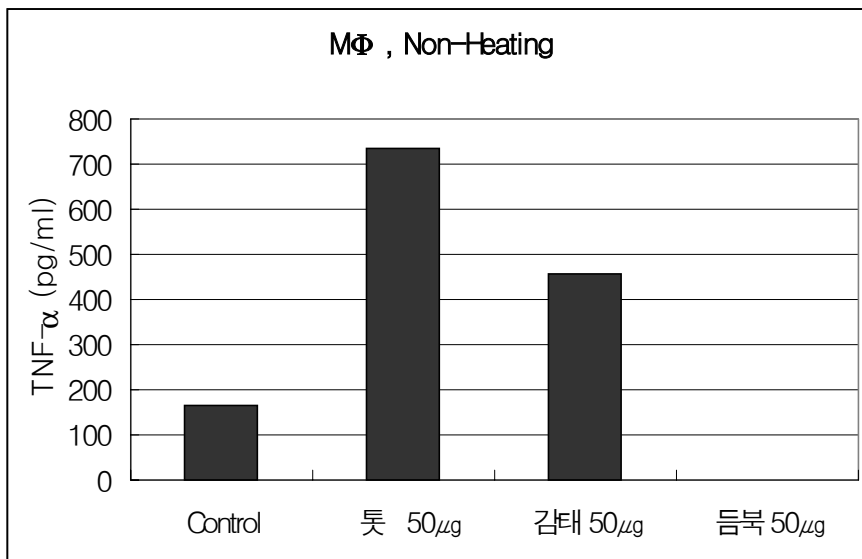


Figure 2. TNF-α production in non-heating BAIA-I stimulated MΦ. 50 μg expresses 50μg/ml.

## 2) BAIA-I의 macrophage로부터 IL-1 $\beta$ 분비효과

사료 가공 시 높은 열을 가한다는 것을 감안하여 열을 가하여 얻은 추출물이 IL-1 $\beta$  분비 효능을 가지는 지를 알아보려고 하였고, 이와 더불어 non-heating 추출물의 IL-1 $\beta$  분비 효능도 검사하였다. 실험결과 각 갈조류들로부터 얻은 heating 추출물들은 톳과 모자반(듬북) 50 $\mu$ g/ml에서 IL-1 $\beta$  분비능 효과가 있었고, 톳(50 $\mu$ g/ml)이 가장 많은 IL-1 $\beta$ 를 분비하였으나, 감태는 5 $\mu$ g/ml에서 IL-1 $\beta$  분비능이 50 $\mu$ g/ml보다 더 좋았으며 분비량 또한 많았다. (Figure 3). 그리고 non-heating 추출물 중 톳(50 $\mu$ g/ml)이 heating 추출방법보다 더 많은 IL-1 $\beta$ 분비를 보였고, 감태나 모자반(듬북)에서는 control과 큰 차이를 나타내지 못했다. 모자반(듬북)에서는 non-heating 추출물 50 $\mu$ g/ml 농도로 자극 시켰음에도 불구하고 macrophage로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비가 control보다 낮게 측정되었다(Figure 4). Macrophages로부터 IL-1 $\beta$  분비능 효과에서는 톳(50 $\mu$ g/ml)의 heating 추출물과 non-heating 추출물 양쪽 모두에서 IL-1 $\beta$  분비능 효과를 가지고 있었으며, 감태는 heating 추출물에서 적은 양(5 $\mu$ g/ml)에서도 IL-1 $\beta$  분비능 효과가 높았다(Figure 3). Macrophage로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비능 효과는 TNF- $\alpha$  분비능 효과에 비해 현저히 낮은 분비 효과를 보여주었다(Figure 1~4).

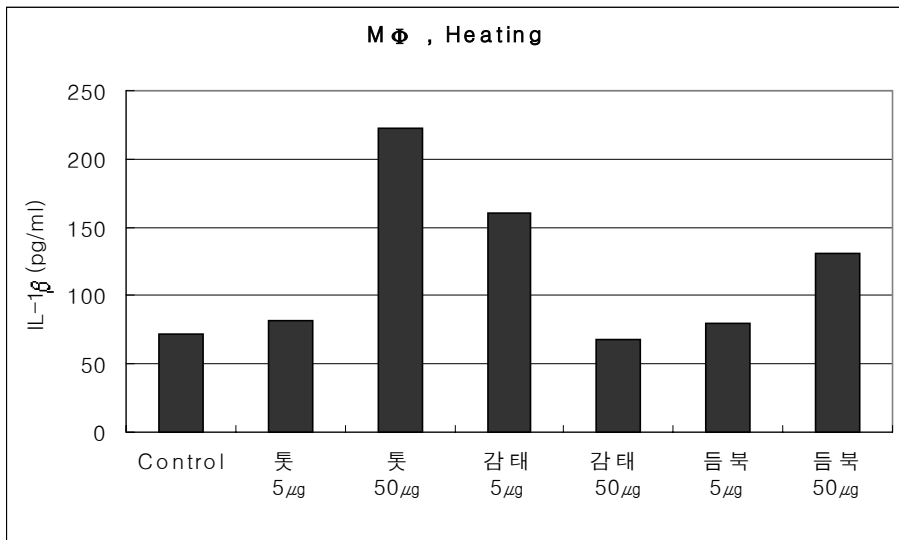


Figure 3. IL-1 $\beta$  production in heating BAIA-I stimulated M $\Phi$ . 5 $\mu$ g and 50  $\mu$ g represent for 5 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, respectively.

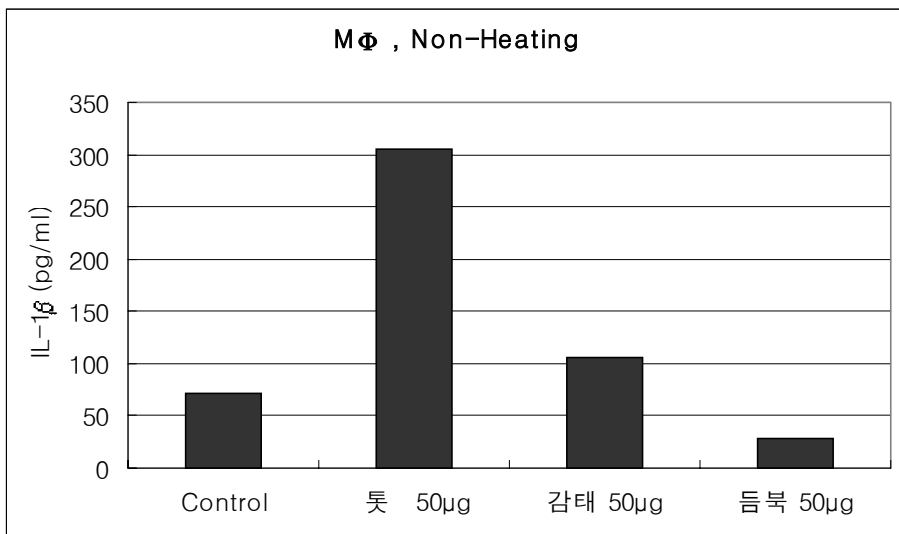


Figure 4. IL-1 $\beta$  production in non-heating BAIA-I stimulated M $\Phi$ . 50 $\mu$ g expresses 50 $\mu$ g/ml.

### 3) BAIA-I가 mouse splenocytes 독성에 미치는 영향

본 갈조류 추출물이 면역활성에 지대한 효과가 있다해도 생체 내에 독성이 있으면 아니 되기에 세포 독성에 대한 안정성 검사를 실시하였다. 본 추출물인 1 차 수용성물질이 정상 세포에 대한 세포 독성 유무를 알기 위해 마우스의 비장세포를 가지고 연구를 수행하였다. 본 갈조류 추출물질이 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  에서도 비장세포에 세포 독성효과를 주지 않았음이 나타났으므로(Figure 5), *in vitro* 안정성 문제에 대해서는 염려할 바가 없음을 제시했다. 그리고 흥미로운 것은 갈조류 추출물이 비교구보다 세포가 더 많이 증식된 것같이 보였다(Figure 6). 그렇지만 *in vivo* 안정성 검사로써 신장 및 간에 미치는 독성 검사 그리고 성장 발육에 미치는 영향 등을 추후 심도 있게 연구해야할 과제로 남겨두고 있다.

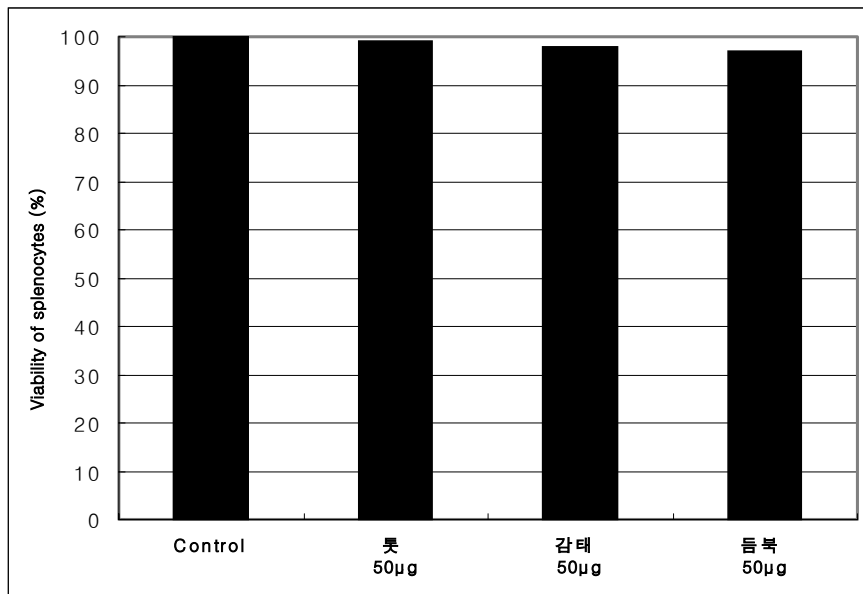


Figure 5. The cytotoxic effect of saline (control) and BAIA-I stimulated splenocytes measured by means of MTT method. 50 $\mu\text{g}$  expresses 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



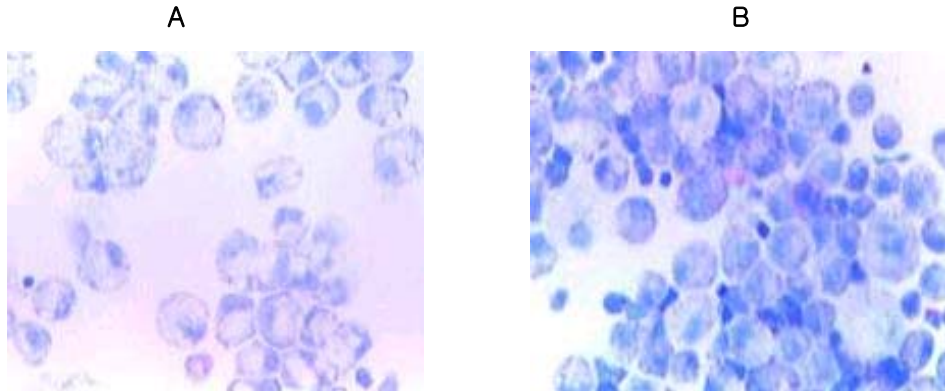


Figure 6. The cytotoxic effect of saline (A) and BAIA-I stimulated splenocytes detected by light microscope.

#### 4) 갈조류부터 추출된 BAIA-I에 대한 적혈구 응집반응 효과

실험결과 갈조류인 톳, 감태, 듄북 중 톳이 면역활성효과가 제일 높았고 (Figure 1~4), 이들간에 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 톳이 독성이 제일 낮았다(Figure 5~6). 톳, 감태, 듄북으로 추출한 물질에 해조류 렉틴의 존재여부를 알기 위해 적혈구 응집반응 실험을 하였다. 본 결과에서는 톳 결과만 보여주고 있다(Figure 7). 감태, 듄북들도 같은 경향을 보였다(data not shown). 식물의 방어물질인 lectin은 많은 작용 중 천연물 면역활성물질로 부각되고 있으며, 또한 활발히 연구되고 있다. 렉틴은 혈구세포 및 lymphocyte, fibroblast, spermatozoid, bacteria, fungi 등의 세포를 응집시키며, 탄수화물과 결합하는(divalent or polyvalent) 단백질 또는 당 단백질이다(Elgavish et al., 1997; Goldstein et al., 1980). 렉틴은 1888 년에 독일 Kaiserlichen 대학교에서 Stillmark가 자신의 의학박사 학위논문에서 castor bean(*Ricinus comunis*)에서 발견하였음을 처음으로 발표하였으며(Franz, 1988), 현재는 bacteria, algae, fungi, 고등식물, invertebrates 및 vertebrates tissue에 이르기까지 넓은 범위의 다양한 생물체에서 발견되고 있다(Goldstein et al., 1978; Rudiger et al., 1984). 이미 수많은 식물로부터 렉틴이 확인 개발되었으며 그 대표적인 것이

concanavalin A(Con-A), wheat germ agglutinin(WGA), peanut agglutinin (PNA) 등은 상품화되어 이용되고 있는 실정이다. Heating(1mg/ml) 추출물은 2 배 희석(B,B')까지 적혈구 응집효과를 보였고, non-heating(1mg/ml)은 8 배 희석(D,D')까지 적혈구 응집효과를 보였다 (Figure 7). 갈조류에서 추출된 물질 들이 적혈구에 대한 응집효과를 나타내는 것으로 보아 active lectin을 함유하고 있음을 확인하였으며, 그리고 non-heating으로 추출된 물질이 heating으로 추출한 물질 보다 더 많은 active lectin을 함유하고 있음을 확인 할 수 있었다 (Figure 7).

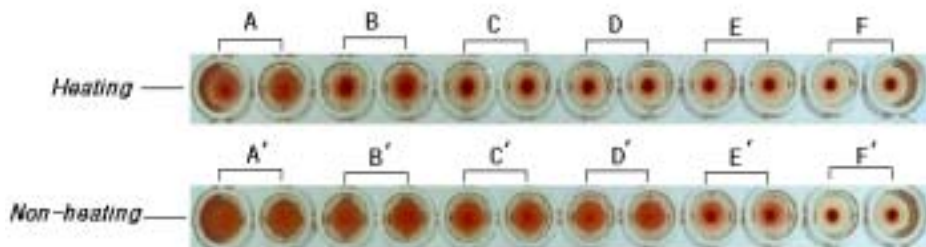


Figure 7. The effect of Korean Sea-Weed extracts on agglutination of RBC. (A,A'), (B,B'), (C,C'), (D,D'), (E,E'), (F,F') express 1, 2, 4, 8, 16, 32 multiple dilution.

# 제 3 절 해조류 중 갈조류로부터 면역활성 기능성 물질의 부분 정제(BAIA-II) 및 면역활성 효과 검사

## 1 재료 및 방법

### 1) 시약

Acrylamide, TEMED, amonumpersulphate 등 단백질 전기영동을 위한 각종 물질은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입했으며, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  검사를 위한 ELISA kit 및 immunoblotting을 위한 각종 항체는 Chemicon(Temecula, CA, USA)으로부터 구입했다. Gel filtration에 관련된 제품은 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)로부터 구입했으며, HPLC를 위한 각종 물질은 Waters(Milford, MA, USA)로부터 구입했다. Methanol을 비롯한 각종 유기용매는 Merck (Berlin, Germany)로부터 구입했다.

### 2) 실험동물

본 실험에서 사용된 macrophage의 추출을 위해 Balb/c 마우스를 사용하였다. Balb/c 마우스는 대한실험동물센터(음성대조군, 충북)으로부터 분양받아 항온항습실에서 각종 실험을 위해 희생될 때까지 사육하였다. 항온항습실의 조건은 온도 22 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C, 습도 55 $\pm$ 5%, 청정도 Class 10.000, 조명 150 Lux, 소음은 60 Phone 이하의 조건에서 사육되었다.

### 3) 갈조류에서 유래된 1차 면역 기능성 물질(BAIA-I)으로부터 2차 면역 기능성 물질(BAIA-II) 분리, 정제

갈조류 중에서 툯, 감태, 듄북에서 얻은 BAIA-I를 이용해 BAIA-II를 분리하였다. 간단히 기술하면, 갈조류에서 유래된 1차 면역 기능성 물질(BAIA-I)을 공극크기(pore size)를 달리하는 여과막(2.5 $\mu$ m~0.45 $\mu$ m, Millipore, Bedford, MA, USA)을 통과시켰다. 여과막을 통과시킨 후, 70%의 황산암모늄에 가하여 cold room에서 4시간정도 저속으로 교반배양하였다. 교반배양 후

30분간 원심분리(4°C, 20,000g, Rotor A6.14, Kontron, Italy)한 후 얻은 침전물에 이차증류(4°C)를 첨가하여 투석여과막(Spectra/Por-CE, MWCO 3,500)에 주입한 후 이차증류수로 cold room(4°C)에서 6시간씩 교환하면서 4회 투석하여 황산암모늄을 제거시켰다. 투석한 용액을 원심분리(10,000g, 30분, 4°C; Rotor A6.14, Kontron, Italy)한 후 상층액을 동결건조시켜 얻은 물질을 2차 면역 기능성 물질 brown algae immune agent-II (BAIA-II)라 칭하였다. BAIA-II에 오염된 LPS 검사는 Limulus ES II kit(Wako, Japan)로 검사하였다. 시료에 오염된 LPS 농도는 60 endotoxin units(EU)/ml 이었다. 유럽국가에 있어 시약에 오염된 LPS 허용범위 농도는 350 EU/ml인데(Scheer, 1993), 본 BAIA-II는 허용범위의 1/6정도에 불과했다. 본 시료 BAIA-II를 다음 실험 때까지 -20°C에 보관하였다.

#### 4) Polyacrylamide gel electrophoresis

BAIA-II의 단백질 함량 정도를 검사하기 위해 전기영동기법을 이용하였다. 전기영동은 폴리아크릴아미드 겔을 전기영동기(Hoefer, CA, USA)에 장착해 이루어졌다. 간단히 설명하면 단백질 시료를 15% lower gel과 3% upper gel을 사용해 수행했으며, 각 시료는 전기영동 시료완충액에 혼합한 후 100°C에 5분간 열을 가한 후 얼음물(ice-water)에 3분간 배양한 후 각 시료는 겔에 적용하였으며, 전기영동 완충액은 4°C를 유지하도록 하면서 50mA로 4시간 전류를 흘려 각 시료내의 단백질을 분리하였다. 겔의 염색은 은염색법(silver staining)을 사용해 이루어졌으며, 분리된 단백질은 표준시약(Sigma, St Louis, MO, USA)에 의해 분자량이 측정되었다.

#### 5) 크로마토그램

동결건조된 분말 BAIA-II를 1 mg/ml 농도가 되도록 PBS로 녹여 0.45 µm 여과막(Milipore, Bedford, MA, USA)를 이용해 여과하였다. 여과된 BAIA-II를 30 µl 분취해서 Protein-Pak column(10,000~300,000 Datons, Waters, USA)이 장착된 HPLC(Alliance 2690, Waters, MA, USA)에 적용하였다. 동상액은 PBS(pH 6)로 하였으며, 유속은 1 ml/min하여 UV검출기(Waters 2487, MA, USA)내에서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) 적혈구 응집반응 시험

갈조류에서 추출한 BAIA-I의 agglutinin으로서의 기능을 가지는지, 즉 렉틴(lectin)성분이 함유되어 있는지 알기 위해서 B형 적혈구 응집반응을 실시하였다. 응집반응 test는 B형 말초혈액 1 ml을 취하여 PBS에서 2%가 되게 현탁시킨 후, U-Type 96-well microtiter plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 연속적인 두 배 희석법으로 실시하였다. 갈조류에서 추출한 물질 BAIA-I과 B형 혈액을 96 well microtiter plate에서 1 시간 동안 배양하여 응집 정도를 관찰하였다.

#### 7) Mouse로부터 macrophage의 추출, 배양, 자극

Macrophages의 수를 증가시키기 위해 3% thioglycollate medium을 mouse 복강 내에 2 ml/mouse 투여하였다(Johnson et al., 1967). 투여 3일 후 mouse를 경추 탈골시켜 RPMI-1640 medium 20 ml/mouse를 복강 내 주입해서 복강삼출세포(peritoneal extract cell)를 수집하였다. 오염된 적혈구는 lysis한 후 제거하였다. 그 다음 RPMI-1640으로 24 well plate에 macrophages를 plating하였다. 순수한 macrophages를 모으기 위해 1 시간 정도 배양한 후 macrophages가 붙었는지 확인하고, 다른 종류의 부유 세포들을 2 회 세척하여 제거하였다. 세척한 후 Wright and Giemsa stain법으로 염색했을 때 macrophages의 순수도는 98% 이상이었다(data not shown). M11C으로 자극하기 전에 macrophage plate를 incomplete RPMI-1640 medium으로 2 회 씻어낸 후, serum free RPMI-1640 medium(+penicillin-streptomycin, +L-glutamine)을 1 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991). 갈조류에서 추출한 BAIA-II에 의한 macrophage 자극은 mouse로부터 추출 후 3 일간 배양한 후 각종 추출물로 자극하였다. 갈조류에서 추출한 물질에 의한 자극 전에 24 well plate를 incomplete RPMI medium으로 2 회 씻어낸 후, serum free RPMI medium (+penicillin-streptomycin, + L-glutamine)을 1.5 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991; Jeffrey et al, 1990). 갈조류에서 추출한 물질 BAIA-II(50 $\mu$ g/ml)를 24 well에 첨가하여 8 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 자극시켰다. 각 세포들을 자극시켜 얻은 macrophage conditioned media(MCM)를 6 ml tube에 옮겨 immunoblotting으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 측정할 때까지

-20℃에 보관하였다.

#### 8) TNF- $\alpha$ 검사를 위한 sandwich ELISA

TNF- $\alpha$  분석용 ELISA kit(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 검사하였는데 간단히 설명하면 다음과 같다. TNF- $\alpha$  standard와 samples를 96 well(precoated with rat anti-mouse TNF- $\alpha$ )에 100  $\mu$ l씩 넣었다. 그리고 난 후 primary antibody인 rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$  25  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 뒤, 4 시간 동안 항온에서 배양한 후, wash buffer로 씻어내었다. 이후에 100  $\mu$ l second antibody인 goat anti-rabbit conjugated alkaline phosphate를 well에 첨가한 후 45 분간 배양하였다. 배양 한 후 wash buffer로 씻어낸 후, vacuum으로 조심스럽게 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 후 color reagent 200  $\mu$ l를 각 well에 넣고, 각 well 별로 차별성이 있는 주황색이 나타나면 stop solution 50  $\mu$ l를 넣어 색깔반응을 고정시키고, 490 nm에서 ELISA reader(Bio-Tek, Highland park, Vermont, USA)로 측정하여 TNF- $\alpha$ 의 양을 분석하였다(Fomsgaard et al. 1988).

#### 9) TNF- $\alpha$ 검사를 위한 Immunoblotting

MCM을 5 x sample buffer와 섞어 100℃에서 약 5 분 그리고 ice-water에 약 5 분 배양한 후 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질을 1 A current에서 cooling system(LKB; Bromma, Sweden)으로 4℃를 유지하면서 1.5 시간동안 nitrocellulose membrane(NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. NC는 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 상온에서 1 시간 동안 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, TBS-T buffer를 siliconized bottle에 넣고 여기에 rabbit anti-murine TNF- $\alpha$  polyclonal primary antibody(finally 300 dilutions)를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 NC를 siliconized bottle에 넣고 hybridization incubator(Robbins; CA, USA; speed 10rpm)에서 4℃에서 12 시간 동안 incubation 하였다. 그 후, TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified

antibody(20,000 dilutions)를 첨가하여 4°C, hybridization incubator에서 3 시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 ECL(peroxidase substrate, Amersham, USA)을 NC에 잘 섞은 후, 5 분간 배양하였다. 그 후, 암실(10W safety lamp; Kodak; USA)에서 NC가 들어있는 cassette에 X-ray film을 넣고 5~10 분 이상 감광시킨 후 X-ray film을 developing, washing, fixing, washing 순서과정을 거친 후 TNF- $\alpha$  band의 크기와 강도를 분석하였다 (Bollag et al., 1996).

#### 10) IL-1 $\beta$ 검사를 위한 sandwich ELISA

IL-1 $\beta$  분석용 ELISA kit(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 검사하였는데 간단히 설명하면 다음과 같다. IL-1 $\beta$  standard와 samples를 96 well(precoated with rat anti-mouse IL-1 $\beta$ )에 100  $\mu$ l씩 넣었다. 그리고 난 후 primary antibody인 rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$  25  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 뒤, 4 시간 동안 항온에서 배양한 후, wash buffer로 씻어내었다. 이 후에 100  $\mu$ l second antibody인 goat anti-rabbit conjugated alkaline phosphatase를 well에 첨가한 후 45 분간 배양하였다. 배양 한 후 wash buffer로 씻어낸 후, vacuum 으로 조심스럽게 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 후 color reagent를 각 well에 넣고, 각 well 별로 차별성이 있는 주황색이 나타나면 stop solution 50  $\mu$ l를 넣어 색깔반응을 고정시켰다. 490 nm에서 ELISA reader(Bio-Tek, Highland park, Vermont, USA)로 측정하여 IL-1 $\beta$ 의 양을 분석하였다 (Fomsgaard et al. 1988).

#### 11) IL-1 $\beta$ 검사를 위한 immunoblotting

Western blotting에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였다(Scheer 1993; Kang et al., 2000). 간단히 설명하면, MCM을 sample buffer와 섞은 후 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 nitrocellulose membrane(NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. 이동시킨 후, NC를 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, rabbit anti-murine

IL-1 $\beta$  polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 hybridization incubator(Robbins, CA, USA; speed 10rpm)에서 4 $^{\circ}$ C에서 12 시간 동안 배양하였다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 hybridization incubator에서 4 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 NC를 ECL(oxidase substrate, Amersham, Cleveland, Ohio, USA)로 잘 적신 후 5 분간 배양하였다. 배양한 후, 10W safety lamp(Kodak, Rochester, NY, USA)가 설치된 암실에서 x-ray film(Agfa, Devaert, Belgium))에 감광시킨 후 x-ray film을 developing, washing, fixing, washing 순서과정을 거친 후 IL-1 $\beta$  band의 크기와 강도를 분석하였다.



## 2. 결과 및 고찰

### 1) 전기영동에 의한 BAIA-II에 포함된 단백질 확인

갈조류 추출물인 BAIA-II의 분자량을 확인하기 위하여, polyacrylamide gel 전기영동을 환원 또는 비환원 상태에서 실시하였다. Figure 8에서 나타난 것과 같이 해조류 추출물인 BAIA-II는 환원상태에서 넓은 범위에서 단백질 밴드가 관찰되었으나, 특히 32 kD와 33 kD 단백질이 다른 단백질 밴드에 비해 크면서 뚜렷하게 나타났다. 이로서 이 두 물질(32 kD와 33 kD)를 나타내는 밴드는 이황화결합(disulfide bond)을 하고 있는 이형이합체(heterodimer) 단백질로 유추되었다.

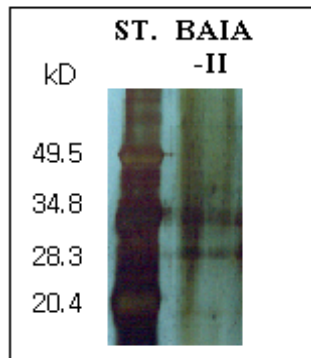


Figure 8. SDS-PAGE of brown algae extracts, BAIA-II. ST represents the marker of standard proteins.

### 2) 크로마토그램에 의한 BAIA-II의 물질 확인

BAIA-II를 흡광도 280에서 크로마토그램에서 분석한 결과(Figure 9), 보는 바와 같이 전기영동에서 얻은 결과(Figure 8)와 아주 유사하였다. 다시 말해 BAIA-II 분석은 크로마토그램에서 여러 peak가 나타났으며(Figure 9), 이

여러 peak는 단백질류 및 당류를 비롯한 여러 물질이 포함되어 있음을 말해 주고 있다.

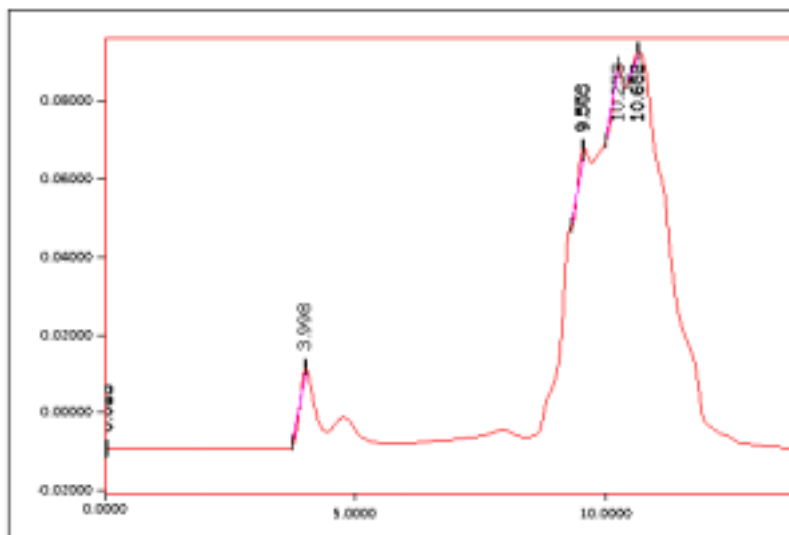


Figure 9. The chromatogram for the BAIA-II at 280 nM UV detector.

### 3) 적혈구 응집반응기법을 이용한 BAIA-II에 렉틴 함유 확인

BAIA-II에 agglutinin 즉 렉틴기능을 가지는지 조사하고자 적혈구 응집 반응을 실시하였다. 음성대조군인 PBS는 응집반응이 일어나지 않았는데 반해, BAIA-II는 응집반응이 일어났는데, BAIA-II가 응집을 위해 요구되는 최소의 농도를 확인한 결과  $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 최소 응집 농도였다(Figure 10). 그래서 BAIA-II는 BAIA-I보다 더 많은 렉틴을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 7, 10).

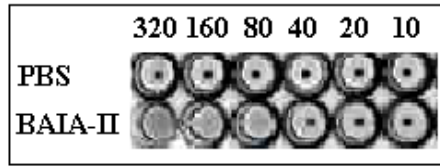


Figure 10. The dose dependent effect of BAIA-II on agglutination of B type RBC. The doses are 10, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 4) BAIA-II의 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비유도효과

대식세포가 활성화할 때 TNF- $\alpha$ 를 비롯한 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12가 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다(Gery et al., 1972; Dinarello 1989). 따라서 갈조류 추출물인 BAIA-II가 면역계의 일차적인 면역반응에 주요한 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 검사하고자 했다. 본 연구에서는 BAIA-II로 비장 대식세포를 자극했을 때 TNF- $\alpha$ 가 생산 분비된다는 것을 검사하기 위해 ELISA, immunoblotting 기법들을 이용하였다. ELISA 실험기법에서 BAIA-II 100~300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 6 시간동안 비장 대식세포를 자극한 그룹이 자극하지 않았던 PBS 그룹보다 TNF- $\alpha$ 가 유의한 차이로 많이 분비되었음을 보여주었다(Figure 11). 이러한 TNF- $\alpha$  분비에 대한 ELISA 실험결과를 다시 한번 더 확증하기 위해 immunoblotting 실험기법을 이용하였다(Figure 12). 이 실험결과, ELISA 기법에서 얻은 결과처럼 M11C가 비장 대식세포를 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 가 분비됨을 확증해 주었다(Figure 12). 이러한 결과들은 갈조류 추출물인 BAIA-II가 면역계의 일차적인 면역반응에 주요한 대식세포의 활성화에 크게 영향을 미치는 것을 확인하였다.

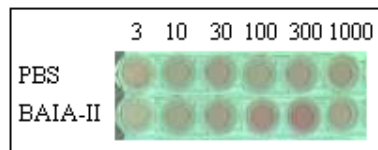


Figure 11. The effect of BAIA-II on TNF- $\alpha$  release from macrophage. by means of ELISA technique.

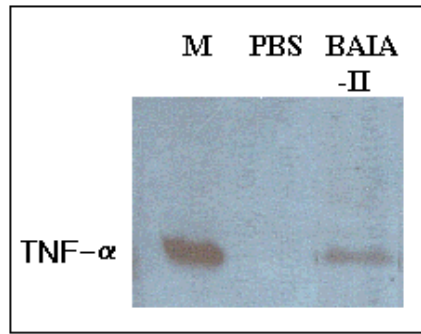


Figure 12. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS and BAIA-II stimulated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ . M represents marker for TNF- $\alpha$ .

#### 5) BAIA-II의 대식세포로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비유도효과

Macrophage가 활성화할 때 TNF- $\alpha$ 를 비롯한 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12가 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다(Gery et al., 1972; Dinarello 1989). 따라서 M11C가 면역활성 효과능을 알기 위한 연구 접근방법 중 하나로 macrophage로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비능을 검사하였다. 본 연구에서는 BAIA-II로 macrophage를 자극했을 때 IL-1 $\beta$ 가 생산 분비된다는 것을 검사하기 위해 ELISA, Immunoblotting 기법들을 이용하였다. ELISA 실험기법에서 BAIA-II 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 8 시간동안 macrophages를 자극했을 때 IL-1 $\beta$ 가 가장 많이 분비되었음을 보여주었다(Figure 13). 이러한 BAIA-II의 최대 효과의 농도와 배양시간은 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 하는 실험결과에서와 같은 경향을 보여 주었다(Figure 12). 이러한 IL-1 $\beta$ 분비에 대한 ELISA 실험결과를 다시 한번 더 확증하기 위해 immunoblotting 실험기법을 이용하였다. 이때 사용한 BAIA-II의 농도와 자극시간은 ELISA기법에서 얻은 최대 효과농도 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 최대효과 배양시간인 8 시간이었다(Figure 14). 이 실험결과, ELISA 기법에서 얻은 결과처럼 BAIA-II가 macrophage를 활성화시켜 IL-1 $\beta$ 이 분비됨을 확증해 주었다. ELISA 기법을 이용한 정량분석을 했을 때 BAIA-II 자극에 의한 macrophage의 IL-1 $\beta$ 의 분비는 TNF- $\alpha$ 분비의 약 1/9~10 수준이었

다.

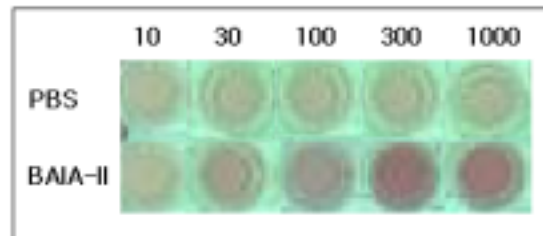


Figure 13. The effect of BAIA-II on IL-1 $\beta$  release from macrophage by means of ELISA technique.

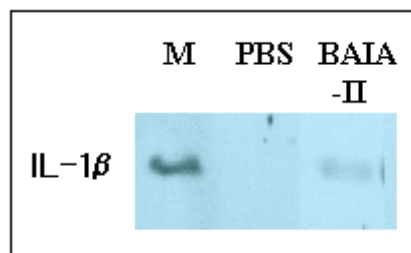


Figure 14. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS and BAIA-II-treated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$ . M represents marker for IL-1 $\beta$ .

## 제 4 절 해조류 중 갈조류로부터 부분정제된 기능성 물질 중 면역효과가 탁월한 물질(BAIA-III) 분리와 정제, 화학적 동정

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 시약, 실험 동물

세포의 배양을 위하여 배양액 RPMI-1640과 MEM, fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 각종 culture plate들, flask들, 그리고 각종 tube들은 Falcon(Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 검사를 위한 ELISA kit 및 immunoblotting을 위한 각종 항체는 Chemicon(Temecula, CA, USA)으로부터 구입했다. RT-PCR을 위한 시약은 Takara(Otsu, Shiga, Japan)로부터 구입했다. Chloroform, hexane, methanol, ethanol, isopropanol을 비롯한 각종 유기용매들은 Merck(Berlin, Germany)로부터 구입했다. 본 실험에서 사용된 각종 mouse들은 대한실험동물센터(음성대조군, 충북)로부터 분양받아 항온 항습실에 사육하면서 실험하였다. 비장 대식세포의 추출을 위해 Balb/c mouse를 사용하였다. 실험에 사용된 세포주 ICE-6는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, Maryland, USA)로부터 분양받은 S-180(ATCC TIB 66)이었다.

#### 2) 부분정제 물질 BAIA-II에서 갈조류 렉틴 BAIA-III의 분리, 정제

동결건조된 BAIA-II를 PBS로 녹여 0.45 $\mu$ m로 여과한 후 0.2N HCl로 가수분해된 세파로즈 4B(Sepharose-4B, Bio-Rad, USA) 칼럼에 적용시켜 1시간 고정시켰다. 고정 후 cold-PBS로 세척하고 0.1M 갈락토즈 용액으로 용출시켜 280 nm UV분광계로 흡광도를 측정하였다. 피크가 높은 분획을 회수하여, 갈락토즈를 제거하기 위해 투석여과막(Spectra/Por-CE, MWCO 3,500)에 주입한 후 이차증류수로 cold room(4 $^{\circ}$ C)에서 6시간씩 교환하면서 5회 투석하였다. 투석한 후, Polymyxin-B column(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용해 오염

된 LPS를 제거한 후 PBS로 투석하였다. 투석 후 동결건조시켜 얻은 분말을 BAIA-III라 칭하였다. BAIA-III에 오염된 LPS 농도는 70 endotoxin units(EU)/ml 이었는데, 유럽국가에 있어 시약에 오염된 LPS 허용범위 농도는 350 EU/ml인데(Scheer, 1993)이다. 본 BAIA-III는 허용범위의 1/5 이하에 불과해 추후 실험에 아무런 문제가 없었다. 본 BAIA-III를 다음 실험 때까지 -20℃에 보관하였다.

### 3) Polyacrylamide gel electrophoresis

BAIA-III의 단백질 분석을 하기 위해 전기영동기법을 이용하였다. 전기영동은 폴리아크릴아미드 겔을 전기영동기(Hoefer, CA, USA)에 장착해 이루어졌다. 간단히 설명하면 단백질 시료를 15% lower gel과 3% upper gel을 사용해 수행했으며, 각 시료는 전기영동 시료완충액에 혼합한 후 100℃에 5분간 열을 가한 후 얼음물(ice-water)에 3분간 배양한 후 각 시료는 겔에 적용하였으며, 전기영동 완충액은 4℃를 유지하도록 하면서 50mA로 4시간 전류를 흘려 각 시료내의 단백질을 분리하였다. 겔의 염색은 은염색법(silver staining)을 사용해 이루어졌으며, 분리된 단백질은 표준시약(Sigma, St Louis, MO, USA)에 의해 분자량이 측정되었다.

### 4) 크로마토그램

BAIA-III의 순수도를 검사하기 위해 크로마토그램 기법을 이용하여 검사하였다. 동결건조된 분말 BAIA-III를 1 mg/ml 농도가 되도록 PBS로 녹여 0.45 μm 여과막(Milipore, Bedford, MA, USA)를 이용해 여과하였다. 여과된 BAIA-III를 30 μl 분취해서 Protein-Pak column(10,000~300,000 Datons, Waters, USA)이 장착된 HPLC(Alliance 2690, Waters, MA, USA)에 적용하였다. 동상액은 PBS(pH 6)로 하였으며, 유속은 1 ml/min하여 UV검출기(Waters 2487, MA, USA)내에서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) 적혈구 응집반응 시험 및 저해반응

BAIA-III가 렉틴으로서의 기능을 가지는지, 그리고 어떠한 당에 specificity를 가지는지에 대해 조사하고자 B형 적혈구 응집반응과 당저해 반

응을 실시하였다. 간단히 설명하면, 먼저 B형 적혈구를 취하여 PBS에서 2%가 되게 현탁시킨 후 정해진 농도의 BAIA-III과 96 well microtiter plate에서 1 시간 동안 배양하여 응집을 위해 요구되는 최소의 농도를 확인하였다. 그리고 이 농도의 BAIA-III을 다양한 종류 및 다양한 농도의 당과 배양한 후 다시 적혈구 현탁액과 반응시켜 당에 의한 응집저해 정도를 검사하였다.

#### 6) Mouse로부터 macrophage의 추출, 배양, 자극

Macrophages의 수를 증가시키기 위해 3% thioglycollate medium을 mouse 복강 내에 2 ml/mouse 투여하였다(Johnson et al., 1967). 투여 3일 후 mouse를 경추 탈골시켜 RPMI-1640 medium 20 ml/mouse를 복강 내 주입해서 복강삼출세포(peritoneal extract cell)를 수집하였다. 오염된 적혈구는 lysis한 후 제거하였다. 그 다음 RPMI-1640으로 24 well plate에 macrophages를 plating하였다. 순수한 macrophages를 모으기 위해 1 시간 정도 배양한 후 macrophages가 붙었는지 확인하고, 다른 종류의 부유 세포들을 2 회 세척하여 제거하였다. 세척한 후 Wright and Giemsa stain법으로 염색했을 때 macrophages의 순수도는 98% 이상이었다(data not shown). M11C으로 자극하기 전에 macrophage plate를 incomplete RPMI-1640 medium으로 2 회 씻어낸 후, serum free RPMI-1640 medium(+penicillin-streptomycin, +L-glutamine)을 1 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991). 갈조류에서 추출한 BAIA-III에 의한 macrophage 자극은 mouse로부터 추출 후 3 일간 배양한 후 각종 추출물로 자극하였다. 갈조류에서 추출한 물질에 의한 자극 전에 24 well plate를 incomplete RPMI medium으로 2 회 씻어낸 후, serum free RPMI medium (+penicillin-streptomycin, + L-glutamine)을 1.5 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991; Jeffrey et al, 1990). 갈조류에서 추출한 물질 BAIA-III를 24 well에 첨가하여 8 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 자극시켰다. 각 세포들을 자극시켜 얻은 macrophage conditioned media(MCM)를 6 ml tube에 옮겨 immunoblotting으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다.

#### 7) TNF- $\alpha$ 검사를 위한 Immunoblotting

BAIA-III로 macrophage를 자극시켜 얻은 MCM을 5 x sample buffer와



섞어 100℃에서 약 5 분 그리고 ice-water에 약 5 분 배양한 후 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 1 A current에서 cooling system(LKB; Bromma, Sweden)으로 4℃를 유지하면서 1.5 시간동안 nitrocellulose membrane(NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. NC는 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 상온에서 1 시간 동안 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, TBS-T buffer를 siliconized bottle에 넣고 여기에 rabbit anti-murine TNF- $\alpha$  polyclonal primary antibody(finally 300 dilutions)를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 NC를 siliconized bottle에 넣고 hybridization incubator(Robbins; CA, USA; speed 10rpm)에서 4℃에서 12 시간 동안 incubation 하였다. 그 후, TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody(20,000 dilutions)를 첨가하여 4℃, hybridization incubator에서 3 시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 ECL(oxidase substrate, Amersham, USA)을 NC에 잘 섞은 후, 5 분간 배양하였다. 그 후, 암실(10W safety lamp; Kodak; USA)에서 NC가 들어있는 cassette에 X-ray film을 넣고 5~10 분 이상 감광시킨 후 X-ray film을 developing, washing, fixing, washing 순서과정을 거친 후 TNF- $\alpha$  band의 크기와 강도를 분석하였다(Fomsgaard et al., 1988).

#### 8) IL-1 $\beta$ 검사를 위한 immunoblotting

BAIA-III로 macrophage를 자극시켜 얻은 MCM을 sample buffer와 섞은 후 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 nitrocellulose membrane(NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. 이동시킨 후, NC를 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, rabbit anti-murine IL-1 $\beta$  polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 hybridization incubator(Robbins, CA, USA; speed 10rpm)에서 4℃에서 12 시간 동안 배양하였다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2 차 항체(goat anti-rabbit

IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 hybridization incubator에서 4°C에서 3 시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어 내었다. 그 후 NC를 ECL(peroxidase substrate, Amersham, Cleveland, Ohio, USA)로 잘 적신 후 5 분간 배양하였다. 배양한 후, 10W safety lamp(Kodak, Rochester, NY, USA)가 설치된 암실에서 x-ray film(Agfa, Devaert, Belgium))에 감광시킨 후 x-ray film을 developing, washing, fixing, washing 순서과정을 거친 후 IL-1 $\beta$  band의 크기와 강도를 분석하였다(Fomsgaard et al., 1988).

9) TNF- $\alpha$  mRNA 전사 증감검사를 위한 역전사 중합연쇄 반응

Macrophages로부터 역전사 중합 연쇄 반응(RT-PCR)은 역전사 kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan) 및 중합연쇄반응 kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다. Mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate(TRISOL; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 total RNA의 추출하였다. 2  $\mu$ g의 total RNA를 역전사 반응액(total volume: 50  $\mu$ l; 10  $\mu$ l of 5x RAV-RTase buffer, 20  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 0.02  $\mu$ M of TNF- $\alpha$  or  $\beta$ -actin anti-sense primer, 10 units of RAV RTase)과 혼합하여 42°C에서 1 시간 동안 반응시켜 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액(total volume: 50  $\mu$ l; 5  $\mu$ l of 10x Taq buffer, 4  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 1  $\mu$ l of 10 pmoles/ $\mu$ l TNF- $\alpha$  or  $\beta$ -actin sense or anti-sense primer, 8 units of Taq)과 혼합하여 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -actin의 RT-PCR 증폭산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열 및 증폭산물의 크기는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primers used in RT-PCR for the TNF- $\alpha$  mRNA

Target mRNA	Primer sequences	Product size (bp)
TNF- $\alpha$	sense: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3' anti-sense: 5'-CATTCGAGGCTCCAGTGAATTCCAG-3'	286
$\beta$ -actin	sense: 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3' anti-sense: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'	840

10) IL-1 $\beta$  mRNA 전사 증감검사를 위한 역전사 중합연쇄 반응

역전사 중합 연쇄 반응(RT-PCR)에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였으며(12), 역전사 kit 및 중합연쇄반응 kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다. 간단히 설명하면, Trisol(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 total RNA의 추출하였다. 2  $\mu$ g의 total RNA를 역전사 반응액(total volume: 50  $\mu$ l; 10  $\mu$ l of 5x RAV-RTase buffer, 20  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 0.02  $\mu$ M of IL-1 $\beta$  or  $\beta$ -actin anti-sense primer, 10 units of RAV-RTase)과 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켜 IL-1 $\beta$ 와  $\beta$ -actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액(total volume: 50  $\mu$ l; 5  $\mu$ l of 10x Taq buffer, 4  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 1  $\mu$ l of 10 pmoles/ $\mu$ l IL-1 $\beta$  or  $\beta$ -actin sense or anti-sense primer, 8 units of Taq)과 혼합하여 IL-1 $\beta$ 와  $\beta$ -actin의 RT-PCR 증폭산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열 및 증폭산물의 크기는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Primers used in RT-PCR for the IL-1 $\beta$  mRNA

Target mRNA	Primer sequences	Product size (bp)
IL-1 $\beta$	sense: 5'-ATGGCAACTGTTTCCTGAACTCAAC-3' anti-sense: 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTTCCTTT-3'	563
$\beta$ -actin	sense: 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3' anti-sense: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'	840

11) 소장 상피세포 ICE-6 배양, 자극

자극하기 전 complete RPMI-1640으로 3 일 동안 CO<sub>2</sub> incubator (NAPCO, Denmark)에서 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 조건으로 배양하였다. BAIA-III에 의한 자극 전에 24 well plate를 incomplete RPMI medium으로 2 회 씻어낸 후, serum free RPMI medium (+penicillin-streptomycin, + L-glutamine)을 1.5 ml씩 주입하였다(Mary et al., 1991; Jeffrey et al, 1990). BAIA-III(5 $\mu$ g/ml)를 designed 24 well에 첨가하여 8 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator 에서 자극시켰다. 각 세포들을 자극시켜 얻은 ICE-6 conditioned media(ICM) 를 6 ml tube에 옮겨 ELISA로 IL-1 $\beta$  혹은 IL-6를 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다.

12) BAIA-III으로 자극된 ICE-6로부터 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 분비 검사

본 실험은 IL-1와 IL-6 test ELISA kit(Chemicon, Temecula, CA, USA) 를 사용하여 검사하였는데, 간단히 설명하면 다음과 같다. IL-1 $\beta$  혹은 IL-6 standard solution과 ICM을 96 well(precoated with rat anti-mouse IL-1 $\beta$  혹은 IL-6)에 100  $\mu$ l 넣었다. 그리고 난 뒤 primary antibody인 rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$  혹은 IL-6 25  $\mu$ l을 첨가하여 혼합한 뒤, room temp 에서 배양하였다. 배양한 후 second antibody인 50  $\mu$ l goat anti-rabbit conjugated alkaline phosphatase를 넣은 후 45 분간 배양하였다. 배양한 후 wash buffer(250  $\mu$ l/well)로 씻어낸 후, 여기에 color reagent를 넣고 각 well별로 차별성이 있는 붉은 색깔이 나타나면 stop solution을 넣어 반응을 정지시켰다.

490 nm에서 ELISA reader(Bio-TEK; Winooski, Vermont, USA)로 측정하여 IL-1 $\beta$  혹은 IL-6 량을 분석하였다(Fomsgaard et al., 1988).

### 13) BAIA-III의 splenocytes 세포독성 검사

본 실험에서 splenocytes에 대한 viability와 세포독성은 MTT법에 의하여 실시하였다. MTT assay는 Francois 등(1986)이 실시했던 방법에 준하여 실시하였는데 간략히 설명하면 다음과 같다. BAIA-III로 splenocytes를 배양한 후 배양시간이 완료되면 MTT solution(1 mg/ml in HBSS ; SIGMA, St Louis, MO, USA)을 각 well당 50  $\mu$ l씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 4 시간동안 다시 배양했다. 그후 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 10min, 500xg)한 후 배양 상등액은 모두 제거하고 침전되어 있는 불용성 formazan을 녹이기 위하여 dimethylsulfoxide(DMSO; SIGMA, St Louis, MO, USA)를 각 well당 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 15 분간 stirring하고 ELISA reader(Pharmacia, Sweden) 540 nm의 wavelength에서 흡광도(O.D)를 측정하여 다음과 같은 공식에 의해 % cytotoxicity와 viability(%)를 측정했다.

$$CYTOTOXICITY(\%) = \frac{O.D. CONTROLWELLS - ODTESTWELLS}{O.D. CONTROLWELLS} \times 100$$

$$VIABILITY(\%) = \frac{O.D. TESTWELLS}{O.D. CONTROLWELLS} \times 100$$

### 14) 성숙 mouse의 성장발육에 미치는 영향검사

M11C의 안전성 검사의 일환으로 성숙 mouse의 성장발육에 미치는 영향을 조사하였다. 간단히 기술하면 BAIA-III를 50  $\mu$ g/ml 농도가 되도록 0.01M PBS에 녹여 생후 7 주령 숫컷 mouse의 복강 내 주사하였으며, 반면에 대조군은 0.01 M PBS를 복강 내에 주사하였다. 한 그룹당 mouse 5 마리로 하였으며, 3 번의 독립된 실험을 실시하였다.

### 15) 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 mean $\pm$ SD로 나타냈으며, 각 group 간의 통계학적 검정에는 PC-SAS 혹은 Excel 프로그램을 이용하여 T-검정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) BAIA-III에 포함된 단백질 확인

갈조류 최종 추출물인 BAIA-III에서는 이들 두 단백질 32 kD와 33 kD 밴드만 나타났다. 이들 두 밴드가 이합체 단백질로부터 유래한 것인지, 그렇지 않으면 각각 다른 종류의 단백질인지를 알기 위해 비환원상태에서 전기영동했는데 약 65kD인 하나의 밴드만이 나타났다. 이로서 이 두 물질(32 kD와 33 kD)를 나타내는 밴드는 이황화결합을 하고 있는 이형이합체 단백질로 유추되었다. 겨우살이 렉틴 중에는 두 개의 subunit가 이황화결합을 하고 있는 이합체인 것으로 밝혀졌다(Olsnes, 1982; Yonn et al., 1999). 한국산 겨우살이 경우는 한 겨우살이 내에 두 개 이상의 렉틴이 존재한다는 가능성을 제시했는데 (Yonn et al., 1999), 본 갈조류 추출물 BAIA-III는 단일 물질임이 밝혀졌다. 만약 본 추출실험 기법이 아닌 다른 방법을 적용하면 해조류에서 또 다른 종류의 렉틴을 발견할 수 있는 지 여부에 대해서는 미래의 연구과제로 남겨 놓고 있다.

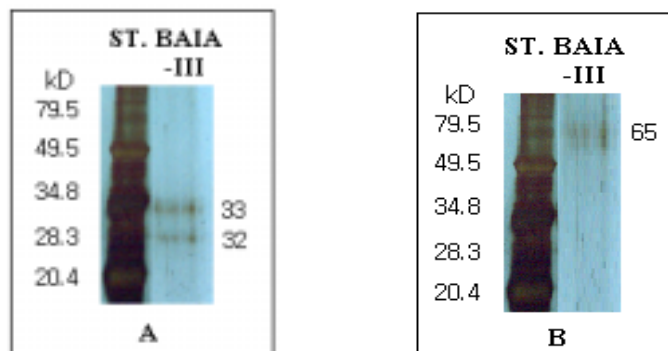


Figure 15. SDS-PAGE of brown algae extract, BAIA-III, A and B represent the reduced (with mercaptoethanol) and non-reduced condition (without mercaptoethanol), respectively.

## 2) 크로마토그램에 의한 BAIA-III의 물질 확인

갈조류 추출물인 BAIA-III를 크로마토그램(흡광도 280)에서 분석한 결과(Figure 16), 전기영동에서 얻은 결과와 아주 유사하였다(Figure 15). 다시 말해 BAIA-III 분획은 크로마토그램에서 peak가 하나이므로 다른 물질이 오염되지 않은 단일 물질임을 말해주고 있다(Figure 16). 이 peak는 retention time이 8 분에서 나타났다. 이러한 peak의 재현성은 실험의 정확성에 대한 신뢰도를 높혀주고 있다. 이 단일 물질은 전기영동실험에서 제시한 “단일 단백질로서 이형이합체(33kD와 32kD)인 단백질이다”라는 것을 재확인시켜 주었다.

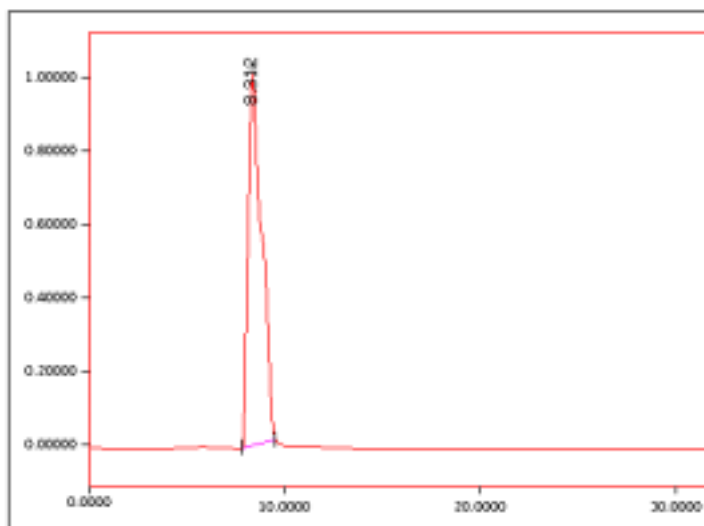


Figure 16. The chromatogram for BAIA-III at 280 nM UV detector.

## 3) 적혈구 응집반응을 통한 렉틴 확인

갈조류 최종 추출물인 BAIA-III는 렉틴들이 가지는 적혈구 응집작용을 가졌으며, 응집 최소 농도는  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다(Figure 17, Table 3). 그래서 본 연구에서는 BAIA를 갈조류 렉틴(brown algae lectin)로 칭하기로 하였다. 유

럽산 겨우살이로부터 분리된 렉틴 ML은 당 특이성에 따라 3 가지 종류로 나누어지고 있는데 galactose에 특이성을 지니는 ML-I, galactose와 N-acetyl-galctosamine에 특이성을 지니는 ML-II, 그리고 N-acetyl-galactosamine에 특이성을 가지는 ML-III가 있다(Franz et al., 1981). 한국산 겨우살이 렉틴은 유럽산 겨우살이 렉틴 ML-II와 유사한 당 특이성을 지니고 있다. 갈조류 렉틴은 galactose, N-acetyl-galactosamine, 그리고 mannose에 당 특이성을 지닌다는 것을 보여주었다(Table 4).

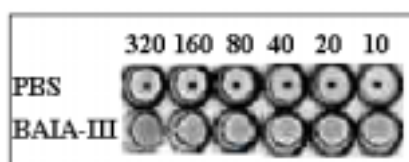


Figure 17. The dose dependent effect of Immun- $\alpha$  ( $\alpha$ ) and Immun- $\beta$ ( $\beta$ ) on agglutination of B type RBC. The doses are 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Table 3. The effect of BAIA-III on B type RBC agglutination

Brown algae extracts	Minimum dose of extracts for the B type RBC agglutination ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
BAIA-III	2.5



Table 4. The blocking effect of sugars on hemagglutination by BAIA-III

Sugars	Minimum dose of sugars for the inhibition of RBC agglutination (mM)
Galactose	2.5
N-acetylgalactosamine	5
Manose	5
Lactose	320
Glucose	320

#### 4) BAIA-III의 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비유도효과

렉틴들은 항암효과 뿐만 아니라 면역활성 효과도 있다는 것이 밝혀졌다. 면역활성 작용에 관여하는 많은 세포 중에서도 macrophages는 탐식작용에 의한 세포성 면역과 항원제공에 의한 체액성 면역에 관여하는 주요한 면역세포이다. 이 세포들은 겨우살이 렉틴과 같은 물질에 자극을 받으면 여러 종류의 cytokine들을 분비한다(Hajito et al., 1990; Mannel et al., 1991). 그래서 겨우살이 렉틴을 일명 면역증강물질이라고 부르기도 한다. 본 갈조류 추출물인 BAIA-III 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 6 시간동안 macrophages를 자극했을 때 TNF- $\alpha$ 를 가장 많이 분비하게 한다는 것을 보여 주었다(Figure 18). 근래 한국산 겨우살이 렉틴 KML과 유럽산 겨우살이 렉틴 ML이 대식세포 자극제로써 TNF- $\alpha$ 를 많이 분비하게 한다는 것을 많이 발표되었다(Yoon et al., 1999). 따라서 본 추출물인 BAIA-III를 갈조류 렉틴이라 부르며, 강력한 면역증강제 후보물질임을 시사하고 있다.

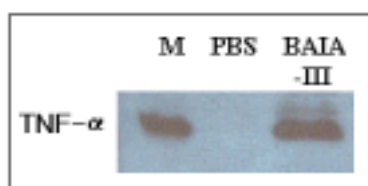


Figure 18. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS, BAIA-III stimulated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ . M represents marker for TNF- $\alpha$ .

#### 5) BAIA-III의 대식세포로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비유도효과

Macrophage가 활성화할 때 TNF- $\alpha$ 를 비롯한 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12가 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다(Gery et al., 1972; Dinarello 1989). 따라서 BAIA-III가 면역활성 효과능을 알기 위한 연구 접근방법 중 하나로 macrophage로부터 IL-1 $\beta$ 의 전사능과 분비능을 검사하였다. 본 연구에서는 BAIA-III로 macrophage를 자극했을 때 IL-1 $\beta$ 가 생산 분비된다는 것을 검사하기 위해 Immunoblotting 기법을 이용하였다. 이때 사용한 BAIA-III의 농도와 자극시간은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 배양시간인 8 시간이었다(data not shown). 이 실험결과, BAIA-III가 macrophage를 활성화시켜 IL-1 $\beta$ 이 분비됨을 확증해 주었다. 유럽산 겨우살이 렉틴 ML I, ML II, ML III는 사람 단구로부터 IL-1 $\beta$ 를 대조군보다 2~3배 더 분비하게 했다(Ribereau-Gayon et al., 1996). 그리고 터어키산 겨우살이의 알코올 추출물이 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 분비하게 한다고 보고했다(Yesilada et al., 1998). 그러나 갈조류 추출물의 IL-1 $\beta$ 분비 효과에 대한 보고는 아직까지 없다.

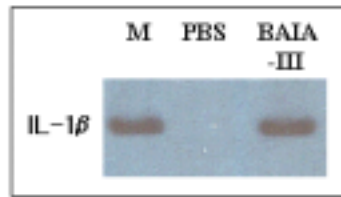


Figure 19. Immunoblot analysis of conditioned media obtained from PBS, BAIA-III stimulated macrophage using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$ . M represents marker for IL-1 $\beta$ .

#### 6) BAIA-III의 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 전사유도효과

BAIA-III가 면역계의 일차적인 면역반응에 주요한 macrophages 활성화의 지표인 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 한다는 것을 본 연구결과들에서 확실하게 밝혔다. Macrophages가 외부의 자극을 받아 TNF- $\alpha$ 를 분비하기까지 signal transduction에 의해 세포 내로 자극이 전달되며, 세포내 여러 작용기전들에 의해 여러 전사조절 물질들을 활성화시킨다(Tracey et al., 1987; Duncombe et al., 1990). 이러한 TNF- $\alpha$  분비가 BAIA-III로 macrophages를 자극했을 때 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자발현이 많이 일어남을 보여주었고, 발현정도는 BAIA-III 농도에 의존했으며, 100  $\mu\text{g/ml}$ 일 때 가장 많이 발현됨을 보여주었다 (Figure 20). 이러한 TNF- $\alpha$  전사기전에 protein kinase A, protein kinase C, cytosolic free calcium, MAPK(mitogen-activated protein kinase), IP<sub>3</sub>(inositol triphosphate) 등등 중에서 어떠한 signal transduction factor가 관련되어 있는 지에 대해서는 추후 심도 있는 다른 연구들을 요구하고 있다.

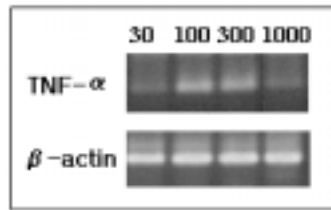


Figure 20. RT-PCR for mRNAs of the TNF- $\alpha$  and  $\beta$ -actin obtained BAIA-III treated macrophages.

6) BAIA-III의 대식세포로부터 IL-1 $\beta$ 의 전사유도효과

Macrophages가 BAIA-III의 자극을 받아 IL-1 $\beta$ 를 분비하기까지 signal transduction에 의해 세포내 여러 작용기전들에 의해 여러 전사조절 물질들을 활성화시킬 것이라 유추되었다. 그래서 본 실험에서도 IL-1 $\beta$  유전자의 전사와 해독의 관계를 알기 위해 RT-PCR기법을 이용하였다. 실험결과, IL-1 $\beta$  mRNA의 전사는 IL-1 $\beta$  단백질분비 결과처럼 BAIA-III의 농도에 의존했으며, 최대 효과농도는 100 $\mu$ g/ml이었다(Figure 21). IL-1 $\beta$ 는 대식세포의 활성화의 지표인 TNF- $\alpha$ 와 더불어 대식세포가 분비하는 주요한 cytokine이며, T-림프구 및 B-림프구의 증식, 분화, 활성화에 관여하는 면역물질 중 하나이기에 M11C의 면역활성 효능검사에 좋은 잣대가 된다.

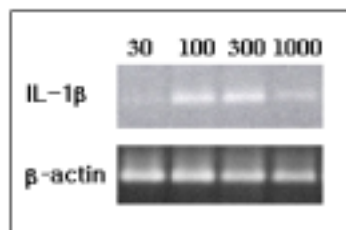


Figure 21. RT-PCR for mRNAs of the IL-1 $\beta$  and  $\beta$ -actin obtained BAIA-III treated macrophages.

7) Small intestinal epithelial cell (IEC-6)로부터 IL-1 $\beta$ 분비유도 효과

특히 epithelial cell은 소화기 면역에서 중요한 영역을 차지하고 있다. 그리고 경구투여 면역증강물질은 소화기면역기전을 활성화시켜야 면역증강물질로서의 소기의 목적을 달성할 수 있다. 본 물질인 BAIA-III가 경구면역촉진제 즉 소화기면역활성제로서 면역약리효능을 알아보기 위한 목적으로 이 실험을 수행했으며, 이를 위해 BAIA-III가 소화기면역계에 주요한 장상피세포의 활성화에 미치는 영향을 알기 위해 IEC-6로부터 IL-1 $\beta$ 의 분비유도능을 검사하였다. BAIA-III가 장기면역에서 주요한 세포인 소장상피세포를 활성화 시켰으며, 활성화의 표지인 IL-1 $\beta$ 를 많이 분비하게 했다(Figure 22). 이 사이토카인은 1차면역세포인 T림프구, B 림프구, 각종 항원제공세포들을 활성화시키는 물질이기에, BAIA-III가 소장상피세포로 하여금 이 사이토카인을 많이 분비하게 함으로서 소장면역을 증가시킨다고 사료되어진다.

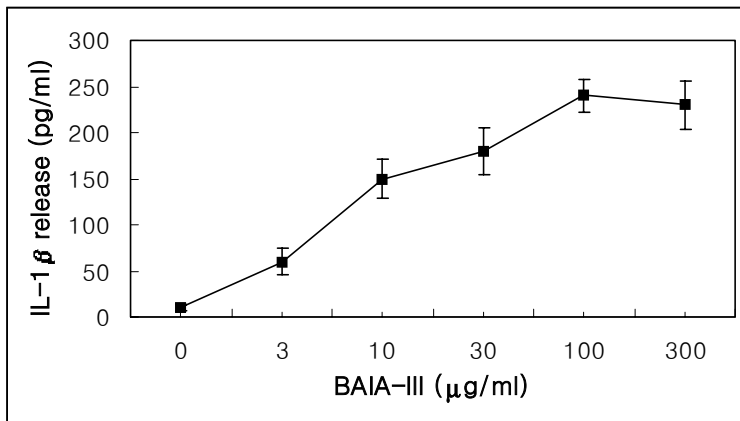


Figure 22. The effect of BAIA-III on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) release from IEC-6 cells.

8) Small intestinal epithelial cell (IEC-6)로부터 IL-6 분비유도 효과

BAIA-III가 경구면역촉진제 즉 소화기면역활성제로서 면역약리효능을 알아보기 위한 목적으로 이 실험을 수행했으며, 이를 위해 BAIA-III가 소화기면역계에 주요한 소장 상피세포의 활성화에 미치는 영향을 검사했다. 본 실험에 사용된 소장 상피세포 IEC-6의 활성화의 지표로서 T-림프구, B-림프구, 대식세포의 증식, 분화, 활성화에 관여하는 IL-6(McGee et al. 1993)의 분비유도능을 검사하였다. 본 갈조류 추출물질인 BAIA-III가 장기면역에서 주요한 세포인 소장상피세포(IEC-6)를 활성화 시켰으며, 활성화의 표지인 IL-6을 많이 분비하게 했다 (Figure 23). 이 IL-6은 1 차 면역세포인 T림프구, B 림프구와 각종 항원제공세포들을 활성화시키는 물질이기에, BAIA-III가 소장 상피세포로 하여금 IL-1 $\beta$ , IL-6 이들 사이토카인들을 많이 분비하게 함으로서 (Figure 22, 23) 소장면역을 증가시킨다고 사료되어진다.

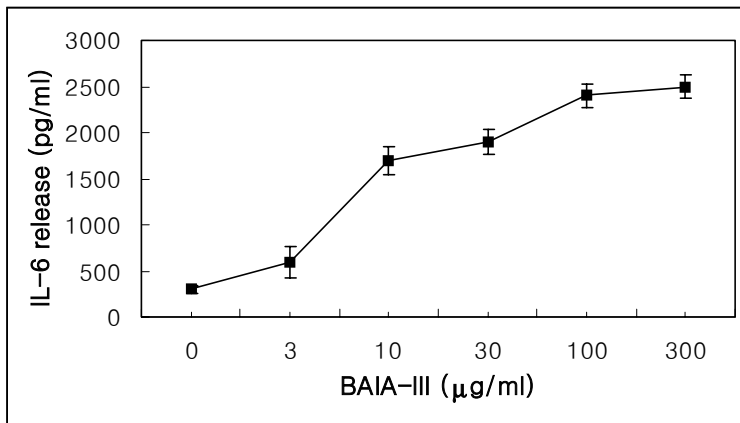


Figure 23. The effect of BAIA-III on IL-6 release from IEC-6 cells.

9) Mouse spleen cell에 미치는 독성

본 갈조류 추출물 BAIA-III가 면역활성에 지대한 효과가 있다해도 생체

내에 독성이 있으면 아니 되기에 세포 독성에 대한 안정성 검사를 실시하였다. 본 추출물인 BAIA-III가 정상 세포에 대한 세포 독성 유무를 알기 위해 마우스의 비장세포를 가지고 연구를 수행하였다. 본 갈조류 추출물질이 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 비장세포에 세포 독성효과를 주지 않았음이 나타났으므로(Figure 24), *in vitro* 안정성 문제에 대해서는 염려할 바가 없음을 제시했다. 그렇지만 *in vivo* 안정성 검사로써 신장 및 간에 미치는 독성 검사 그리고 성장 발육에 미치는 영향 등을 추후 심도 있게 연구해야할 과제로 남겨두고 있다.

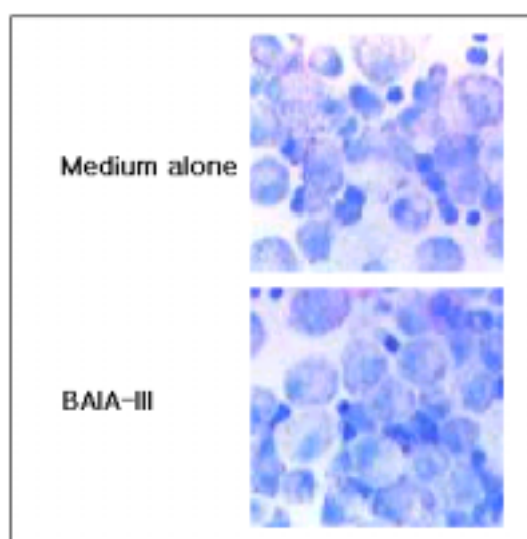


Figure 24. The cytotoxic effect of medium alone and BAIA-III (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) -stimulated splenocytes.

#### 10) 성숙 mouse의 체중에 미치는 영향

앞의 여러 실험에서 BAIA-III가 대식세포 및 소장 상피세포를 활성화하며 면역활성효과가 있음을 강하게 제시하였다. BAIA-III가 면역활성에 지대한 효과가 있고 세포독성이 없더라도 생체 내에 독성이 있으면 아니 되기에, 신체

발육에 미치는 독성에 대한 안정성 검사를 실시하였다. 그리고 약물이 체중증가에 미치는 영향은 안전성검사에 좋은 잣대로 이용되고 있다(Pal et al., 1997; Gaal and Hudeez, 1998). BAIA-III를 10일 이상 투여해도 체중감소와 같은 부작용이 나타나지 않은 것으로 보아(Figure 25), 앞으로 더 많은 간 및 신장 독성 검사를 해야겠지만 일단 성장에는 독성이 없는 것으로 보인다.

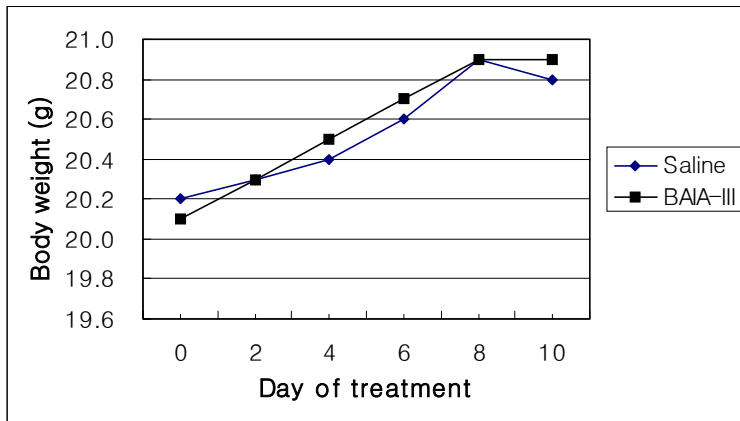


Figure 25. The effect of saline and BAIA-III on the body weight of mature mouse.



## 제 5 절 적 요

육상식물의 방어물질들 중의 하나인 식물 렉틴의 이화학적 성질, 특성, 작용 및 기능 등에 대해 오랜 기간동안 많은 연구가 수행되어 왔지만, 해상식물 렉틴에 대한 연구는 전무한 상태이다. 삼면이 바다에 접하고 있고, 많은 종류의 해조류를 오랜 옛날부터 섭취해온 우리 한국 국민에게는 이젠 해상식물인 해조류의 기능성물질, 특히 해조류 렉틴에 대해 관심을 가지고 깊이 연구하는 것이 우리만이 가질 수 있는 국제경쟁력이 있는 좋은 연구과제라 생각했었다. 이러한 배경 위에 본 연구가 시작되었다. 해조류 중 갈조류 렉틴의 면역증강효과에 초점을 맞추어 연구한 결과 아래와 같은 좋은 결과를 얻었다.

1. 갈조류로부터 추출한 1차 면역 기능성 물질인 brown algae immune agent-I (BAIA-I)의 macrophage에 대한 면역활성 검사에서 갈조류인 툇, 갈태, 듄북(모자반) 중에서 대체로 툇이 면역활성이 높았다.

2. BAIA-I의 렉틴활성 검사에서 갈조류의 non-heating 상태가 heating 상태보다 혈액응집활성 즉 렉틴활성이 높았다.

3. 전기영동 분석결과 2차 갈조류 추출물인 BAIA-II는 환원상태에서 넓은 범위에서 단백질 밴드가 관찰되었으나, 특히 32 kD와 33 kD 단백질이 다른 단백질 밴드에 비해 뚜렷하게 나타났다.

4. 전기영동 분석결과 3차 갈조류 추출물인 BAIA-III는 환원상태에서 두 단백질 32kD와 33kD 밴드만 나타났다. 비환원상태에서는 약 65kD인 하나의 밴드만이 나타났다. 이로서 이 두 물질(32kD와 33kD)를 나타내는 밴드는 이황화 결합을 하고 있는 이형이합체 단백질을 시사했다. 크로마토그램 기법을 이용한 분석은 이러한 결과를 더 확인시켜 주었다.

5. BAIA-I, BAIA-II, BAIA-III 모두 혈액응집 효과를 가졌다. 특히 BAIA-III는 다른 물질에 비해 더 높은 응집효과를 보였는데, 적혈구 응집반응

을 위해 요구되는 최소의 농도는  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, galactose, N-acetyl-galactoseamine, mannose에 특이성을 가지는 lectin으로 확인되었다.

6. BAIA-I, BAIA-II, BAIA-III가 대식세포로부터 많은 량의 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 Interleukin- $1\beta$ 의 분비를 유도했다. 이러한 결과는 BAIA-I, BAIA-II, BAIA-III가 면역증강제로서의 이용가능성을 시사하였다.

7. 갈조류의 최종 추출물인 BAIA-III는 대식세포로부터 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 interleukin- $1\beta$ 의 mRNA를 전사유도 했는데, 이 결과는 '6'항의 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 Interleukin- $1\beta$  해독의 결과를 더욱 더 확인시켜 주었다.

8. BAIA-III가 소화기면역에 있어 주요세포 중의 하나인 small intestinal epithelial cell로부터 interleukin- $1\beta$ 와 interleukin-6 분비를 유도했다. 소화기면역 증강제로서의 이용가능성을 암시하였다.

9. BAIA-III가 면역활성에 지대한 효과가 있다해도 생체내에 독성이 있으면 아니 되기에 세포 독성에 대한 안정성 검사를 in vitro 실험 결과 세포독성이 없음이 확인되었다.

10. 세포독성 시험에서 BAIA-III의 안정성을 보였기에, mouse 성장에는 어떠한 영향을 미치는 지 알기 위해 성숙한 마우스의 체중증감 조사를 실시하였다. 실험한 결과 대조군에 비해 유의한 차이가 없으므로 성장에 위해하지 않는 것으로 유추되었다.

결론적으로, 해조류 중 갈조류 추출물인 BAIA-III는 독성이 없는 좋은 면역증강제로서 작용을 보이기에, 면역기능성 동물사료 첨가제 이용가능성을 제시하고 있으며, 앞으로 면역약리 동물약품 이용가능성을 암시하고 있다.

## 제 6 절 참고문헌

- Aparicio CL, Berthiaume F, Chang CC, Yarmush ML. (1996) Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induces a reversible, time- and dose-dependent adhesion of progenitor T cells to endothelial cells. *Mol Immunol.* May-Jun;33(7-8):671-80.
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. (1996) *Protein method.* 2nd Ed. Wiley-Liss Press.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666.
- Dinarello, C. A. (1989) Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44:153-205.
- Duncombe AS, Meager A, Prentice HG, Grundy JE, Heslop HE, Hoffbrand AV, Brenner MK. (1990) Gamma-interferon and tumor necrosis factor production after bone marrow transplantation is augmented by exposure to marrow fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Blood.* Sep 1;76(5):1046-53.
- Elgavish S, Shaanan B. (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci.* Dec;22(12):462-7.
- Fomsgaard A, Worsaae H, Bendtzen K. (1988) Detection of tumour necrosis factor from lipopolysaccharide-stimulated human mononuclear cells by enzyme-linked immunosorbent assay and cytotoxicity bioassay. *Scand J. Immunol.* Feb;27(2):143-7.
- Franz H., Ziska P. Kindt A. (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). *Biochem. J.* 195:481-484.
- Franz H. (1988) The ricin story, In: *Advances in lectin research*, Vol 1, ed. by Franz H. pringer-Verlag, pp 13-19.
- Gaal, D., Hudecz, F. (1998) Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin by conjugation to an immunopotential amphoteric

- branched polypeptide. *Eur J Cancer*. 34(1):155-61.
- Gao JX, Issekutz AC. (1996) Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2(CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology*. Jul;88(3):463-70.
- Gery, I., Gershon, R. K., Waksman, B. H. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J Exp Med*. Jul 1;136(1):128-142.
- Goeddel DV, Aggarwal BB, Gray PW, Leung DW, Nedwin GE, Palladino MA, Patton JS, Pennica D, Shepard HM, Sugarman BJ et al. (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:597-609.
- Goldstein IJ, Hayes CE. (1978) The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydrate Chem Biochem* 35:127-340.
- Goldstein IJ, Hughes RS, Minsigny M, Osawa T, Sharon N. (1980) *Nature* 285:665-666.
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius, HJ. (1990) Increased secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 by human mononuclear cells exposed beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res*. 50(11):3322-3326.
- Jackson CJ, Nguyen M. (1997) Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol*. Oct;29(10):1167-77.
- Jeffrey DH, Eliza MS, Andrew PL. (1990) Macrophage tumor necrosis factor-alpha release is induced by contact with some tumors. *J Immunol*. Jul 1;145(1):371-9.
- Johnson L Ione, Patricia A Sullivan, Po-Chuen Chan, Joseph LoBue, Franis C Monette, Albert S Gordon. (1967) Studies on the response of rat lymphocytes to phytohemagglutinin. *Ann NY Acada Sci*. 807-822.
- Kang TB, Chae DJ, Chang SH, Mun SH, Kim JB, Her E. (2000) The effect of Korean mistletoe extract M11C(Non-lectin components) on TNF- $\alpha$

- release and expression from macrophages. *Korean J. Immunol.* 22(4), 207-215.
- Mannel DN, Becker H, Gundt A, Kist A, Franz H.(1991) Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 33(3):177-182.
- Mary JB, Michael JW, Thomas WM, Michael PM. (1991) Detection of tumor necrosis factor- $\alpha$  from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J Immunol Methods* 140:15-22.
- McGee DW, Elson CO, McGhee JR (1993) Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect Immun* Nov;61(11):4637-44.
- Olsnes, S., Stripe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1982) Isolation and characterization of viscum , a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem.* 257:13263-13270.
- Pal, S., Mukherjea, K., Bhattacharya, R., Maity, P. (1997) Pt-ATP as an antineoplastic agent in an experimental mice model system. *J Exp Clin Cancer Res.* 16(3):255-60.
- Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R. (1996) Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* Dec 3;109(1-2):33-38.
- Rudiger H. (1984) On the physiological role of plant lectins. *Bioscience* 34:95-99.
- Scheer R. (1993) The effect of mistletoe lectins on the limulus amebocyte lysate test. *Arzenimittelforschung*, Jul;43(7), 975-800.
- Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* Mar;26(3 Pt 1):265-74.
- To SS, Newman PM, Hyland VJ, Robinson BG, Schrieber L. (1996)

- Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro. *Arthritis Rheum.* Mar;39(3):467-77.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* Dec 17-23;330(6149):662-4.
- Yesilada E, Deliorman D, Ergun F, Takaishi Y, Ono Y. (1998) Effects of the Turkish subspecies of *Viscum album* on macrophage-derived cytokines. *J Ethnopharmacol.* Jul;61(3):195-200,
- Yoon, TJ., Yoo, YC., Kang, TB., Shimazaki, K., Song, SK., Lee, KH., Kim, SH., Park, CH., Azuma, I. and Kim, JB. (1999) Lectins isolated from Korean mistletoe induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* 136:33-40.
- Wong GHW, Goeddel DV. (1986) Tumour necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 323:819-822.

# 제 3 장 해조류 중 갈조류 및 면역기능성 추출 부산물의 첨가사료의 제조 산업화 연구

## 제 1 절 해조류 중 갈조류의 영양적 가치에 관한 연구

### 1. 서 론

우리 나라는 삼면이 바다이고 북상하는 난류와 남하하는 한류가 교류하는 지역적인 특성으로 인하여 해조류의 서식이 다양하고 풍부하다. 지금까지 조사 보고된 것에 의하면 우리 나라 연안에 생육하는 해조류는 63과 178속 414종으로, 이를 종류별로 보면 녹조류(*Chlorophyceae*) 11과 16속 61종, 갈조류(*Phaeophyceae*) 17과 46속 95종, 홍조류(*Rhodophyceae*)가 32과 11속 247종, 남조류(*Cyanophyceae*)가 3과 5속 11종이 있다(강제원, 1966).

이들 해조류는 예로부터 식용으로 뿐만 아니라 그 밖에 사료, 도료, 약용, 해조공업원료 및 비료 등으로도 이용되어 왔으나, 아직도 미이용 해조자원이 많고 그 효용성에 관한 새로운 접근이 시도되고 있으며, 이의 다각적이고 효율적인 개발은 자원의 활용이라는 측면에서 그 의의가 크다고 할 수 있다.

해조류의 사료 자원화에 있어 가장 선행적인 요건이라고 할 수 있는 해조류의 영양적 가치 평가에 대한 연구가 우리 나라에 있어서는 활발치 못한 실정으로 이에 대한 실질적인 연구보고가 많지 않다.

해조류의 일반성분 조성에 관하여 박영호 등(1976)의 보고가 있고, 해조류의 단백질 및 아미노산 조성에 대하여는 권태완과 이태영(1960)의 보고가 있으며 해조류 지질에 대하여는 하봉석(1977)의 보고가 있다. 해조류의 무기성분에 대하여는 이종호 등(1974)과 김장양과 원종훈(1974)의 보고가 있으며, 해조류의 색도에 대하여는 이강호(1969)의 보고가 있고, 해조류의 대사 에너지 함량 평가에 관한 연구에 대하여는 김은미 등(1996)의 보고가 있다.

해조류는 바다라는 특수한 환경에서 생육하고 있는 까닭에 높은 삼투압이나 밀도가 높은 환경에 적응하기 위하여 조체를 이루고 있어 성분들이 육상

식물의 성분에 비하여 그 구조가 매우 복잡한 것들이 많고 그들의 결합양식조차도 확실하게 구명된 것이 그리 많지 않은 실정으로 해조류를 고도로 이용하기 위해서는 그들의 성분에 관한 상세한 연구가 보다 활발히 이루어져야 할 것이다.

해조류의 각 성분들은 계절·산지·채취후의 저장시일·부위 및 종류 등에 따라 상당한 차이를 보여준다. 해조류에는 다량의 탄수화물과 단백질이 함유되어 있으나 이들 탄수화물과 단백질은 난소화성 물질로 산이나 알칼리에도 비교적 안정적이고, 특수한 세균효소에 의하지 않고는 가수분해되기 어려워 섭취하였을 때 소화율이 떨어져 해조 식품의 열량가는 여러 생리학적 연소열가로 계산한 수치보다 낮은 김 52%, 미역 32%로 보고하였다(강명희 등, 1976).

해조류는 건물 기준으로 40%~65%정도가 탄수화물로 이루어져 있고(Amano, 1991; 조득문 등, 1995), 이들 탄수화물의 대부분은 육상식물에서는 분포가 적은 독특한 구조를 한 것이 많은 것으로 알려져 있다(Mackie와 Preston, 1974). 해조분을 돼지 사료에 3%까지 첨가 수준 증가시 조단백질, 조지방 및 칼슘의 소화율이 현저히 떨어지고(Bae 등, 1999), Dyer(1959)는 해조류에 함유되어 있는 미량 광물질과 비타민, 아미노산 등을 분석하여 사료로 이용할 수 있다고 하였다.

해조류에 대한 국·내외 연구 결과를 살펴보면 외국에서는 주로 광물질이나 비타민 공급원으로 연구가 중점적으로 이루어지고 있고 국내에서는 사료난 극복을 위한 갈조류 대치 및 농후사료 대치 등의 연구가 행하여졌으나, 최근에는 해조류 특히 갈조류의 기능성 물질에 대한 생리작용의 효과에 관한 보고로 활용가치가 새롭게 인식되고 있다.

따라서 본 실험은 우리 나라 제주연안과 남해안 및 독도 유역에 분포하며 풍부한 갈조류 중 대표적인 감태(*Ecklonia cava*), 다시마(*Kjellmaniella crassifolia*), 툃(*Hizikia fusiforme*)의 영양적 가치를 분석 비교하고, 주로 식사의 먹이나 공업용 원료로만 활용되고 있는 감태에 대하여 산란중계 수탉을 공시하여 에너지 이용률과 아미노산 이용률의 기초적 자료를 제공하여 이들을 사료 자원화를 하고자 본 연구를 실시하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 시험설계

해조류 중 갈조류의 영양적 가치 평가를 위하여 수집된 원료의 일반성분 및 비타민, 광물질, KOH 용해도, 색소, 중금속 및 지방산 조성을 분석하였고, 감태의 진정대사에너지(TME)와 진정아미노산이용률(TAAA)을 조사하기 위하여 55주령 된 산란종계(ISA-Brown) 수탉을 이용하여 측정하였다. 시험구는 산란종계 수탉을 절식구 8수, 감태 급여구 8수 총 16수를 완전 임의배치 하였다.

### 나. 실험원료

실험에서 사용된 해조류는 감태(*Ecklonia cava kjellman*), 다시마(*Kjellma -niella crassifolia*), 툃(*Hizikia fusiforme*) 등 제주도 일대에서 자생하는 갈조류를 수집하여 자연상태 그대로 햇볕에 건조시킨 후, 150HP(horse power) 햄머밀(hammer mill)로 분쇄하여 사용하였다.

### 다. 조사 항목 및 조사 방법

#### 1) 일반성분, 비타민, 광물질, 중금속 및 색소 함량

일반성분 즉, 수분, 조단백질, 조섬유, 조지방, 조회분, 칼슘, 인, NaCl과 비타민 A, B<sub>2</sub>, E의 분석은 AOAC(1990)방법에 따라 실시하였고, xanthophyll, lutein, zeaxanthin은 Manz(1983)의 방법에 의하여 분석하였다.

#### 2) 단백질 KOH 용해도

단백질 용해도는 Araba와 Dale(1990)의 분석법에 따라 0.2% KOH용액에 사료를 용해시키고 원심분리 후 Kjeldahl method로 단백질을 측정하여 조단백질과의 비율로 나타내었다.

### 3) 지방산 조성

감태, 다시마, 톳의 지방산 전처리에는 Sukhija와 Palmquist(1988)의 방법으로 실시하였다. 원료를 분쇄기를 이용하여 잘게 분쇄한 다음, 15cm×2.5 teflon-lined screw cap culture tube에 원료를 정확하게 1g을 넣었다. 그리고 internal standard가 함유된 benzene 1 ml, 5% methanolic HCl 3 ml를 천천히 넣고 culture tube의 뚜껑을 닫고 천천히 1분간 vortex 하였다. 뚜껑을 단단히 막은 뒤 90℃ water bath에서 2시간 배양하였다. 시료가 상온이 되면 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml와 benzene 2 ml를 첨가한 뒤 tube의 내용물을 중간 속도로 30초간 vortex 후에 1500rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

상층의 organic phase(benzene 층)를 pipette을 이용하여 다른 tube에 옮긴 후 anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g을 넣고 30초간 vortex한 후 1시간 동안 방치하였다. tube를 다시 5분간 1500 rpm으로 원심 분리한 후 methyl ester가 함유된 상부의 맑은 benzene 층을 주사제 병에 넣은 후 gas chromatography (VARIAN CX-3800)에 injection하였다. Column은 Omegawax 30 m×0.25 μm×0.25 mm을 이용하였고, 초기 온도는 140℃에서 분당 5℃씩 승온시켜 최종 온도를 230℃로 하였다. Injection과 Detector port의 온도는 각각 250℃와 260℃로 하였다. 총 running time은 35분으로 고정하였다.

### 4) 진정대사에너지(TME<sub>n</sub>)

TME 측정을 위해 Sibbald(1976)가 고안한 강제급여(force-feeding)방법을 사용하여 실시하였다. 55주령 ISA-Brown 종계 수탉 16수를 공시하여 니플이 설치된 2단 알루미늄 케이지에 임의 배치한 후 일반 시판사료로 사육하고, 강제급여를 시작하기 전에 24시간동안 절식시켰다. 그 후 절식구와 감태 처리구를 8수씩 임의배치하고 각각 30g씩 강제급여 시킨 후 48시간(Sibbald, 1979b)동안 배설된 모든 배설물을 채취하였다. 채취된 모든 배설물은 깃털과 이물질 등을 제거한 후 60℃에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄하여 분석에 이용하였다.

각 사료와 배설물을 건조 후 bomb calorimeter(Parr 1261, USA)를 사용하여 gross energy를 측정하여 대사에너지를 계산한 후 사료에 기인되지 않은 대사성 분 에너지와 마멸된 장점막, 담즙, 소화액 등의 에너지를 포함한 내인

성 노에너지를 보정하여 TME<sub>n</sub>은 질소가 체내에서 0인 상태로 보정하여 체내 축적에 의한 배설물의 변이를 줄여준 것이다. 질소를 보정할 때는 8.22(Hill과 Anderson, 1958)와 8.73(Titus 등, 1959)의 2가지 상수가 쓰인다. 8.22는 요산을 유일한 질소배설물로 보았을 경우의 에너지가이다. 여기서는 8.73을 상수로 하여 계산하였다.

TME(kcal/g)의 계산식은 다음과 같다(Sibbald, 1976).

$$\text{TME(kcal/kg)} = \frac{(\text{G.E.f} \times \text{X}) - (\text{Yef} - \text{Yec})}{\text{X}}$$

G.E.f is the gross energy of the feedstuff (kcal/g)

Yef is the energy voided as excreta by the fed bird (kcal/g)

Yec is the energy voided as excreta by the unfed bird (kcal/g)

X is the weight feedstuff fed (g)

TME<sub>n</sub>의 계산식은 다음과 같다(Dale과 Fuller, 1984).

$$\text{TME}_n(\text{kcal/kg}) = \frac{\text{GE}_i - [\text{EE}_f + (\text{Ni} - \text{Ne}) \times 8.73] + [\text{EE}_e + (\text{Ni} - \text{Ne}) \times 8.73]}{\text{g intake}}$$

GE<sub>i</sub> = Gross Energy ingested (kcal)

EE<sub>f</sub> = Energy Excreted by fed birds

EE<sub>e</sub> = Energy Excreted by fasted birds (endogenous)

Ni - Ne = Nitrogen Balance (N ingested - N excreted)

##### 5) 진정 아미노산 이용률(TAAA)평가

TAAA는 Sibbald(1976)가 제시한 TME 측정방법과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다(Likuski와 Dorrell, 1978; Sibbald, 1979a).

원료와 분내의 아미노산 조성은 6N HCl 용액을 사용하여 110℃에서 22 시간동안 가수분해시킨 다음(Spackman 등, 1958), 아미노산 자동 분석기(Hitachi L-8500A)를 이용하여 아미노산 질량을 측정하였고 Met과 Cys를 가수분해 전에 formic acid로 산화시킨 후(Moore, 1963)분석하였다.

TAAA의 계산식은 다음과 같다(Likuski와 Dorrell, 1978).

$$\text{TAAA}(\%) = \frac{\text{AAc} - (\text{AAv} - \text{AAvf})}{\text{AAc}} \times 100$$

AAc = the total amount of AA consumed by the fed rooster

AAv = the total amount of AA voided in excreta by the fed rooster

AAvf = an average of total amount of AA voided by the fasted control rooster

라. 갈조류의 건조 및 분쇄에 따른 물리적 변화 조사

1) 인공건조 후 일반성분분석

수집한 갈조류 중 감태, 다시마, 톳을 dry oven에서 인공건조 후(60℃, 3일), 각각의 일반성분 분석을 AOAC(1990)방법에 따라 실시하였다.

2) 자연건조 된 감태의 입자도(particle size)와 용적중(bulk specific weight)

가) 입자도(particle size)

입자도 측정은 측정하고자 하는 샘플을 정확하게 계량하여 스크린 상부에 넣고, 스크린을 진탕기로 충분히 진탕시켜 각 스크린에서 충분히 빠질 수 있도록 충분한 진탕시간을 주고, 각 스크린의 잔량을 중량 측정하고 잔량을 전체에 대한 백분율로 환산하여 U.S.A. 기준 Z23.1 표준망체(청계상공사)를 이용하여 입자도를 계산하였다. 이 때 스크린 규격은 U.S.B.S 기준으로 하였다(#8-2.38mm, #12-1.68mm, #20-0.84mm, #35-0.50mm).

나) 용적중(bulk specific weight)

용적중을 측정하기 위해 깔대기에 측정하고자 하는 샘플을 가득 채운 후, 깔대기 밑의 뚜껑을 열어 샘플이 1리터 컵에 자연 낙하하도록 하고 이들 샘플이 눌리지 않도록 자를 이용하여 1리터 컵의 샘플을 수평으로 잘라내고 전자저울을 이용하여 1리터 컵에 담긴 샘플의 중량을 측정하여 비중(g/ℓ)으로 하였다. 이 때 주의해야 할 것은 비중 측정시에는 비중측정기가 교정검사 유효기

간을 경과하지 않았는지 확인하고 반드시 1리터 컵에 샘플이 넘치도록 충분한 양의 샘플을 준비하였다.

마. 통계분석

실험에서 얻어진 자료들의 통계분석은 statistical analysis system(SAS, 1996)의 general linear model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 통해 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 일반성분분석

자연건조 시킨 3종의 갈조류 즉, 감태, 다시마, 툇의 일반성분 및 KOH 용해도를 Table 5에 나타내었다.

수분 함량은 감태 9.96%, 다시마 7.09%, 툇 10.41%로 일반적으로 옥수수 12%~14%, 소맥 10%~12%, 소맥피 8%~12% 등과 비교할 때 사료 원료로 사용이 가능한 수준이었다.

본 연구에서 사용된 감태의 조단백질은 10.29%로 Morrison(1959)의 6.5%, Ewing(1951)의 5.6%, 양형호(1964)의 3.28%보다 높았다. 3종의 갈조류의 조지방 함량은 감태가 0.73%로 양형호(1964)의 1.02%보다 낮았으며, 다시마는 0.85%, 툇은 0.75%로 김형균(1974)의 0.05%~0.16%, 한인규(1970)의 1.16%, Ewing(1951)의 0.5%와 차이가 있었다.

조섬유 함량은 감태 36.4%, 다시마 34.06%, 툇 37.09%로서 김형균(1974)의 해조류 4.5%~8.7%, 혼합해조류는 8.1%라는 보고와 한인규(1970)의 7.5%와 Ewing(1951)의 6.5%보다 훨씬 높은 조섬유 함량을 보였다. 이는 선행된 연구 결과가 해조류의 종류에 대한 언급이 없어 직접적인 비교가 어려우나 이는 해조류의 각 성분들이 종류, 계절, 산지, 채취부위 및 저장시일 등에 따라 상당한 차이가 있다는 박영호(1968)의 보고와 관련이 있는 것으로 사료된다.

3종의 갈조류 광물질 성분 중 감태의 칼슘 함량은 1.27%였고, 다시마 1.29%, 툇 1.42%였다. 김형균(1974)은 해조류의 칼슘 함량은 1.7%~6.1% 분포를 나타냈으며 혼합해조류는 3.1%라고 보고하였고, Ewing(1951)은 해조류의 칼슘 함량은 1.68%라고 보고하였다. 인 함량에 있어서 감태가 0.25%, 다시마 0.14%, 툇 0.20%였다. 김형균(1974)은 해조류의 인 함량을 0.10%~0.14%, 혼합해조류는 0.21%라고 보고하였는데, 본 연구 결과와 비교시 해조류의 광물질 함량은 조단백질과 조지방 및 조섬유 등과는 달리 해조류의 종류에 따라 비교적 큰 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

한편, 바다에서 자생하는 식물이라는 특성 때문에 NaCl 함량이 감태 10.61%, 다시마 13.53%, 툇 1.96%로 매우 높았으며, 김형균(1974)의 해조류의

Na 함량 2.75%~3.25%, Ewing(1951)의 4.3%라는 보고 보다 높았다. 이는 해조류 채취 후 세척, 수침 등 건조 전 처리방법에 따른 차이가 있다고 사료된다. 따라서 해조류를 사료화하기 위해서는 NaCl 함량을 반드시 측정해야 하고 그 결과를 충분히 고려하여 사료배합에 신중을 기할 필요가 있다.

자연건조 시킨 3종의 갈조류 감태, 다시마, 툇의 KOH 용해도는 54%~59%로 낮은 수치를 보였다. 이는 일반적으로 대두박의 KOH 용해도 70%~85% 그리고 채종박 60%~80%인 것과 비교시 KOH 용해도가 낮은 편이지만 면실박의 KOH 용해도가 30%~40%인 것에 비하면 단백질의 이용면에서 사료적인 가치가 있다고 사료된다. 3종의 갈조류의 총에너지 함량은 감태 3,600kcal/kg, 다시마 2,889kcal/kg 및 툇 3,299kcal/kg이었다.

Table 5. Nutritional value, KOH solubility and gross energy of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme*(as fed basis)

Items	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
Moisture, %	9.96	7.09	10.41
Crude protein, %	10.29	9.00	11.43
Ether extract, %	0.73	0.85	0.75
Crude fiber, %	36.41	34.06	37.09
Ash, %	27.23	26.65	18.24
Ca, %	1.27	1.29	1.42
P, %	0.25	0.14	0.20
NaCl, %	10.61	13.53	1.96
KOH solubility, %	54.82	58.05	59.04
Gross energy, kcal/kg	3,600	2,889	3,299

#### 나. 비타민, 색소, 광물질 및 중금속 함량

자연건조 시킨 감태, 다시마, 툇의 비타민, 광물질, 중금속 및 천연색소 함량은 각각 Table 6, 7, 8에 나타내었다. 비타민 분석 결과 3종의 갈조류에서 비타민 A는 검출되지 않았는데, 한인규(1970) 또한 해조류의 비타민A의 함량이 5 IU/g 이하라고 보고한 것으로 보아 해조류들은 비타민 A를 낮게 함유하고 있거나 건조 등 가공과정에서 쉽게 파괴된 것으로 사료된다. 비타민 E는 감태, 다시마, 툇이 각각 99.6mg/kg, 74.6mg/kg, 36.4 mg/kg으로 한인규(1970)의 20.4mg/kg보다 높았고, 비타민 B<sub>2</sub>는 56.3 mg/kg, 7.4mg/kg, 5.3mg/kg로 옥수수 1.0mg/kg~1.4mg/kg, 소맥피 1.32mg/kg~1.5mg/kg, 대두박 2.8mg/kg~4.0mg/kg 보다 월등하였으며 비타민 B<sub>2</sub> 공급원으로 이용 가치가 있다고 사료된다.

3종의 갈조류의 천연색소함량은 감태가 lutein 함량이 1.6mg/kg으로 다시마 1.2mg/kg, 툇 0.3mg/kg에 비해 우수하였고, zeaxanthin 함량은 3.5mg/kg, xanthophyll 함량은 5.1mg/kg으로 다시마의 8.9mg/kg, 10.1 mg/kg보다 다소 낮게 나타났으며, 옥수수의 xanthophyll 함량이 17 mg /kg~22mg/kg인 것에 비해서 낮았으나 대두박 2.0mg/kg 및 소맥피에서는 검출되지 않는 것에 비해 이용가치가 있을 것으로 사료된다.

3종의 갈조류의 다량광물질 분석 결과 Mg 함량은 6,200mg/kg~7,600 mg/kg으로 나타났다. 미량광물질인 Zn 함량은 3종의 갈조류에서 20mg/kg~51mg/kg, Se는 0.27mg/kg~0.66mg/kg로 나타났다. Cd은 감태에서 2.0mg/kg으로 나타났고, 툇에서 1.5mg/kg으로 나타났으며 다시마에서는 검출되지 않았다. Cr은 3종의 갈조류 모두 검출되지 않았다. 조득문 등(1995)의 식용 해조류 중의 미량요소와 특수기능성 당질에 관한 연구에서 무기원소의 함량은 특히 채취시기에 따른 변동이 크다고 보고하였고, Cr은 해조의 종류, 채취장소, 채취시기에 따라 검출되지 않는 경우가 많았다고 보고하여 본 연구에서 Cr이 검출되지 않은 결과와 일치하였다. 한편 수산물의 중금속 잔류 허용량은 수은 0.5mg/kg 이하, 납 2mg/kg 이하, 그 외 중금속은 10mg/kg이하로 감태, 다시마, 툇은 안전한 사료원료로 사용할 수 있다고 사료된다.



Table 6. Vitamin contents of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme*(as fed basis)

Items	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
	----- mg/kg -----		
Vitamin A	ND	ND	ND
Vitamin E	99.6	74.6	36.4
Vitamin B <sub>2</sub>	56.3	7.4	5.3

ND : not detected

Table 7. Pigment contents of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme*(as fed basis)

Items	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
	----- mg/kg -----		
Lutein	1.6	1.2	0.3
Zeaxanthin	3.5	8.9	4.4
Xanthophyll	5.1	10.1	4.7

Table 8. Mineral contents of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme*(as fed basis)

Items	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
	----- mg/kg -----		
Mg	7,658	5,915	6,214
Zn	51.1	21.2	29.6
Cd	2.0	ND	1.5
Cr	ND	ND	ND
Se	0.66	0.62	0.27

ND : not detected

#### 다. 지방산 조성

자연건조 시킨 감태, 다시마, 툇의 지방산 함량은 Table 9에 나타내었다. 감태는 palmitic acid(C16:0) 26.75%, arachidonic acid(C20:4n6) 16.05%, oleic acid(C18:1n9) 15.06% 순으로 높았고, myristic acid(C14:0) 함량과 linoleic acid(C18:2n6) 함량도 각각 7.76, 6.89%로 비교적 높은 함량을 보였다. 다시마는 C18:1n9 함량이 21.25%, C16:0 20.08%, C20:4n6 14.96% 순으로 높았고, 툇은 C16:0가 33.55%, C20:4n6가 10.38,  $\alpha$ -linolenic acid(C18:3n3) 7.91% 순으로 높은 함량을 보였다. 또한 eicosapentaenoic acid(C20:5n3) 함량도 감태, 다시마, 툇에서 각각 4.02, 6.26, 6.57%로 높은 함량을 보였다.

하봉석(1977)은 해조류 지질의 지방산조성에 대한 조사에서 다시마의 지방산 조성은 C16:0(35.8%), C18:1n9(23.4%), C14:0, C16:1, C18:0(3.6) 순으로 높

고, 톳은 C16:0(18.1%), C18:2n6(6.7%), C18:3n3(6.1%), C22:0(5.4%), C18:1n9(4.7%) 순으로 높다고 보고한 바 있다. Jeong 등(1993)은 갈조류의 지방산은 C14:0, C18:1n9, linoleic acid(C18:2n6) 및 C20:5n3 지방산이 풍부하다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 이러한 선행 연구결과와 유사한 지방산 분포를 보였다.

해조류는 서식하고 있는 장소의 일사량에 의해 그 지질 함량이 달라지게 되고(Idler 등, 1970), 한대에서 생육하는 것이 온대보다 불포화 지방산이 많게 되는 등(山田, 1973) 해조류의 지질 함량 및 지방산 조성은 환경요인에 의해 많은 영향을 받게 된다. 3종의 갈조류의 지방산 함량 조사 결과 불포화지방산 함량이 높은 편이나 조지방 함량 자체가 모두 1%미만으로 사료 내 지방 공급 원으로서의 가치는 미미한 것으로 사료된다.

Table 9. Fatty acid compositions of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia*, and *Hizikia fusiforme*(%)<sup>1</sup>

Fatty acids	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
14:0	7.76 ±0.04	9.12 ±0.03	5.58 ±0.15
16:0	26.75 ±0.19	20.08 ±0.23	33.55 ±0.38
16:1n7	7.35 ±0.08	4.31 ±0.38	3.93 ±0.22
18:0	1.39 ±0.04	0.69 ±0.07	0.78 ±0.07
18:1n9	15.06 ±0.17	21.25 ±0.09	6.70 ±0.02
18:2n6	6.89 ±0.15	7.66 ±0.06	3.43 ±0.02
18:3n3	1.95 ±0.02	3.12 ±0.01	7.91 ±0.05
18:4n3	3.22 ±0.01	6.30 ±0.12	4.65 ±0.06
20:0	2.26 ±0.01	0.61 ±0.05	0.49 ±0.01
20:4n6	16.05 ±0.26	14.96 ±0.26	10.38 ±0.03
20:4n3	0.95 ±0.02	0.41 ±0.02	0.62 ±0.07
20:5n3	4.02 ±0.04	6.26 ±0.04	6.57 ±0.09
SFA	38.16	30.50	40.40
MUFA	22.41	25.56	10.64
PUFA	33.08	38.71	33.56
n3	10.13	16.09	19.75
n6	22.94	22.62	13.81
n3/n6	0.44	0.71	1.43

<sup>1</sup> Values are means ± S.E.

SFA : saturated fatty acid

MUFA : monounsaturated fatty acid

PUFA : polyunsaturated fatty acid

#### 라. 진정대사에너지(TMEn)

중계 수탈을 이용하여 자연건조 시킨 감태의 진정대사에너지(TME)와 질소보정 진정대사에너지(TMEn) 측정치를 Table 10에 나타내었다.

감태의 TME와 TMEn은 건물 기준으로 각각 1,849 kcal/kg, 1,577 kcal/kg이었다. Table 4에서 감태의 총에너지가가 3,600 kcal/kg 인 것에 비하면 감태의 TME가는 51% 가량에 불과하였다. 즉, 닭에 있어서 감태는 에너지의 생체이용율이 비교적 낮은 편으로 나타났다.

염월형 등(1976)의 닭에 있어서 해조분의 대사 에너지를 측정 결과 ME가는 1,538~1,707 kcal/kg 범위로 평균 1,667 kcal/kg이라고 보고하였고, 이는 옥수수 및 기타 곡류사료에는 미치지 못하나 강피류의 에너지가와는 대등하며 목초나 야건초 보다는 높은 ME가를 나타낸다고 하였다. 한편, 강명희 등(1976)은 흰쥐를 통한 외관상소화율을 이용한 에너지 평가는 일반성분 및 Atwater 계수를 이용해 산정한 에너지 평가에 비해 김 52%, 미역 32%, 파래 59%에 불과하다고 보고하였고, 김은미 등(1996)의 쥐를 이용한 당류 및 해조류의 대사에너지 함량 평가에 의하면 미역의 AME, AMEn은 건물 기준으로 3108.6, 3260.5 kcal/kg를 나타냈으며, 다시마는 건물 기준으로 1437.3, 1631.3 kcal/kg, 김은 건물 기준으로 3126.6, 3171.3 kcal/kg 보고하였다. 이렇게 해조류 종류나 연구자들간에 연구 결과가 다른 점에 대해서는 많은 논란이 있으며 해조류는 다량의 탄수화물과 단백질이 함유되어 있으나 이들 탄수화물과 단백질은 난소화성 물질로 산, 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 효소에 의하지 않고는 가수분해되기 어렵기 때문에 다른 식품에 비해서 소화율이 떨어지는 것으로 사료된다. 따라서 해조류나 해조식품의 열량가는 여러 생리학적 연소열가로 계산한 수치보다 훨씬 낮을 수도 있으므로, 해조류의 에너지 함량은 연구할 가치가 충분하다(강명희 등 1976).

Table 10. Energy values of *Ecklonia cava*(dry matter basis)

	TME	TME <sub>n</sub>
	-----kcal/kg-----	
<i>Ecklonia cava</i>	1,849	1,577

TME : True metabolizable energy

TME<sub>n</sub> : Nitrogen corrected true metabolizable energy

#### 마. 아미노산 조성과 진정 아미노산 이용률(TAAA) 평가

자연건조 시킨 3종의 갈조류와 감태부산물물의 아미노산 조성을 Table 11에, 종계 수탁을 이용하여 자연건조 시킨 감태의 진정 아미노산 이용률(TAAA)을 측정한 값은 Table 12에 나타내었다.

3종의 갈조류에서 필수아미노산 중에 leucine 함량은 감태, 다시마, 툫 각각 0.48, 0.47, 0.54%였고, lysine 함량은 0.36, 0.32, 0.43%로 나타났으며, methionine 함량은 0.20, 0.21, 0.22%였다. 비필수 아미노산 중 glutamic acid 함량은 감태, 다시마, 툫 각각 2.10, 2.76, 1.35%였다. cystine 함량은 감태, 다시마, 툫 각각 0.23, 0.23, 0.25% 였다.

감태, 다시마, 툫의 아미노산 조성을 전란(全卵)단백질 및 대두박과 비교할 때 아미노산 함량 자체는 낮으나 비교적 그 조성이 양호하였으며, threonine 함량은 단백질 함량 대비 높은 편이나 lysine과 methionine은 제한 아미노산으로서 고려되어야 할 것으로 사료된다. 한편, 한인규(1970)의 국산사료 성분 분석에 관한 연구에서 해조류의 lysine 함량은 0.32%, methionine 함량은 0.21%, cystine 함량은 0.14%로 본 시험 결과와 유사하였다.

감태의 평균 TAAA는 31.99 였고 감태의 평균 진정 아미노산 이용율이 낮은 이유는 Table 5에서 감태의 KOH 용해도가 54.82%인 것과 관련하여 단백질 이용율이 낮은 것과 해조류의 단백질은 난소화성 단백질인 것(김은미 등, 1996)에 따른 결과로 사료된다. 한편, 국내외 관련 여러 해조류의 아미노산 이용률에 관한 연구 결과를 찾을 수 없어 비교가 불가능하였고 향후 이러한 관

점에서 연구가 수행되어져야 할 것으로 사료된다.

Table 11. Amino acid composition of *Ecklonia cava*, *Kjellmaniella crassifolia* and *Hizikia fusiforme*(as fed basis)

Amino Acids	<i>Ecklonia cava</i>	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>
Essential amino acid(%)			
Valine	0.38	0.36	0.36
Methionine	0.20	0.21	0.22
Isoleucine	0.30	0.35	0.34
Leucine	0.48	0.47	0.54
Threonine	0.44	0.38	0.42
Phenylalanine	0.26	0.28	0.29
Lysine	0.36	0.32	0.43
Arginine	0.43	0.40	0.55
Non-essential amino acid(%)			
Aspartic acid	0.82	0.70	0.79
Cystine	0.23	0.23	0.25
Glutamic acid	2.10	2.76	1.35
Proline	ND	ND	ND
Serine	0.69	0.64	0.77
Glycine	0.46	0.53	0.64
Alanine	0.60	0.58	0.62

ND : not detected

Table 12. Amino acid composition and true amino acid availability of *Ecklonia cava* (as fed basis)

	Amino acid (%)	True availability (%)	TAAA <sup>1</sup> (%)
Essential amino acid			
Valine	0.38	14.05	0.05
Methionine	0.20	37.70	0.08
Isoleucine	0.30	22.72	0.07
Leucine	0.48	16.77	0.08
Threonine	0.44	32.72	0.14
Phenylalanine	0.26	4.20	0.01
Lysine	0.36	32.32	0.12
Arginine	0.43	34.83	0.15
Non-essential amino acid			
Aspartic acid	0.82	26.47	0.22
Cystine	0.23	25.97	0.06
Serine	0.69	59.97	0.41
Glutamic acid	2.10	62.36	1.31
Alanine	0.60	53.30	0.32
Mean		31.99	

<sup>1</sup> TAAA : True available amino acid



## 바. 갈조류의 건조 취급 방법 조사

### 1) 인공건조 후 일반성분분석

3종의 갈조류 즉 감태, 다시마, 툇을 dry oven에서 3일간 60℃에서 인공 건조 시킨 후, 일반 성분을 분석 한 결과 수분을 제외한 나머지 분석치는 자연 건조한 3종의 갈조류의 일반성분 분석치와 비교하였을 때 dry matter 기준으로 환산해보면 차이를 나타나지 않았다(데이터를 표시하지 않음). 다만, dry oven에서 3일 동안 1차적으로 수분을 제거해 주었기 때문에 인공건조한 갈조류의 수분함량들이 4.15~4.30% 범위(data를 나타내지 않음)로 자연건조한 갈조류의 수분 7.09~10.41% 보다 절반 수준으로 낮게 나타났을 뿐이다. 이러한 결과는 갈조류를 인공적으로 건조하였을 때 일반조성은 크게 변하지 않는다는 것을 의미하며, 특별히 인공적으로 건조시켜 추가적인 비용을 들여 가축의 사료화하는 과정은 불필요 할 것으로 사료된다.

일반적으로 갈조류들은 채취 후 해변에서 가까운 방파제나 해변 주위의 건조장에서 해풍과 햇볕으로 자연건조 후 수집하여 이용하게 된다. 따라서 인공건조를 하게 되면 별도의 열풍 건조기를 설치하는 비용이 추가되어 사료 가공상에 비용이 추가로 들어가게 되므로 건조 취급 방법에 따라 갈조류의 일반성분 함량이 차이가 나지 않으므로 해풍과 햇볕으로 자연건조 시킨 갈조류를 가축 사료로 사용하는 것이 보다 합리적일 것으로 생각된다.

### 2) 자연건조 된 감태의 입자도(particle size)와 용적중(bulk specific weight)

자연건조 된 감태의 입자도와 용적중은 Table 13에 나타내었다. 감태는 원물 상태를 1차로 150HP(horse power) 햄머밀(hammer mill)로 분쇄하여 각 스크린 별로 통과 시켜 전자저울로 중량 측정하여 백분율로 환산해 본 결과 가루 형태가 가장 많은 43.0%, 소립자 36.0%, 중립자 20.8%, 대립자 0.2% 순의 입자도를 나타내었다. 한편 용적중을 측정해 본 결과 603 g/l로 나타났다. 일반적으로 옥수수의 용적중을 650 g/l 정도라고 하는데 이보다는 다소 떨어졌으나 사료 배합시 큰 문제가 생길 정도의 용적중은 아닌 것으로 나타났다.

본 연구에서 감태만을 가지고 입자도와 용적중을 측정하였는데 이는 3종의 갈조류중 감태가 인간의 식생활과 직접적으로 경쟁되지 않고 식식자의 먹이나 공업용 원료로 사용되고 있으며, 유효한 기능성 물질을 함유하고 있기 때문이다. 또한 제 3 세부과제에서 육계의 생산성 및 내병성 실험시 감태를 실험 원료로 결정하였기 때문에 감태의 가축 사료화에 있어서 기초 자료를 제공하기 위해 3종의 갈조류 중 감태만 선정하여 입자도와 용적중을 측정하였다.

Table 13. Particle size and bulk specific weight of *Ecklonia cava*

	Sieve NO.	mm	weight(g)	portion(%)
대립자	6	3.35	-	-
	8	2.36	1	0.2
	소계		1	0.2
중립자	10	2.00	3	0.6
	12	1.70	13	2.6
	16	1.19	88	17.6
	소계		104	20.8
소립자	20	0.85	110	22.0
	25	0.71	70	14.0
	소계		180	36.0
가루			215	43.0
TOTAL			500	100.0
Bulk specific weight (g/ℓ)			603	

#### 4. 적요

갈조류 중 대표적인 감태(*Ecklonia cava*), 다시마(*Kjellmaniella crassifolia*), 툃(*Hizikia fusiforme*)의 영양적 가치를 분석 비교하고, 주로 식사의 먹이나 공업용 원료로만 활용되고 있는 감태에 대하여 산란종계 수탉을 공시하여 에너지 이용률과 아미노산 이용률의 기초적 자료를 제공하여 이들을 사료 자원화를 하고자 본 연구를 실시하였다.

본 실험은 감태, 다시마, 툃의 화학적 성분 및 영양적 가치 평가를 위하여 실시하였다. 풍건물 기준 화학적 성분에 있어서 감태는 조단백질 10.29%, 조지방 0.73%, 조섬유 34.41%, 조회분 27.23%, NaCl 10.61%, KOH 용해도 54.82%였고, 다시마는 조단백질 9.00%, 조지방 0.85%, 조섬유 34.06%, 조회분 26.65%, NaCl 13.53, KOH 용해도 58.05%였으며, 툃은 조단백질 11.43%, 조지방 0.75%, 조섬유 37.09%, 조회분 18.24%, NaCl 1.96%, KOH 용해도 59.04%였다. 감태, 다시마, 툃의 vitamin E 함량은 각각, 99.6, 74.6, 36.4 mg/kg 이었으며, vitamin B<sub>2</sub>는 각각 56.3, 7.4, 5.3 mg/kg 으로 감태가 가장 높았다. 감태, 다시마, 툃의 색소 함량에서 lutein은 각각 1.6, 1.2, 0.3 mg/kg, zeaxanthin은 각각 3.5, 8.9, 4.4 mg/kg, xanthophyll은 각각 5.1, 10.1, 4.7 mg/kg으로 나타났다. 미네랄 함량 중 Mg은 감태, 다시마, 툃이 각각 7,658, 5,915, 6,214 mg/kg, Cd는 감태가 2.0 mg/kg, 툃이 1.5 mg/kg, 다시마는 검출되지 않았다. Cr은 3종의 갈조류에서 모두 검출되지 않았다. 3종의 갈조류의 지방산 조성은 모두 포화지방산의 함량보다 불포화지방산 함량이 높았다. 감태의 에너지와 아미노산 이용률을 평가를 위하여 55주령 산란종계(ISA-Brown) 총 16수를 공시하여 강제 급여방법에 의해 TME, TME<sub>n</sub>, TAAA를 측정된 결과, 건물기준으로 감태의 TME는 1,849 kcal/kg, TME<sub>n</sub>은 1,577 kcal/kg, TAAA는 감태 31.99%였다.

본 실험결과 국내에서 수집한 감태, 다시마, 툃은 해양부존 자원으로서 다양한 영양성분들을 함유하고 있으며 중금속 오염에 대한 안전한 사료 원료로 사용할 수 있다고 사료된다. 다만, 해조류의 특징상 에너지와 아미노산의 생체이용률이 낮기 때문에 정확한 이용률 평가가 필요하다.

## 5. 참고문헌

- Amano, H., 1991. Biochemistry and biotechnology of seaweed. In Marine biochemistry, K. Yamaguchi, ed., Tokyo University Press, Japan, pp. 170-171 (in Japanese).
- Araba, M., and N.M. Dale, 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of overpersecuting soybean meal. Poultry Sci. 69:76-83.
- Association of Official Analytical Chemists, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed.
- Bae, K.H., W.D. Chung, W.T. Cho, C.B. Yang, and I.K. Han, 1999. Effects of kelp meal on the growth performance and carcass characteristics of finishing pigs. Kor. J. Anim. Nutr. Feed. 23:163-172.
- Dale, N.M., and H.L. Fuller, 1984. Correlation of protein content of feedstuffs with the magnitude of nitrogen correction in true metabolizable energy determinations. Poultry Sci. 63:1008-1012.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometric. 11:1-4.
- Dyer, I.A., 1959. The effects of pellets. The Annual Beef Cattle Day. pp. 29-3
- Ewing. W.R., 1951. Average analysis of the giant kelp plant. Poultry. Nutrition, 4th. ed. p. 280.
- Hill, F.W., and D.L. Anderson, 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determination with growing chicks. J. Nutr. 64:587-603.
- Idler, D.R., and P. Wiseman, 1970. Sterols in red algae (*Rhodophyceae*). Variation in the desmosterol content of dulse (*Rhododymenia palmata*). Comp. Biochem. Physiol. 35:679-678.
- Likuski, H.J.A., and H.G. Dorrell, 1978. A bioassay for rapid determination of amino acid availability values. Poultry Sci. 77:1658-1660.
- Mackie, E., and R.D. Preston, 1974. Cell wall and intercellular region polysaccharides. In: Algal physiology and biochemistry. Stewart, W. D.

- P. ed. Blackwell Scientific publications Ltd., Oxford, pp. 58-75.
- Manz, U., 1983. Pigmenting Carotenoid, Analytical Methods, Roche Publication Index No. 1864 (26-29).
- Moore, S., 1963. On the determination of cysteine as cysteic acid. J. Biol. Chem. 238:235-237.
- SAS, 1996. SAS User's guide. Statistical Analysis System institute. Inc. Cary NC.
- Sibbald, I.R., 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedstuffs. Poultry Sci. 55:303-308.
- Sibbald, I.R., 1979a. A bioassay for available amino acid and true metabolizable energy in feedstuffs. Poultry Sci. 58:668-673.
- Sibbald, I.R., 1979b. The effect of the duration of the excreta collection period on the true metabolizable energy values of feedingstuffs with slow rates of passage. Poultry Sci. 58:896-899.
- Spackman, D.H., W.H. Stein, and S. Moore, 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1190-1206.
- Sukhija, P.S., and D.L. Palmquist, 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. J. Agric. Food Chem. 36:1202-1206.
- Titus, H.W., A.L. Mehring, D. Johnson, Jr. L.L. Nesbitt, and T. Tomas. 1959. An evaluation of M.C.F. (Micro-Cel-Fat), a new type of fat product. Poultry Sci. 38:1114-1119.
- 강명희, 김영배, 이서래, 1976. 동물실험에 의한 몇 가지 해조식품의 소화 흡수율, 한국영양학회지, 9:69-75.
- 강제원, 1966. 한국에 있어서 해조류의 지리적 분포에 관한 연구. 부산수대연보.
- 권태완, 이태영, 1960. 미역의 비단백질 및 단백질분획의 아미노산의 크로마토그래피 분석. 한국농화학회지, 1:55-61.
- 김은미, 우순자, 지규만, 1996. 주요 당류 및 해조류의 대사 에너지 함량 평가

- 에 관한 연구. 한국영양학회지, 29:251-259.
- 김장양, 원종훈, 1974. 수영만 양식 미역, 모자반 및 화경해수의 수은, 카드뮴, 납, 구리의 농도에 대하여. 한국수산학회지, 7:169-178.
- 김형균, 1974. 초생추에 있어서 해조분말의 사료가치시험. 한국축산학회지, 16:330-335.
- 박영호, 1968. 알긴산製造엔 관한 研究. I. 原藻成分組成의 季節的인 變化에 대하여. 부산수산대학 석사논문.
- 박영호, 강영주, 변재형, 오후규, 1976. 미이용해조류의 이용화에 관한 연구. I. 미이용해조류의 성분조성과 조류단백질의 추출. 한국수산학회지, 9:155-162.
- 山田 莞弘, 1973. 植物油脂の代謝. 食品工業, 16:20-31.
- 양형호, 1964. 해조류의 성분에 관한 연구. 중대논문집, 9:377.
- 염월형, 지설하, 이영철, 1976. 부로일러에 대한 강류대치사료로서의 해조분의 이용 시험. 한국축산학회지, 18:349-354.
- 이강호, 1969. 김의 가공 저장중에 있어서의 색도의 안정도. 한국수산학회지, 2:105-133.
- 이종호, 이강호, 한성빈, 1974. 견해태(김)의 아연 및 마그네슘 함량과 품질과의 관계. 한국수산학회지, 7:63-68.
- 조득문, 김두상, 이동수, 김형락, 변재형, 1995. 식용해조류중의 미량요소와 특수기능성 당질. 1. 산지와 채취시기별 일반성분의 조성과 무기원소의 분포. 한국수산학회지, 28:49-59.
- 하봉석, 1977. 수산물외 지질에 관한 연구(제2보). 해조류 지질의 지방산조성에 대하여. 한국수산학회지, 10:199-204.
- 한인규, 1970. 국산사료 성분분석에 관한 연구. 한국축산학회지, 12:339-349.

## 제 2 절 감태부산물과 감태의 면역기능성 추출물질 의 영양적 가치와 사료의 가공 특성 조사

### 1. 서론

사료가공기술 측면에서 1970년대는 가루사료 위주의 생산이었으나 1980년대에 접어들면서 가공기술을 통한 가축 생산성 향상에 대한 인식이 제고되고 사료 가공설비의 보급이 확산되면서 처음에는 펠릿(pellet) 및 크럼블(crumble) 사료 생산이 시도되어 왔다. 1930년대에 pelleting 가공방법이 처음 소개된 이후, 사료의 가공법 중에서 현재 가장 실제적으로 가장 보편화되어 있는 가공법이 pellet 가공이라 할 수 있다. Pelleting은 열처리 과정과 물리적 또는 기계적 충전 및 압출, 수증기에 의한 수분 조절 등 여러 가공 분야가 복합적으로 연관된 가공법으로 pellet은 다양한 크기와 길이 또는 경도를 지니게 된다(Leaver, 1983). Pelleting은 또한 원료 사료, 배합 사료, 농후 사료 뿐 아니라 조사료까지 광범위하게 적용할 수 있는 가공 방법이다.

Pelleting은 비용이 소요되는 과정이므로 pellet 사료의 이용에 의한 잇점이 추가 비용 소요분을 충분히 상쇄 할 수 있어야 경제적으로 타당성을 얻을 수 있다. 일반적으로 알려진 pellet 사료의 장점은 사료 허실량 감소, 선택채식 방지, 원료의 재분리방지, 채식에 요구되는 시간과 에너지 소비의 절약, 열처리에 의한 병원성 미생물 방제 효과, 사료 이용을 개선, 사료의 취급 용이 및 사료의 기호성 향상 등을 들 수 있다(Behnke, 1996).

Pellet의 품질 평가는 화학적으로 전분의 호화도, 열 민감성 물질의 분해 또는 잔류 정도를 통하여 열처리 정도를 간접적으로 평가할 수 있으며, 물리적으로는 성형된 pellet의 경도(hardness), 내구력(durability), 외양 상태의 균열, 열터짐 현상(pine cone effect) 등을 통해 평가한다. 크럼블은 펠릿을 크럼블러 기계에 통과시켜 일정한 크기의 조각으로 분쇄시켜 만들어지게 된다. 사료의 가공은 사료중의 전분입자가 파괴되어 탄수화물의 소화율이 높아지고, 단백질은 압력과 열을 받아서 변성이 일어나 소화율이 높아지며, 조섬유도 소화율이 증진된다. 또한 유해물질, 해충 및 사료내의 독성 파괴, 사료섭취시간의 단축과

비타민의 파괴가 일어날 수 있다.

사료의 물리적 또는 화학적 가공이 그 사료의 급여 대상 동물에게 영양적 또는 사양적 관점에서 어떠한 영향을 미칠 것인가를 단적으로 설명하기는 어렵다. 특히, 실제 사료의 가공에 이용되는 방법은 물리적 분쇄, 열처리, 화학적 변화 등이 어우러진 복합적인 경우가 대부분이므로 가축에 급여하여 나타난 결과를 특정 효과로 연관지어 추론하기가 어려우며 또한 가축의 반응 양상도 실제 다양하게 나타나기 때문이다. 또한 이제까지 비경제적이고 이용성이 낮았던 사료자원을 이용하기 위한 효율적인 전환이나 가공방법의 개발은 세계적으로 자원의 부족현상이 심화할 경우 더욱 가속화 될 것으로 전망된다(오상집, 1991)

따라서 본 연구는 3종의 갈조류 중 감태에서 수용성 물질을 추출하고 남은 감태부산물(*Ecklonia cava*)과 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)의 영양적 가치를 평가하고 육계 사료에 각각 첨가하여 사료 공정에서 크럼블 및 펠렛 사료의 가공 단계별 특성을 알아보려고 실시하였다.



## 2. 재료 및 방법

가. 감태부산물(*Ecklonia Residue*)과 면역기능성 물질(Immunoregulator) 추출 조건 및 공정

### 1) 감태부산물(*Ecklonia Residue*) 제조방법

실험에서 사용된 감태(*Ecklonia cava*)은 제주도 일대에서 자생하는 감태를 수집하여 자연상태 그대로 햇볕에 건조시킨 후, 원물 상태를 1차로 150HP(horse power) 햄머밀(hammer mill)로 분쇄하여 사용하였다.

감태에서 수용성 물질 추출 방법은 감태 100g을 수돗물에 넣고 24시간 동안 cold room(4℃)에서 배양한 뒤 증류수로 세척하여 가정용 mixer에 넣고 2.5 분씩 2회 잘게 분쇄하여 4 시간 동안 homogenizing하였다. 이 후 약 12 시간 동안 cold room에서 침전 후 녹갈색의 맑은 상층용액을 high speed centrifuge를 이용해 12500 rpm, 30 min., 4℃에서 원심분리하고 원심분리해서 얻은 상층액을 수집하여 Whatman NO. 2로 여과한 후 다시 Whatman NO.5로 여과하여 deep freezer에서 동결 건조하여 갈색분말을 취한다. 또한 감태로부터 열탕추출에 의한 락틴 분획 추출은 4℃에 보관 중인 자연 건조된 감태 100g을 수돗물에 넣고 24시간 cold room에서 배양하여 증류수로 세척 후 감태가 잠길 정도로 증류수를 첨가하여 100℃에서 1 시간 동안 열탕하며 이 후 수용성 물질 추출 방법과 동일하게 분쇄 및 원심분리 후 여과과정을 거쳐 동결 건조한다. 이 때 콜로이드 상태의 락틴추출 감태 잔사물이 남게 되며 이를 풍건 상태에서 자연 건조시켜 감태부산물(*Ecklonia Residue*)로 사용하였다. 이 때 감태부산물을 다시 2차로 50HP 핀크라샤(pin crusher)로 미분하여 화학적 분석을 실시하였다.

### 2) 감태의 면역기능성 추출물질(Immunoregulator) 제조방법

감태의 면역기능성 물질 추출은 4℃에 보관 중인 자연 건조된 감태 100g을 수돗물에 넣고 24시간 cold room에서 배양하여 증류수로 세척 후 해조류 잠길 정도로 증류수를 첨가하여 100℃에서 1 시간 동안 열탕하며 가정용 mixer에 넣고 2.5 분씩 2회 잘게 분쇄하여 4 시간 동안 homogenizing하였다.

이 후 약 12 시간 동안 cold room에서 침전 후 녹갈색의 맑은 상층용액을 high speed centrifuge를 이용해 12,500 rpm, 30 min., 4°C에서 원심분리하고 원심분리해서 얻은 상층액을 수집하여 Whatman NO. 2로 여과한 후 다시 Whatman NO.5로 여과하여 deep freezer에서 동결건조하여 갈색분말을 취한다.

이 때 추출한 면역기능성 물질은 crude한 lectin 이며, 황갈색의 고운 분말 형태이며, 대략 25g/kg의 lectin을 함유하고 있으며, 약간의 효모와 미네랄들을 포함하고 있으며, 사료 내 첨가시 수용성 물질인 lectin을 추출하고 난 후의 감태부산물(*Ecklonia Residue*)을 부형제로 혼합하였으며, 본 물질을 임의로 Immunoregulator라고 명명하였다.

#### 나. 시험설계

감태부산물의 진정대사에너지(TME)와 진정아미노산이용률(TAAA)을 조사하기 위하여 55주령 된 산란종계(ISA-Brown) 수탉을 이용하여 측정하였다. 시험구는 산란종계 수탉을 절식구 8수, 감태부산물 급여구 8수로 하여 총 16수를 완전 임의배치 하였다.

#### 다. 조사 항목 및 조사 방법

##### 1) 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 일반성분분석

감태부산물과 면역기능성 추출물질의 일반성분 즉, 수분, 조단백질, 조섬유, 조지방, 조회분, 칼슘, 인 분석은 AOAC(1990)방법에 따라 실시하였다.

##### 2) 단백질 KOH 용해도

단백질 용해도는 Araba와 Dale(1990)의 분석법에 따라 0.2% KOH용액에 사료를 용해시키고 원심분리 후 Kjeldahl method로 단백질을 측정하여 조단백질과의 비율로 나타내었다.

##### 3) 진정대사에너지(TME<sub>n</sub>)

TME 측정을 위해 Sibbald(1976)가 고안한 강제급여(force-feeding)방법을 사용하여 실시하였다. 55주령 ISA-Brown 종계 수탉 16수를 공시하여 니플이 설치된 2단 알루미늄 케이지에 임의 배치한 후 일반 시판사료로 사육하고, 강제급여를 시작하기 전에 24시간동안 절식시켰다. 그 후 절식구와 감태부산물 처리구를 8수씩 임의배치하고 각각 30g씩 강제급여 시킨 후 48시간(Sibbald, 1979b)동안 배설된 모든 배설물을 채취하였다. 채취된 모든 배설물은 깃털과 이물질 등을 제거한 후 60°C에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄하여 분석에 이용하였다.

각 사료와 배설물을 건조 후 bomb calorimeter(Parr 1261, USA)를 사용하여 gross energy를 측정하여 대사에너지를 계산한 후 사료에 기인되지 않은 대사성 분 에너지와 마멸된 장점막, 담즙, 소화액 등의 에너지를 포함한 내인성 노에너지를 보정하여 TME<sub>n</sub>은 질소가 체내에서 0인 상태로 보정하여 체내 축적에 의한 배설물의 변이를 줄여준 것이다. 질소를 보정할 때는 8.22(Hill과 Anderson,1958)와 8.73(Titus 등, 1959)의 2가지 상수가 쓰인다. 8.22는 요산을 유일한 질소배설물로 보았을 경우의 에너지가이다. 여기서는 8.73을 상수로 하여 계산하였다.

TME(kcal/g)의 계산식은 다음과 같다(Sibbald, 1976).

$$TME(kcal/kg) = \frac{(G.E.f \times X) - (Yef - Yec)}{X}$$

G.E.f is the gross energy of the feedstuff (kcal/g)

Yef is the energy voided as excreta by the fed bird (kcal/g)

Yec is the energy voided as excreta by the unfed bird (kcal/g)

X is the weight feedstuff fed (g)

TME<sub>n</sub>의 계산식은 다음과 같다(Dale과 Fuller, 1984).

$$TME_n(kcal/kg) = \frac{GE_i - [EE_f + (N_i - N_e) \times 8.73] + [EE_e + (N_i - N_e) \times 8.73]}{g \text{ intake}}$$

GE<sub>i</sub> = Gross Energy ingested (kcal)

EEf = Energy Excreted by fed birds

EEd = Energy Excreted by fasted birds (endogenous)

Ni - Ne = Nitrogen Balance (N ingested - N excreted)

#### 4) 진정 아미노산 이용률(TAAA)평가

TAAA는 Sibbald(1976)가 제시한 TME 측정방법과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다(Likuski와 Dorrell, 1978; Sibbald, 1979a).

원료와 분내의 아미노산 조성은 6N HCl 용액을 사용하여 110℃에서 22시간 동안 가수분해시킨 다음(Spackman 등, 1958), 아미노산 자동 분석기(Hitachi L-8500A)를 이용하여 아미노산 질량을 측정하였고 Met과 Cys를 가수분해 전에 formic acid로 산화시킨 후(Moore, 1963)분석하였다.

TAAA의 계산식은 다음과 같다(Likuski와 Dorrell, 1978).

$$TAAA(\%) = \frac{AAc - (AAv - AAvf)}{AAc} \times 100$$

AAc = the total amount of AA consumed by the fed rooster

AAv = the total amount of AA voided in excreta by the fed rooster

AAvf = an average of total amount of AA voided by the fasted control rooster

#### 라. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 가공특성 조사

##### 1) 입자도(particle size)

입자도 측정은 측정하고자 하는 샘플을 정확하게 계량하여 스크린 상부에 넣고, 스크린을 진탕기로 충분히 진탕시켜 각 스크린에서 충분히 빠질 수 있도록 충분한 진탕시간을 주고, 각 스크린의 잔량을 중량 측정하고 잔량을 전체에 대한 백분율로 환산하여 U.S.A. 기준 Z23.1 표준망체(청계상공사)를 이용하여 입자도를 계산하였다. 이 때 스크린 규격은 U.S.B.S 기준으로 하였다(#8-2.38mm, #12-1.68mm, #20-0.84mm, #35-0.50mm).

## 2) 용적중(bulk specific weight)

용적중을 측정하기 위해 깔대기에 측정하고자 하는 샘플을 가득 채운 후, 깔대기 밑의 뚜껑을 열어 샘플이 1리터 컵에 자연 낙하하도록 하고 이들 샘플이 눌리지 않도록 자를 이용하여 1리터 컵의 샘플을 수평으로 잘라내고 전자저울을 이용하여 1리터 컵에 담긴 샘플의 중량을 측정하여 비중( $g/l$ )으로 하였다. 이 때 주의해야 할 것은 비중 측정시에는 비중측정기가 교정검사 유효기간을 경과하지 않았는지 확인하고 반드시 1리터 컵에 샘플이 넘치도록 충분한 양의 샘플을 준비하였다.

## 3) 크럼블 및 펠렛 사료 제조시 시간당 생산량

크럼블 및 펠렛 사료제조는 H 사료공장에 설비되어 시용중인 시설을 이용하여 수행하였으며, 본 시험에 사용된 펠렛기는 덴마크산 Matador(220 HP)와 익스펜더기는 독일산 Amandas Khal(330 HP)이다. 감태부산물과 면역기능성 추출물질을 기존의 크럼블 및 펠렛 사료 생산시 추가하여 기존 사료를 대조구로 하여 동일한 생산 조건(70℃, 200암페어)에서 육계 사료로 이용되는 크럼블(육계전기사료) 및 펠렛(육계후기사료)으로 3회 가공처리 하였고 이 때 시간당 생산량(톤/시간)의 평균값을 비교하였다.

## 4) 분화율 시험(Pellet Durability Index test, PDI test)

분화율 측정기는 분화율 측정기(Oriental Motor Co., Ltd. Japan), 각 번호별 스크린 및 전자저울로 구성되며, 측정 방법은 측정하고자 하는 샘플을 펠렛 직경이 6.4mm 이상인 경우에는 #3.5 스크린, 3.2mm 이상 5.0mm 이하인 경우에는 #6 스크린, 3.2mm 이하인 경우에는 #8 스크린, 2.5mm 이하인 경우에는 #10 스크린, 2.0mm 이하인 경우에는 #12 스크린을 이용하여 가루를 완전히 제거하고 펠렛을 정확히 500g을 취하여 분화율 측정기에 넣고 10분간 50rpm으로 회전시켰다. 펠렛을 꺼내어 스크린을 이용하여 가루를 제거하고 부서지지 않은 펠렛을 전자저울을 이용하여 중량을 측정하고 다시 중량을 백분율(%)로 환산하여 분화율을 구하였다.

## 5) 펠렛경도(Hardness) 측정

펠렛경도는 용수철 경도측정장치(Amandas Kahl Nachf 21456, Germany)를 이용하여 측정하였다. 측정방법은 펠렛을 경도측정장치의 두 덕 사이에 끼운 다음 손으로 코일 스프링위에 있는 손잡이를 돌려 압력을 줌으로써 펠렛이 파괴될 때 지시침이 가리키는 하중을  $\text{kg/m}^3$  으로 표시하였다.

마. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가 형태 조사 및 산업화 연구

감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가방법은 원료를 분말 형태로 육계 사료에 각각 첨가하여, 사료 가공 과정에서 다양한 조건으로 크럼블 및 펠렛 사료로 가공하여 산업화의 가능성을 살펴보았으며, 제 3 세부과제와 협력하에 이류 자돈 사료를 기초로 항생제를 대체하여 사료내 0.1% 첨가하였을 때 경제성 분석을 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 일반성분분석

감태에서 렉틴을 추출하고 남은 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 일반성분 및 KOH 용해도를 Table 14에 나타내었다.

수분함량은 감태부산물이 14.11%, 면역기능성 추출물질이 9.01%로 일반적으로 옥수수 12~14%, 소맥 10~12%, 소맥피 8~12% 등과 비교할 때 사료 원료로 사용이 가능한 수준이었다. 감태부산물의 조단백질 함량은 13.83%, 면역기능성 추출물질 9.23%로 나타났다. 조지방 함량에 있어서는 감태부산물이 0.43%, 면역기능성 추출물질이 0.76%로 나타났으며, 조섬유 함량은 감태부산물 10.85%, 면역기능성 추출물질 4.92%로 나타났다. 조회분의 경우 감태부산물은 16.87%로 나타났으나 면역기능성 추출물질 49.64%로 감태부산물에 비해 대략 3배정도 높았다.

선행된 연구 결과들은 대부분 갈조류에 대한 일반성분 분석들이었기 때문에 본 연구에서 사용한 감태부산물 및 면역기능성 추출물질과는 비교 분석하기 어려웠으나, 해조류의 각 성분들이 종류, 계절, 산지, 채취부위 및 저장시일 등에 따라 상당한 차이가 있다는 연구 보고(박영호, 1968)와 관련해 보면 감태부산물 및 면역기능성 추출물질도 원물의 상태에 상당한 영향을 받을 것으로 사료된다.

광물질 성분 중 칼슘함량은 감태부산물이 0.81%, 면역기능성 추출물질이 2.04% 였으며, 인 함량에 있어서는 감태부산물이 0.15, 면역기능성 추출물질이 0.16%였다. NaCl 함량에 있어서 감태부산물은 1.11%로 나타났고, 면역기능성 추출물질은 NaCl 함량을 직접 분석하지는 않았지만 감태부산물보다는 낮을 것으로 생각된다. 그 이유는 면역기능성 물질을 추출할 때 충분히 NaCl이 제거되었을 것으로 사료되기 때문이다. 실제로 앞 선 연구에서 감태의 NaCl 함량은 10.61%로 나타났으며 수용성 물질을 추출하고 남은 감태부산물이 1.11%로 나타난 것이 이를 보충 설명해 줄 수 있다.

KOH 용해도는 감태부산물이 23.4%로 앞선 3종의 갈조류의 KOH 용해도에 비해 절반 정도였다. 감태부산물의 KOH 용해도가 낮은 이유는 수용성

물질 추출시 열당 침윤에 따른 열처리 결과에 기인한 것으로 사료된다. 감태부산물의 총에너지 함량은 3,201 kcal/kg이었다.

Table 14. Nutritional value, KOH solubility and gross energy of *Ecklonia* residue and Immunoregulator

Items	<i>Ecklonia</i> residue	Immunoregulator
Moisture, %	14.11	9.01
Crude protein, %	13.83	9.23
Ether extract, %	0.43	0.76
Crude fiber, %	10.85	4.92
Ash, %	16.87	49.64
Ca, %	0.81	2.04
P, %	0.15	0.16
NaCl, %	1.11	-
KOH solubility, %	23.40	-
Gross energy, kcal/kg	3,201	-

나. 감태부산물의 진정대사에너지와 질소보정진정대사에너지

중계 수탈을 이용하여 감태부산물의 진정대사에너지(TME)와 질소보정진정대사에너지(TMEn) 측정치를 Table 15에 나타내었다.

감태부산물의 TME와 TMEn은 건물기준으로 각각 1,190 kcal/kg, 996 kcal/kg 이었다.



선행 연구들이 대부분 해조류 그 자체에 대한 대사에너지 평가하였기 때문에 감태부산물과 직접적인 비교는 어렵지만 본 연구의 선행 연구 결과에서 감태의 TME와 TME<sub>n</sub>이 각각 1,849 kcal/kg, 1,577 kcal/kg로 나타난 것(Table 10)에 비해 대략 1.5배 낮은 결과 수치를 보였다. 따라서 본 연구 결과 감태와 감태부산물의 대사에너지 값은 닭에 있어서 감태는 에너지의 생체이용율이 비교적 낮은 편이고 감태 가공으로 인하여 이용율 저하는 더욱 심하게 나타났다.

면역기능성 추출물질의 대사에너지를 측정하지 않은 이유는 사료 첨가제 개념으로 현재 시판 중에 있으며 사료내 0.3% 이상 첨가하지 않는 원료이기 때문에 대사에너지를 측정하지 않았다.

Table 15. Energy values of *Ecklonia* residue(dry matter basis)

	TME	TME <sub>n</sub>
	-----kcal/kg-----	
<i>Ecklonia</i> residue	1,190	996

TME : True metabolizable energy

TME<sub>n</sub> : Nitrogen corrected true metabolizable energy

다. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 아미노산 조성 및 감태부산물의 진정 아미노산 이용률(TAAA) 평가

감태부산물과 면역기능성 추출물질의 아미노산 조성을 Table 16에, 종계 수탉을 이용하여 감태부산물의 진정 아미노산 이용률(TAAA)을 측정한 값은 Table 17에 나타내었다.

감태부산물의 leucine 함량은 0.79%, lysine과 methionine 함량은 각각

0.29, 0.31%이었으며, 또한 비필수 아미노산 중에 glutamic acid 함량이 1.17%였다. 면역기능성 추출물질의 leucine 함량은 0.61%, lysine과 methionine 함량은 각각 0.30, 0.19%였으며, 비필수 아미노산 중에 glutamic acid 함량이 1.00%였다. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 아미노산 조성을 전란(全卵)단백질 및 대두박과 비교할 때 아미노산 함량 자체는 낮으나 비교적 그 조성이 양호하였으며, threonine 함량은 단백질 함량 대비 높은 편이나 lysine과 methionine은 제한아미노산으로서 고려되어야 할 것으로 사료된다.

감태부산물의 평균 TAAA는 11.72%였다. 감태부산물의 평균 진정 아미노산 이용율이 낮은 이유는 Table 14에서 감태부산물은 23.40%인 것과 관련하여 단백질 이용율이 낮은 것과 해조류의 단백질은 난소화성 단백질인 것(김은미 등, 1996)에 따른 결과로 사료된다. 면역기능성 추출물질의 진정아미노산 이용률을 측정하지 않은 이유도 대사에너지를 측정하지 않은 이유와 동일하게 사료 첨가제 개념으로 사료내 0.3% 이상 첨가하지 않기 때문에 측정하지 않았다.

Table 16. Amino acid composition of *Ecklonia* residue and Immunoregulator(as fed basis)

Amino Acids	<i>Ecklonia</i> residue	Immunoregulator
Essential amino acid(%)		
Valine	0.44	0.51
Methionine	0.31	0.19
Isoleucine	0.59	0.31
Leucine	0.79	0.61
Threonine	0.43	0.35
Phenylalanine	0.36	0.36
Lysine	0.29	0.30
Arginine	0.30	0.41
Non-essential amino acid(%)		
Aspartic acid	0.78	0.73
Cystine	0.25	0.12
Glutamic acid	1.17	1.00
Proline	0.40	0.35
Serine	0.35	0.34
Glycine	0.43	0.41
Alanine	0.53	0.42

Table 17. Amino acid composition and true amino acid availability of *Ecklonia* residue(as fed basis)

	Amino acid (%)	True availability (%)	TAAA <sup>1</sup> (%)
Essential amino acid			
Arginine	0.30	-	-
Isoleucine	0.59	15.73	0.09
Leucine	0.79	-	-
Lycine	0.29	-	-
Methionine	0.31	-	-
Phenylalanine	0.36	-	-
Threonine	0.43	16.54	0.07
Valine	0.44	5.60	0.02
Non-essential amino acid			
Alanine	0.53	9.73	0.05
Aspartic acid	0.78	4.61	0.04
Cystine	0.25	-	-
Glutamic acid	1.17	13.65	0.16
Proline	0.40	-	-
Serine	0.35	16.15	0.06
Mean		11.72	

<sup>1</sup> TAAA : True available amino acid

라. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료 내 첨가에 대한 가공 특성 조사

1) 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 입자도(particle size)와 용적중(bulk specific weight)

갈조류의 중 감태부산물과 면역기능성 추출물질 첨가사료의 입자도와 용적중 결과는 각각 Table 18, 19에 표시하였다. 감태부산물을 사용원료로 사용하기 위하여 햄머밀(150HP)로 1차 분쇄 후 핀크라샤(50HP)를 사용하여 2차로 재분쇄하여 실험에 이용하였고, 분쇄한 원료의 입자도를 검사해 본 결과 U.S standard mesh #25 0.71mm 이하가 100%를 나타냈고, 용적중은 820 g/l 으로 옥수수 650 g/l 보다 높았다.

면역기능성 추출물질의 입자도는 U.S standard mesh #16 1.19mm에 0.2%, 나머지는 소립자와 가루 형태의 분포를 나타냈다. 용적중은 감태부산물과 유사한 800 g/l 으로 나타났으며, 이는 감태부산물과 면역기능성 추출물질을 사료 원료로 사용하기 위하여 다른 원료 사료와 유사하게 분쇄공정을 거친 결과로 입자도 분포와 용적중 조사 결과 사료원료로 사용하기에 적합한 것으로 판단되었다.

사료의 입자도란 원료사료나 배합사료의 크기를 의미하는데 이 입자도에 따라 동일한 사료라 할지라도 가공성, 동물의 의한 이용성, 생리적 영향 등에 차이를 나타내므로 동물에 적절한 입자도를 찾는 일은 동물사료 제조과정에서 중요한 과제이다(한인규, 2000). 원료의 입자도와 용적중은 사료 제조 과정 중 배합공정에 영향을 미칠 수 있는 요인으로 작용하여 각 원료의 혼합도에 혼합 시간과 함께 주영향을 미치며, 가축에게 사료 급여시 종계를 제외하고는 부피 개념으로 사료를 급여하는 실정을 고려할 때 급여사료의 영양소 밀도(g/kg)에 변화를 가져와 가축 생산성에 영향을 미치는 중요한 영향 인자이다. 또한 사료의 분쇄 입자도는 소화율과 섭취시간에 많은 영향을 끼치게 된다. 즉, 사료 제조시 가축의 성장 단계별 필요한 영양소의 성분 함량을 정확히 함유할 수 있도록 설계하는 것 외에 급여하는 사료의 입자도에 따른 소화율, 사료의 일정한 용적중을 통한 급여하는 사료의 단위당 영양소 함량 균일화는 매우 중요하다.

Table 18. Particle size and bulk specific weight of *Ecklonia* residue

	Sieve NO.	mm	Weight(g)	Portion(%)
대립자	6	3.35	-	-
	8	2.36	-	-
	소계		-	-
중립자	10	2.00	-	-
	12	1.70	-	-
	16	1.19	-	-
	소계		-	-
소립자	20	0.85	-	-
	25	0.71	-	-
	소계		-	-
	가루		1,000	100
	TOTAL		1,000	100
Bulk specific weight (g/ℓ)			820	

Table 19. Particle size and bulk specific weight of Immunoregulator

	Sieve NO.	mm	Weight(g)	Portion(%)
대립자	6	3.35	-	
	8	2.36	-	
	소계		-	
중립자	10	2.00	-	
	12	1.70	-	
	16	1.19	2	0.2
	소계		2	0.2
소립자	20	0.85	7	0.7
	25	0.71	11	1.1
	소계		18	1.8
	가루		980	98
TOTAL			1,000	100
Bulk specific weight (g/ℓ)			800	

## 2) 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료 가공 특성 조사

감태부산물과 면역기능성 추출물질을 첨가하여 육계사료로서의 크럼블 및 펠렛 가공 사료 제조시 가공특성을 Table 20~25에 나타내었다.

감태부산물은 육계 사료내에 1.0% 첨가하였고, 면역기능성 추출물질은 육계 사료내에 0.1% 첨가하여 크럼블 및 펠렛 사료의 가공특성을 조사하였다. 크럼블 및 펠렛 가공 사료 제조시 펠렛밀은 H 사료공장에 설비되어 시용 중인 시설(Matador, 250HP)을 이용하여 수행하였으며, 크럼블 사료 및 펠렛 사료 생산시 기존 사료를 대조구로 하여 동일 생산조건에서 크럼블 및 펠렛으로 3회 가공 처리를 하여 평균값을 구하여 비교 분석하였다.

감태부산물의 크럼블 사료 제조시 시간당 생산량은 대조구와 처리구 모두 12.7 톤/시간으로 같았으며, 용적중은 대조구가 571.0 g/l, 처리구가 578.0 g/l으로 큰 차이를 나타내지 않았다. 입자도 검사에서는 대조구와 처리구가 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, 중립자에서 대조구가 67.25%, 처리구가 66.65%로 가장 많은 비율을 차지하였고, 그 다음 대조구와 처리구에서의 대립자가 각각 20.05, 19.05%를 차지하였으며, 소립자가 각각 7.35, 8.95%를 차지하였다. 또한 가루 형태도 두 처리구에서 대략 5% 정도를 차지하였다(Table 20, 21).

면역기능성 추출물질의 크럼블 사료 제조시 시간당 생산량은 대조구와 처리구가 각각 12.4, 12.5 톤/시간으로 차이가 없었고, 용적중은 각각 572.0 g/l, 577.0 g/l으로 감태부산물의 용적중과 큰 차이가 없었다. 입자도 검사에서 대조구의 중립자가 61.0%, 처리구가 60.4%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었고 대조구 및 처리구에서 대립자가 각각 20.6, 20.1%를 차지하고 있었으며, 소립자가 각각 12.5, 11.8 %를 차지하였다. 또한 가루 형태도 각각 5.9, 7.7%를 차지하였다(Table 22, 23).



Table 20. Dietary *Ecklonia* residue supplementation on the production per hour and bulk specific weight of crumble

	Control	<i>Ecklonia</i> residue
Production per hour(ton/hour)	12.7	12.7
Bulk specific weight(g/ℓ)	571.0	578.0

Table 21. Dietary *Ecklonia* residue supplementation on the particle size test of crumble

		Control (g)	Portion (%)	<i>Ecklonia</i> residue (g)	Portion (%)
Particle size test(Sieve No.)(mm)					
대립자	6(3.35)	3.5	0.35	3.5	0.35
	8(2.36)	200.5	20.05	195.0	19.50
	소계	204	20.4	198.5	19.85
중립자	10(2.00)	263.5	26.35	248.0	24.80
	12(1.70)	207.0	20.70	206.5	20.65
	16(1.19)	202.0	20.20	212.0	21.20
	소계	672.5	67.25	666.5	66.65
소립자	20(0.85)	51.5	5.15	63.5	6.35
	25(0.71)	22.0	2.20	26.0	2.60
	소계	73.5	7.35	89.5	8.95
	finer	50.0	5.00	45.5	4.55
Total		1000.0	100.00	1000.0	100.00

Table 22. Dietary Immunoregulator supplementation on the production per hour and bulk specific weight of crumble

	Control	Immunoregulator
Production per hour(ton/hour)	12.4	12.5
Bulk specific weight(g/ℓ)	572.0	577.0

Table 23. Dietary Immunoregulator supplementation on the particle size test of crumble

		Control (g)	Portion (%)	Immunoregulator (g)	Portion (%)
Particle size test (Sieve No.)(mm)					
대립자	6(3.35)	2.0	0.20	1.0	0.10
	8(2.36)	204.0	20.40	200.0	20.00
	소계	206.0	20.60	201.0	20.10
중립자	10(2.00)	240.0	24.00	234.0	23.40
	12(1.70)	172.0	17.20	170.0	17.00
	16(1.19)	198.0	19.80	200.0	20.00
	소계	610.0	61.00	604.0	60.40
소립자	20(0.85)	85.0	8.50	80.0	8.00
	25(0.71)	40.0	4.00	38.0	3.80
	소계	125.0	12.50	118.0	11.80
	fines	59.0	5.90	77.0	7.70
Total		1,000.0	100.00	1,000.0	100.00

감태부산물은 육계사료 내에 1%을 첨가하여 펠렛 가공시 시간당 생산량을 조사하였는데, 대조구가 12.7 톤/시간, 처리구가 12.7 톤/시간으로 동일하였다. 경도(hardness)도 시간당 생산량과 마찬가지로 대조구와 처리구 모두 2.80 kg/m<sup>3</sup> 이었으며, 펠렛 분화율(PDI)에서는 대조구가 94.5%, 처리구가 94.6%로 차이가 없었다(Table 24).

면역기능성 추출물질은 육계사료 내에 0.1%을 첨가하여 펠렛 가공시 시간당 생산량을 조사해본 결과 시간당 생산량은 대조구가 12.4 톤/시간, 처리구가 12.5 톤/시간으로 나타났고, 경도는 대조구가 2.90 kg/m<sup>3</sup> 처리구가 2.87 kg/m<sup>3</sup>로 나타났으며, 펠렛 분화율에서는 대조구가 94.6 %, 처리구가 94.8 %로 나타나(Table 25) 감태부산물과 비교하였을 때 펠렛 가공시 큰 차이를 나타내지 않았다.

펠렛 가공 과정 중에 펠렛의 품질에 영향을 미칠 수 있는 요인들로 사료의 배합(원료사료의 조성), 분쇄(입자도), conditioning, pellet die와 roll, 냉각과 같은 요인들이 펠렛의 품질에 미치는 영향으로 각각 50, 20, 20, 15, 5%로 평가하였다(Behnke, 1996). 본 연구는 동일한 조건에서의 펠렛 가공 사료를 제조하였기 때문에 위와 같은 여러 요인에 의한 펠렛 품질을 직접적 비교하기 어려웠으나, 본 과제 중 면역기능성 추출물질의 산업화 과정에서 온도(℃)와 전류(암페어)를 조정하여 다양한 조건하에서 펠렛 가공 사료를 만들어 비교해본 결과 펠렛의 품질에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(데이터로 나타내지 않음).

따라서 동일한 조건에서의 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 육계사료로서의 크럼블 및 펠렛 가공 사료 제조시 생산성이나 제조 품질에 차이가 없는 것으로 보아 다양한 가공 사료로서의 제조가 가능할 것으로 판단된다.

Table 24. Dietary *Ecklonia* residue supplementation on the processing characteristic of pellet

	Control	<i>Ecklonia</i> residue
Production per hour(ton/hour)	12.70	12.70
Hardness(kg/m <sup>3</sup> )	2.80	2.80
Pellet Durability Index(%)	94.50	94.60

Table 25. Dietary Immunoregulator supplementation on the processing characteristic of pellet

	Control	Immunoregulator
Production per hour(ton/hour)	12.40	12.50
Hardness(kg/m <sup>3</sup> )	2.90	2.87
Pellet Durability Index(%)	94.60	94.80

바. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가 형태 조사 및 산업화 연구

감태에서 수용성 물질을 추출하고 남은 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가방법으로는 혼합이 용이하도록 분쇄한 후 분말상태로 일정량을 첨가하여 사용하는 것이 용이하다고 판단된다. 다만, 액상 상태로 첨가할 때는 감태부산물과 면역기능성 추출물질을 액상상태로 만들어 별도의 액상 분

사 장치를 갖춘 시설을 필요로 한다. 이는 액상 분사장치는 기존 사료 제조시 이용되고 있는 우지나 당밀의 분사 장치와는 용액의 성상과 비중 차이로 인하여 혼용이 불가하기 때문에 새로운 액상 분사 장치를 필요로 하게 되므로 사료제조 공정 상에 추가 비용이 들기 때문에 액상 상태의 첨가방법은 합리적이지 않다. 또한 면역기능성 추출물질의 경우는 경제성과 혼합의 용이성을 위하여 분말화하여 첨가하는 것이 바람직하다.

한편, 면역기능성 추출물질과 관련하여 H 사료공장에서 다양한 가공 조건하에서 육계사료 중 전기사료로 크림블 사료(170~200 암페어, 60~77℃)와 후기사료로 펠렛 사료(145~195 암페어, 65~77℃)를 제조하였더니(데이터를 표시하지 않음), 생산성이나 제품 품질에 차이가 없었으며, 실제 산란계 및 돼지에 급여하였을 때 생산성이나 사료의 기호성이 떨어지는 일이 발생하지 않은 보고(제 3 세부과제)에서 감태부산물 및 면역기능성 추출물질은 산업화가 가능할 것으로 판단되어 진다.

또한, 항생제 대체 목적으로서 제 3세부과제에서는 모든 축종에서 항생제를 배제하고 감태, 감태부산물 및 면역기능성 추출물질을 사료내에 첨가하여 가축에 급여를 하였는데, 감태는 별다른 열처리나 가공처리 없이 자연건조된 상태에서 분쇄를 하여 육계에 3%까지 첨가하여도 무방할 것으로 사료되고 감태부산물은 면역기능성 추출물질을 분리 정제하는 과정에서 나오는 부산물이므로 적은 비용으로 활용할 수 있는 사료자원이라고 사료되며 다만, 건조과정과 분쇄 등의 가공 공정은 거쳐야 할 것으로 판단된다. 제 3세부과제 중 돼지 사양실험시 모든 처리구를 항생제를 대체하여 수행하였던 바, 질병 예방을 위한 항생제 첨가 비용을 톤당 9,200원이었으며, 돼지의 생산성 및 내병성 실험 결과 Immunoregulator 0.1% 첨가구에서 성장률과 사료요구율이 우수한 결과로 미루어 보아 본 제제의 사료 내 첨가 사용시 대략 톤당 4,000원이 소요되는 바 경제적이라고 판단된다. 추후 많은 사료공장에서 본 제제를 사용한다면 대량 생산에 의한 대량 판매로 단가를 더 많이 줄여 줄 수 있는 안정적이고 고부가가치 축산물을 생산해 낼 수 있는 경제성이 있는 물질로 사료된다.

그러나, 앞으로 해조류에서 추출한 면역기능성 물질들에 대해 다양한 가축사양실험을 통한 가축의 최대 생산성과 면역능을 갖게 되는 첨가 수준을 밝히고 이에 맞는 수준별 혼합도를 검사하여 보다 나은 최적의 첨가 수준의 점

검이 필요할 것으로 사료되며, 본 과제가 종료되더라도 추후 더 많은 연구를 통해 항생제 대체물질로서 국제 시장의 경쟁력을 갖춘 축산물과 축산 농가의 무항생제 사용으로 인한 생산비 절감 및 소비자에게 항생제가 검출되지 않는 청정 축산물 공급이라는 긍정적인 연구 결과를 얻을 수 있도록 노력해야 할 것으로 사료된다.

#### 4. 적요

3종의 갈조류 중 감태에서 수용성 물질을 추출하고 남은 감태부산물(Ecklonia residues)과 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)의 영양적 가치를 평가하고 육계 사료에 각각 첨가하여 사료 공정에서 크럼블 및 펠렛 사료의 가공 단계별 특성을 알아보려고 실시하였다.

본 실험은 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 화학적 성분 평가하기 위해 일반성분분석을 실시하였고, 감태부산물은 영양적 가치 평가를 위해 KOH 용해도와 산란중계 수탁(ISA-Brown) 총 16수를 공시하여 강제급여 방법에 의해 TME, TME<sub>n</sub>, TAAA를 측정하였다. 또한 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료가공 단계별 특성을 조사하기 위해 기존 사료를 대조구로 하여 입자도(particle size), 용적중(bulk specific weight), 시간당 생산량, 분화율 시험(PDI test), 펠렛 경도(hardness)를 조사하였으며, 사료 내 첨가 형태와 다양한 조건하에 사료를 가공하여 경제성 분석 및 산업화의 가능성을 살펴보았다.

일반성분분석에서 조단백질 함량은 감태부산물과 면역기능성 추출물질 각각 13.83, 9.23%, 조지방 함량은 0.43, 0.76%, 조섬유 함량은 10.85, 4.92% 및 조회분 함량은 각각 16.87, 49.64%로 나타났다. 칼슘 함량에 있어서는 감태부산물, 면역기능성 추출물질 각각 0.81, 2.04%였고, 인함량은 각각 0.15, 0.16%였으며, 감태부산물의 NaCl 함량은 1.11%였다. KOH 용해도는 감태부산물이 23.4%로 3종의 갈조류의 KOH 용해도에 비해 절반 정도였다. 감태부산물의 TME, TME<sub>n</sub>은 각각 1,190, 996kcal/kg이었으며, TAAA는 11.72%였다.

감태부산물과 면역기능성 추출물질의 입자도는 거의 모두 가루 형태였고, 용적중은 각각 820, 800 g/l로 유사하였다. 감태부산물과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가에 따른 가공특성을 조사해 본 결과 크럼블 사료 생산시 대조구와 처리구 사이에 시간당 생산량, 용적중 및 입자도에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 펠렛 사료 제조시도 이와 유사하게 시간당 생산량, 펠렛 경도 및 펠렛 분화율에 있어서 기존 사료인 대조구와 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 다양한 사료 가공 조건하에서 육계 사료로 크럼블 사료(170~200암페어, 60~77℃), 펠렛 사료(145~195암페어, 65~77℃)를 제조하였더니 생산성이나 제품 품질에 차이가 없었다.

## 5. 참고문헌

- Araba, M., and N.M. Dale, 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of overpersecuting soybean meal. *Poultry Sci.* 69:76-83.
- Association of Official Analytical Chemists, 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15th ed.
- Behnke., K.C. 1996. Feed manufacturing technology : Current issues and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62:49.
- Dale, N.M., and H.L. Fuller, 1984. Correlation of protein content of feedstuffs with the magnitude of nitrogen correction in true metabolizable energy determinations. *Poultry Sci.* 63:1008-1012.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Hill, F.W., and D.L. Anderson, 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determination with growing chicks. *J. Nutr.* 64:587-603.
- Leaver, R.H. 1983. Sprout-Waldron Div., Koppers Co. Inc.
- Likuski, H.J.A., and H.G. Dorrell, 1978. A bioassay for rapid determination of amino acid availability values. *Poultry Sci.* 77:1658-1660.
- Moore, S., 1963. On the determination of cysteine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.* 238:235-237.
- Sibbald, I.R., 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedstuffs. *Poultry Sci.* 55:303-308.
- Sibbald, I.R., 1979a. A bioassay for available amino acid and true metabolizable energy in feedstuffs. *Poultry Sci.* 58:668-673.
- Sibbald, I.R., 1979b. The effect of the duration of the excreta collection period on the true metabolizable energy values of feedingstuffs with slow rates of passage. *Poultry Sci.* 58:896-899.
- Spackman, D.H., W.H. Stein, and S. Moore, 1958. Automatic recording



- apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1190-1206.
- Titus, H.W., A.L. Mehring, D. Johnson, Jr. L.L. Nesbitt, and T. Tomas. 1959. An evaluation of M.C.F. (Micro-Cel-Fat), a new type of fat product. Poultry Sci. 38:1114-1119.
- 김은미, 우순자, 지규만, 1996. 주요 당류 및 해조류의 대사 에너지 함량 평가에 관한 연구. 한국영양학회지, 29:251-259.
- 박영호, 1968. 알긴산製造엔 관한 研究. I. 原藻成分組成의 季節的인 變化에 대하여. 부산수산대학 석사논문.
- 오상집, 1991. 사료 제조 및 가공의 과거와 미래. 사료가공 단기과정, 한국영양사료학회. P 138-140.

## 제 4 장 해조류 중 갈조류 및 면역기능성물질 첨가사료의 가축 내병성 및 생산성 연구

### 제 1 절 감태의 사료 내 첨가가 육계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향

#### 1. 서 론

감태는 갈조식물문(*phaeophyta*) 갈조식물강(*phaeophyceae*) 다시마목(*laminariales*) 다시마과(*laminariaceae*)에 속하는 다년생 갈조류로 모자반 속과 함께 우리 나라에서 가장 큰 해조이며, 일본 및 우리 나라 연안에만 국한되어 분포한다.

제주도 서귀포 앞 바다산인 감태(*Ecklonia cava kjellum*)에 대해 1년간 조사한 결과 단백질은 1~4월에 12.4%로 최고였고 8~9월에 6.0%로 최저였으며 봄부터 초여름까지 회분 및 alginic acid, 단백질 함량은 급속히 감소하는 반면 manitol 과 laminarin 함량은 급격히 증가하는 경향이 있다. 회분 및 alginic acid 함량의 계절적 변화는 연중 2회 극대기가 있어 회분 함량은 12~2월, 6~7월, alginic acid은 1~3월, 6~7월이 극대기이며, 최저치 시기는 모두 8~10월로 합성된 탄수화물의 저장형태인 laminarin과 manitol 과는 거의 반대양상을 나타냈다(高橋, 1943; 박영호, 1968).

해조류 종류별로 차이는 있으나 주성분은 탄수화물로 40%~65%를 차지하고 있으며(Amano, 1991), 대부분의 탄수화물은 육상식물과는 다른 구조 형태가 많다(Mackie와 Preston, 1974). 해조류 중의 식이섬유는 장의 활동을 원활하게 하고 식염, 중금속 등의 배출, 콜레스테롤의 혈관 내 침착 방지 등의 효과가 높다고 알려져 있으며, 최근에는 당류 성분에 항암 효과가 있다고 밝혀졌다(조경자 등, 1990). 해조류 내에는 인체 내에서 생리활성이 큰 수용성 식이

섬유소가 다량 함유되어 있으며(Lahaye, 1991), 종류에 따라 장내 세균이 분비하는 효소에 의해 일부가 분해되어 생리적 작용을 나타낸다고 한다(Sachie, 1993).

감태가 20% 함유된 해조분말을 5% 및 10%를 추가하여 초생추의 성장 및 섭취량 비교시 차이가 없어 3주령까지는 급여가 가능하나 이후에는 증체량과 사료효율이 떨어졌다고 하였으나(김형균, 1974), Kompiang과 Matondang(1985)은 자연 건조하여 분쇄한 해조분(*Gracilaria spp*)을 브로일러 사료에 8.0%까지 옥수수를 대치 급여해도 생산성에 영향을 미치지 않았다고 보고한 바 있다.

감태분을 1%~3% 수준으로 첨가하였을 때 비육돈에서 사양성적으로는 차이가 없었으나, 조단백질, 조지방 및 칼슘의 소화율은 감태분 3% 첨가시 현저히 떨어졌고, 감태분 첨가구의 등지방 두께가 증가하는 경향을 나타내고 2% 첨가시 A, B 등급 출현율이 가장 높아 감태분 첨가시 상대적으로 사료비 절감 및 비육돈 두당 이윤이 높다고 한다(Bae 등, 1999).

하정기 등(1975)은 병아리 사료원료로 소맥피를 해조분으로 10%까지 대체하여도 성장률, 사료요구율 및 사료섭취량에 큰 차이가 없다고 보고하였다. 한인규 등(1975)도 밀기울을 해조분으로 6%까지 대체시 증체량, 사료섭취량, 사료효율 및 폐사율 등에 유의차가 없어 독성이 없는 안전한 원료라 평가하였다. 한편, 염월형 등(1976)에 따르면 브로일러에 대한 강피류 대체시 모자반, 파래, 쇠미역 및 혼합해조분 모두 닭사료로서 10% 이내에서는 종류와 관계없이 대체가 가능하고 체내 영양소 이용성 평가를 위한 질소축적을 측정시 57%~67%가 이용되었다고 하였다.

해조 다당류로는 alginic acid, fucoidin, laminarin, mannitol 등이 있고 그 중 갈조류는 73%~82%를 alginic acid가 차지하고 있으며 특히, 알칼리가용성 alginic acid의 함량이 높은 반면 fucoidan 함량과 laminarin 함량은 낮다(김두상 등, 1995). 이러한 해조 탄수화물 중 다당류는 산성다당류의 성인병 예방효과, 갈조류의 sodium alginate에 의한 혈장콜레스테롤 저하효과와 fucoidan에 의한 제암효과, 홍조류 carrageenan에 의한 항혈액 응고효과(Kaneda 등, 1965; Schwarz, 1969; Yamamoto와 Maruyama, 1983; Sakagami, 1983)등 약리효과와 식이섬유로서의 역할(Noda, 1992) 등 해조류만이 가진 특수 기능성 성분을 이용한 유용성식품 개발의 연구가 많이 수행되고 있다. 또한 최근에 와서 식품

성분으로써 기본적인 영양적 역할 외에 여러 생리작용에 다양하게 작용할 수 있다는 연구들이 많이 보고되고 있고 특히, 면역능의 변화가 기능성 측면에서 관심을 끌고 있다(Goldberg, 1994).

따라서 본 실험은 감태의 화학적 및 영양적 가치 평가 자료를 이용하여 육계사료 내 감태의 수준별 첨가가 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험설계

사료 내 감태의 첨가가 육계의 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1 일령의 Ross 육계 수평아리 240수를 공시하여 4처리 3반복, 반복당 20수를 니플이 설치된 평사케이지(3.3 m<sup>2</sup>)에 임의 배치하여 총 35일간에 걸쳐 사양시험을 실시하였다. 감태를 각각 사료 내 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0%를 첨가하여 옥수수과 대두박을 기초로 단백질과 에너지를 동일하게 사료를 배합하였고, 시험사료의 에너지 및 영양소의 수준은 NRC(1994) 요구량을 기초로 하였다(Table 26).

또한, 사료 내 감태의 첨가가 육계의 내병성에 미치는 영향을 조사하기 위해 생산성 실험 종료 후 동일 처리구의 닭들을 선발하여 실험실의 무균 사육실에서 4처리 3반복, 반복당 6수씩 총 72수를 공시하여 니플이 설치된 2단 알루미늄 케이지에 임의 배치하여 *Salmonella gallinarum*( $8.0 \times 10^8$ cfu)을 1ml/수씩 근육주사 하였다. 실험 사료는 육계 생산성 실험과 동일한 배합비를 사용하였다. 이 때 감태(*Ecklonia cava*)는 자연 건조된 것을 사용하였으며, 제 2세부 과제에서 조사된 감태의 일반성분 분석치, 대사에너지 및 아미노산 이용률을 기초로 하여 실험 사료를 배합하였다.

### 나. 사양관리

본 시험은 외부환경에 의한 영향을 최소화할 수 있도록 온도와 점등을 조절할 수 있는 육계 시험용 무창계사에서 실시하였다. 실험 개시시 모든 처리구는 개시체중이 41.2~41.3g이 되도록 배치하고, 실험 종료시에 각 반복구의 체중을 측정하고 난 후 개체수로 나누어 종료시 평균체중을 구하였다. 물과 사료는 자유 채식시켰으며 매일 오전 9시에 사료를 급여하였다. 시험 전 기간동안 종일점등을 실시하였다.

### 다. 측정항목

### 1) 사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율 조사

사료섭취량은 매주 급여량과 잔량을 측정하여 계산하였고 증체량은 매주 동일한 시간에 체중을 측정하여 계산하였다. 전 실험기간동안 사료섭취량과 실험 종료시의 증체량을 근거로 사료요구율을 산출하였다.

### 2) 체조성 분석

사양실험 종료시 생체중의 평균에 해당하는 개체를 반복구별로 2수씩 도살한 후 간장을 채취하였고, 늑골내의 근위와 복부근육주위를 둘러싸고 있는 복강지방을 채취하여 중량을 측정하였다. 가식성 근육의 중량을 측정하기 위하여 가슴근육은 오른쪽 가슴의 안심을 포함한 근육을 채취하였고 다리근육은 오른쪽 고골(femur)상부에서 경골(tibia)하단까지 뼈를 포함한 무게를 측정하였다. 또한, 가슴에서 면역과 관련된 기관인 비장과 F낭을 채취하여 중량을 측정하였다. 채취한 모든 조직은 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다.

### 3) 육질 평가

채취한 오른쪽 가슴의 안심부위를 포함한 근육은 기계적 물성검사와 관능검사에 시료로 이용하였다. 가열 감량(cooking loss)을 구하기 위해 시료를 원형의 일정한 모양으로 절단하여 polypropylene bag에 넣어 75°C water bath(Dea Han Co, Model 10-101, Korea)에서 30분간 가열한 후 가열감량을 측정하였다. 가열 조리 후 직경 1.1cm의 원통형으로 근섬유 방향과 일치하도록 시료를 취하였고 Instron을 이용하여 전단력가(shear force value)를 측정하였다. 육색 측정은 시료의 표면을 colorimeter(Chromameter, CR210, Minolta, Japan)를 사용하여 명도(lightness)를 나타내는 L-value, 적색도(redness)를 나타내는 a-value와 황색도(yellowness)를 나타내는 b-value을 측정하였다. 이때의 표준색은 L-value가 97.83, a-value가 -0.43, b-value가 +1.98인 백색 표준판을 사용하였다.

관능검사는 25~35세의 7명의 훈련된 panel 요원을 구성하여 각 처리구별로 가열처리한 재구성육의 육색(color), 풍미(flavor), 조직감(texture), 다즙성(juiciness) 및 전체적인 맛(overall acceptability)에 대하여 10 point

hedonic-scale에 의해 평균치를 구하여 비교하였다. scale에서 1점은 가장 열악한 품질의 상태이며 10점은 가장 우수한 상태를 나타낸다.

#### 4) 깔짚내 균총 분석

실험 종료 후 모든 반복구에서 동일한 위치(니플 정중앙부분)에서 깔짚을 포함한 분을 가로 × 세로 각각 10cm씩 샘플을 취하여 냉동보관 시킨 후, 깔짚내 *E. coli*와 *Coliform*을 분석하였다. 분석방법은 먼저 깔짚 10g을 멸균된 0.85% NaCl solution 90ml에 넣고 homogenization 시킨 후 상등액 1ml을 취하여 9ml의 희석수에 넣고 vortexing하고 연속 희석법에 의해  $10^{-5}$ 까지 희석한 후, 각 단계의 희석액 1ml을 petri dish에 넣고 미리 멸균하여 50℃ 항온수조에 보관중인 배지를 15~20ml을 부어넣는다. 그 다음 희석액과 배지를 잘 섞은 다음 실온에 2~3분간 정치시켜 배지를 굳히고 37℃ 항온기에 넣어 24시간 배양한 후, 분홍색 집락을 계수하고 희석배수를 곱하여 균총을 계산하였다. 이때 사용한 *E. coli* 배지는 *E. coli* ID agar medium(Bio Merieux, France)이고, *Coliform* 배지로는 MacCONKEY agar medium(Scharlau Microbiology, European Union)을 사용하였다.

#### 5) *Salmonella* challenge에 따른 육계의 병변, 폐사율 및 조직 중량 변화

야외 분리된 *Salmonella gallinarum* 균주로부터 혈액 한천배지에서 집락 주위의 혈액을 분해하여 황색의 환을 형성하고 β-용혈성을 가지는 *Salmonella gallinarum*을 BHI(brain heart infusion) 한천배지에 도말하여 37℃에서 배양하였다. 형성된 집락은 BHI 액체배지에 접종하여 37℃에서 하루동안 배양하였고, 다시 sheep blood를 5%(v/v) 함유한 BHI 액체배지에 1%(v/v)를 접종하여 37℃에서 하루동안 배양한 후 시험에 이용하였다.

시험 개시 후 37일령에 준비된 *Salmonella gallinarum*을 자동연속주사기를 사용하여 수당 1 ml( $8.0 \times 10^8$ cfu)를 근육주사한 후 매일 폐사의 진행을 기록하였으며 *Salmonella* challenge 7일 후 생존한 개체의 간장과 비장을 취하고 그 무게를 측정하였다.

#### 라. 통계분석

실험에서 얻어진 자료들의 통계분석은 statistical analysis system(SAS, 1996)의 general linear model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 통해 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였다.



Table 26. The composition of experimental diet for broilers

Ingredients	Control	<i>Ecklonia cava</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
Yellow corn	54.87	54.82	54.35	53.31
Soybean meal	34.00	33.91	33.15	31.36
Corn gluten meal	3.51	3.56	3.97	4.95
Animal fat	4.00	4.00	4.00	4.00
Limestone	0.56	0.55	0.52	0.46
Tricalcium phosphate	1.95	1.95	1.96	1.98
Lysine-HCl	0.17	0.18	0.20	0.25
DL-methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline-Cl	0.04	0.04	0.05	0.07
Mineral mix <sup>1</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>2</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.39	0.38	0.28	0.10
Antioxidant	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>Ecklonia cava</i>	-	0.10	1.00	3.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated analysis				
Crude protein(%)	22.00	22.00	22.00	22.00
Crude fat(%)	6.42	6.42	6.40	6.36
Crude fiber(%)	3.00	3.03	3.32	3.95
Ash(%)	5.62	5.63	5.71	5.93
Ca(%)	1.00	1.00	1.00	1.00
Available P(%)	0.45	0.45	0.45	0.45
TME <sub>n</sub> (kcal/kg)	3060	3060	3060	3060

<sup>1</sup> Mineral mixture provided following nutrients per kg of diet:

Mn, 77mg; Zn, 57.2mg; I, 1.32mg; Se, 0.11mg; Cu, 27.5mg

<sup>2</sup> Vitamin mixture provided following nutrients per kg of diet:

Vitamin A, 15,600IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 3,120IU; Vitamin E, 15.6mg; Vitamin K<sub>3</sub>, 0.91mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.026mg; Niacin, 52mg; Oxystat, 65mg; Biotin, 0.039mg; Folacin, 0.39mg; Pyridoxin, 1.3mg; Riboflavin, 13mg; Pantothenic acid, 15.6mg

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율

1일령에서 35일령까지 총 5주간 옥수수과 대두박을 기초로 한 대조구 및 감태를 각각 0.1%, 1.0%, 3.0% 육계에 급여하였을 때의 개시체중, 종료시 체중, 일당사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율을 Table 27에 나타내었다.

일당사료섭취량은 감태 1.0%, 3.0% 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았고( $P<0.05$ ), 일당증체량은 모든 감태 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았다( $P<0.05$ ). 사료요구율은 0.1% 감태 첨가구에서 1.72로 가장 낮았고 감태 3% 첨가구가 1.84로 가장 높았다( $P<0.05$ ). 이는 대조구 및 각 처리구 실험사료의 영양소 함량은 유사했으나 감태의 영양적 가치 평가 결과 TAAA가 낮은 것으로 미루어 감태의 첨가 수준이 증가함에 따라 영양소 소화율에 영향을 미친 것으로 추정된다. 한편, 일당증체량 결과를 근거로 볼 때 감태의 육계 사료 내 첨가는 성장 촉진의 효과가 우수하여 사료자원화가 매우 바람직하다고 사료되며, 해조류가 가진 기능성 성분의 효과에 의한 결과인지에 대하여는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

김형균(1974)은 초생추에 있어서 해조분말의 사료가치시험에서 해조분을 초생추 사료에 각각 5%와 10%를 첨가한 결과 대조구에 비하여 첨가구 모두 증체량이 심하게 떨어졌으나 사료섭취량이 전 기간중 유의차가 나타나지 않았고 사료효율은 유의하게 저하하였다고 보고한 바 있으며, 염월형 등(1976)은 브로일러에 대한 강피류 대체 사료로서의 해조분의 이용 시험에 관한 보고에서 8%~12%까지는 강피류 대체가 가능하였고 사료섭취량, 사료효율은 전처리 구간에 유의차가 없었다고 보고하였다. 이러한 연구보고들의 결과는 해조류의 종류나 생산지, 채취시기, 채취부위 및 처리방법에 따라 조성분의 차이가 있다 (박영호, 1968)는 것에 따른 결과로 사료된다. 본 실험 결과 감태는 육계사료의 원료로서 그 가치가 인정되며, 0.1% 감태 첨가구가 경제성 및 생산성에서 가장 효과가 큰 것으로 나타났으나 육계사료 내 1%의 감태 첨가 사용도 사료효율과 성장률에 있어 무방하다고 사료된다.

Table 27. Effect of dietary supplementation of *Ecklonia cava* on performance of broiler chicks

Items	Control	<i>Ecklonia cava</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
Initial body weight, g	41.3	41.2	41.3	41.2
Final body weight, g	1616.4 <sup>b</sup>	1733.5 <sup>a</sup>	1742.2 <sup>a</sup>	1683.8 <sup>ab</sup>
Feed consumption, g/d/bird	78.30±1.0 <sup>b</sup>	81.06±1.4 <sup>b</sup>	85.12±1.0 <sup>a</sup>	85.93±0.8 <sup>a</sup>
Body weight gain, g/d/bird	44.39±0.5 <sup>b</sup>	47.06±0.6 <sup>a</sup>	47.15±0.9 <sup>a</sup>	46.65±0.6 <sup>a</sup>
Feed conversion rate, feed/gain	1.76±0.03 <sup>bc</sup>	1.72±0.01 <sup>c</sup>	1.81±0.01 <sup>ab</sup>	1.84±0.01 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Means ± SE within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

#### 나. 체조성에 미치는 영향

감태의 첨가가 시험 종료시 가슴근육, 다리근육, 간장, 복강지방, 비장 및 F낭의 상대적 증량변화에 대한 결과를 Table 28에 나타내었다.

종료시 얻어진 각 조직은 생체중에 대한 상대적 증량으로 표시하였다. 각 조직의 생체중 100g당 상대적 증량은 대조구와 처리구간에 유의차가 나타나지 않았으나 다리 근육에 있어서 감태 첨가구(0.1, 1.0, 3.0%)가 대조구에 비하여 다소 높았고, 복강지방은 감태 첨가구가 대조구에 비하여 다소 낮은 경향을 보였다. 이 결과로 미루어 육계사료 내 감태의 첨가 수준을 더 많이 증가시켰을 때 복강지방 감소에 대한 영향 및 도체 수율의 개선과 관련한 연구는 계속 생산비 절감을 위한 하나의 방안이 될 수도 있다고 사료된다. 육계의 체조성과

연관한 감태 및 해조류의 연구 보고는 전무한 실정으로 선행된 연구 결과와 비교는 할 수 없었으나, 본 실험 결과 감태 3%까지 첨가는 육계의 체조성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 28. Effect of dietary supplementation of *Ecklonia cava* on relative organ weight of broiler chicks<sup>1</sup>

Items	Control	<i>Ecklonia cava</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
----- g/100g body weight -----				
Breast muscle	7.76±0.22	7.54±0.19	7.58±0.16	7.72±0.12
Leg muscle	9.22±0.27	9.90±0.14	9.95±0.38	9.47±0.31
Liver	1.90±1.60	2.12±0.15	1.93±0.09	1.94±0.08
Abdominal fat	1.46±0.08	1.36±0.06	1.21±0.15	1.22±0.13
Spleen	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.09±0.01
Bursa of fabricius	0.27±0.04	0.26±0.02	0.29±0.01	0.28±0.04

<sup>1</sup> Values are means ± SE

다. 육질에 미치는 영향

감태의 첨가가 시험 종료시 육질에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 29에 나타내었다. 가열감량과 전단력에 있어서 처리구간에 유의한 차이가 인정되지 않았다. 육색에 있어서 명도를 나타내는 L 값은 처리구간 차이가 없었으며, 적색도를 나타내는 a 값은 1% 처리구가 가장 높았고(P<0.05), 황색도를 나타

내는 b 값은 3% 처리구가 가장 높게 나타났으나 대조구와 통계적 차이를 발견할 수는 없었다.

관능검사에 있어서 풍미, 조직감, 다즙성에 있어서는 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 전체적인 맛에서는 0.1% 처리구에서 가장 좋은 것으로 나타났으나(P<0.05), 전체적인 기호도는 처리구간에 유의차가 나타나지 않았다. 해조류의 첨가가 육질에 미치는 영향에 관한 선행 연구 보고가 전무하여 본 연구 결과와의 비교 해석에 어려움이 있으며 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다. Bae 등(1999)은 사료내 해조분의 사용이 비육돈의 성장 및 도체 특성에 미치는 영향에 관한 연구에서 해조분의 수준이 2% 이상되는 수준에서는 등심의 무게가 증가하는 경향을 나타냈으며, A, B 등급 출현율은 해조분 2% 첨가구에서 가장 우수한 성적을 나타내었다고 보고하였다.

Table 29. Effects of dietary supplementation of *Ecklonia cava* on meat quality in broiler chicks

Variables	Control	<i>Ecklonia cava</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
Cooking loss(%)	17.00±0.33	16.74±0.75	16.45±0.45	16.18±0.33
Shear force value(kg)	2.43±0.39	2.35±0.20	2.56±0.25	2.65±0.22
Meat color				
L	54.40±1.15	53.30±0.73	53.86±0.72	55.90±1.07
a	8.99±0.63 <sup>ab</sup>	9.22±0.39 <sup>ab</sup>	9.70±0.38 <sup>a</sup>	8.22±0.36 <sup>b</sup>
b	9.62±0.74 <sup>ab</sup>	7.75±0.47 <sup>b</sup>	8.84±1.05 <sup>b</sup>	11.68±0.69 <sup>a</sup>
Panel test				
Flavor	8.08±0.11	8.17±0.13	7.94±0.09	7.94±0.07
Overall acceptability	7.99±0.08 <sup>ab</sup>	8.11±0.16 <sup>a</sup>	7.67±0.11 <sup>b</sup>	7.97±0.05 <sup>ab</sup>
Texture	8.18±0.09	8.42±0.12	8.10±0.15	8.19±0.23
Juciness	7.65±0.12	7.64±0.15	7.56±0.15	7.58±0.13

<sup>a,b</sup> Means ± SE within the same row with no common superscripts differ significantly(P<0.05).

라. 깔짚내 균총 분석

감태의 첨가가 시험 종료시 깔짚 내 균총에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 30에 나타내었다. 깔짚내 *E.coli* 수와 *Coliforms* sp.은 모든 처리구간에 통계적 유의차가 없었다. 가축 사료내 해조류의 첨가시 깔짚내 균총에 미치는 영향에 관한 선행 연구 결과가 거의 전무하였으며, 우리나라에서도 아직 해조류의 항균성분에 관한 연구보고는 찾아보기 힘들어 본 실험 결과와 직접적으로 비교하기는 어려웠으나 몇몇 선행연구에 의하면 해조류에서 추출한 특정성분이 세균의 발육을 저해하는 작용이 있다는 연구(Pratt 등, 1951; Vacca와 Walsh, 1954)가 있는 것으로 보아 차후 이러한 연구를 수행할 때 가축의 장내 미생물 균총의 변화 및 깔짚내의 미생물도 함께 살펴보는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Table 30. Effects of dietary supplementation of *Ecklonia cava* on microflora in broiler chicks litters<sup>1</sup>

Variables	Control	<i>Ecklonia cava</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
-----log cfu/g-----				
<i>E.coli</i>	4.44±0.68	4.58±0.23	4.55±0.14	4.34±0.12
<i>Coliforms</i> sp.	4.74±0.61	5.07±0.42	4.66±0.96	5.08±0.47

<sup>1</sup> Values are means ± SE

라. *Salmonella* challenge 에 따른 육계의 병변, 폐사율 및 조직 중량 변화

시험 개시 후 37일령째 *Salmonella gallinarum* challenge에 따른 육계의 조직 중량 변화 및 폐사율은 Table 31에 나타내었다.

본 실험에서 처리당 4마리씩 도살된 닭의 총배설장 주변의 분변이 녹색으로 보이는 증상은 대조구에서 3수, 감태 0.1%, 1.0% 첨가구에서 각각 2수, 감태 3.0% 첨가구에서는 1수로 나타났으며, 해부 시 소장부위를 절단하여 출혈여부를 살펴본 결과 대부분의 닭에서 출혈은 나타나지 않았다.

살모넬라에 감염된 닭을 도살해 본 결과 간장 무게는 감태 3.0% 첨가구가 2.10g/100g로 가장 낮았지만 처리간 유의차는 없었다. 비장 무게 역시 감태 3% 첨가구가 가장 낮은 0.08g/100g로 나타났으나 처리간 차이는 없었다. 살모넬라에 감염된 닭들은 3일째부터 폐사가 일어나기 시작하였고(결과를 나타내지는 않음) 모든 처리구에서 대략 22%의 폐사가 발생하여 처리구간 유의차는 없는 것으로 나타났다.

본 연구는 살모넬라 감염에 따른 육계의 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 조사하고자 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 함량을 측정하였으나 명확한 결과를 얻지 못하였다(결과를 나타내지 않음). 이러한 이유는 살모넬라 감염 이후 육계가 폐사하는 시점이 3일이 지나고 7일이 지났는데도 불구하고 당초 예상했던 폐사율이 50% 이상이 진행되지 못하였으며 이 후 계속해서 지켜봐도 폐사가 진행되지 않은 것으로 보아 본 실험에서 이용한 실험동물의 육계품종이 살모넬라에 다소 내병성이 강한 품종으로 생각되며, 또한 근육접종의 방법에 살모넬라 감염에 대해 다소 감수성이 떨어지지 않았나 생각된다. 따라서 어느 시점에서 정확하게 혈액을 채취해야 하는지에 대한 문제점이 있었던 것으로 사료되며 이러한 이유로 혈액내의 정확한 TNF- $\alpha$ 의 함량을 측정하지 못하였던 것으로 생각된다. 추후 이와 유사한 실험을 실시 할 때는 살모넬라 접종의 방법을 근육내 접종에서 경구투여 방법으로 바꾸는 방법으로 실시할 예정이다.

한편, 혈액내의 TNF- $\alpha$  이외에 실제 육계 농장에서 문제시 되는 질병에 대한 백신(예: ND, IB, IBD 등)을 백신 프로그램에 맞추어 접종한 후 항체 역가의 변화를 살펴보기 위해 실험 개시전과 주마다 혈액을 채취하여 혈액내의 각종 백신에 대한 역가(titer)을 측정하는 방법으로 실험을 실시해 보는 것도 좋을 것으로 사료된다.

Table 31. Effects of dietary *Ecklonia cava* on relative organ weights and mortality after 7 days of *Salmonella* challenge in broiler chicks<sup>1</sup>

Items	Control	<i>Ecklonia residue</i>		
		0.1%	1.0%	3.0%
Liver, g/100g BW	2.68±0.11	2.63±0.54	2.56±0.33	2.01±0.08
Spleen, g/100g BW	0.12±0.02	0.14±0.02	0.14±0.04	0.08±0.01
Mortality(%)	22.2	22.8	22.8	22.2

<sup>1</sup> Values are means ± SE



#### 4. 적요

감태의 화학적 및 영양적 가치 평가 자료를 이용하여 육계사료 내 감태의 수준별 첨가가 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

본 실험은 제 2세부과제의 감태의 화학성분 분석치와 TME<sub>n</sub>과 TAAA를 이용하여 육계 사료 내 감태의 첨가가 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1일령 ROSS 육계 수평아리 240수를 공시하여 20수씩 4처리 3반복으로 임의 배치하여 35일간 실시하였다. 실험 결과 일당사료섭취량은 감태 1% 및 3% 첨가구가 대조구에 비해 유의하게 높았으며 일당증체량은 감태 첨가구 모두 대조구에 비하여 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ). 사료요구율은 감태 0.1% 첨가구가 가장 낮았으며, 가슴근육, 다리근육, 간장, 복강지방, 비장, 및 F낭의 상대적 중량 변화에 있어서도 모든 처리구간에 유의차가 나타나지 않았다. 육질(가열감량, 전단력, 관능검사)에 있어서도 유의한 차이가 없었으나 육색에 있어서 적색도를 나타내는 a 값은 감태 1% 첨가구가 가장 높았고 3% 첨가구가 가장 낮았다. 깔짚 내 균총을 조사해 본 결과 *E. coli* 및 *Coliforms* sp.에 있어서 처리구간 통계적인 유의차가 없었다. 따라서 감태는 육계사료에 3% 까지 사용이 가능하며, 0.1% 첨가수준이 가장 우수한 것으로 나타났다. 내병성 효과평가를 위하여 동일한 방법으로 사육 후 시험 37일째 살모넬라를 근육주사하여 공시계의 폐사 및 내장 무게의 변화를 관찰하였다. 그 결과 폐사율 및 간장과 비장 무게는 처리구간에 차이가 없었다.

## 5. 참고문헌

- Amano, H., 1991. Biochemistry and biotechnology of seaweed. In Marine biochemistry, K. Yamaguchi, ed., Tokyo University Press, Japan, pp. 170-171 (in Japanese).
- Bae, K.H., W.D. Chung, W.T. Cho, C.B. Yang, and I.K. Han, 1999. Effects of kelp meal on the growth performance and carcass characteristics of finishing pigs. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 23:163-172.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric.* 11:1-4.
- Goldberg, I., 1994. Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Chapman & New York.
- Kaneda, T.P., V. Kamasastri, and S. Tokuda, 1965. Studies on the effects of marine products on cholesterol metabolism in rat. V. The effect of edible seaweeds (supplement). *Bull. Japan. Fish. Sci. Soc.* 31: 1026-1029 (in Japanese).
- Kompiang, I.P., and R. Matondang, 1985. Seaweed in poultry diet. *Proc. 3rd. AAAP Anim. Sci. Congr.* pp. 647-649.
- Lahaye, M., 1991. Marine algae as sources of fibres: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J. Sci. Food Agri.* 54:587-594.
- Mackie, E., and R.D. Preston, 1974. Cell wall and intercellular region polysaccharides. In: *Algal physiology and biochemistry.* Stewart, W. D. P. ed. Blackwell Scientific publications Ltd., Oxford, pp. 58-75.
- Noda, H., 1992. Chemistry of Seaweed. In: *Chemistry of Fisheries Utilization*, Konosu, S. and K. Hashimoto, eds. Koseisha, Koseiku, Tokyo, Japan. pp. 304-306 (in Japanese).
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press. Washington D.C.
- Pratt, R., H. Mautner, G.M. Gardner, Y.H. Sha, and J. Dufrenoy. 1951. Report on antibiotic activity of seaweed extracts. *J. Amer. Pharm.*

- Assoc. 90:575-579.
- Sachie, I., 1993. Dietary fiber and function of digestion and absorption. *Eiyougakuzassi*. 51:251-258 (in Japanese).
- Sakagami, Y., 1983. Antinuclear compounds. In: *Biochemistry and utilization of marine algae*. Nippon Suisan Gakakai, ed. Goseisha Goseigaku, Tokyo, Japan, pp. 90-100 (in Japanese).
- SAS, 1996. SAS User's guide. Statistical Analysis System institute. Inc. Cary NC.
- Schwarz, H.J., and R.W. Kellenemyer, 1969. Carrageenan and delayed hypersensitivity. II. Activation of HAGEMAN factor by carrageenan and its possible significance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132:101-1024.
- Vacca, D.D., and R.A. Walsh, 1954. The antibacterial activity of an extract obtained from *Ascophyllum nodosum*. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 93:24-26.
- Yamamoto, I., and H. Maruyama, 1983. Cancer protection effect of edible seaweed, especially laver, on DMH induced intestinal cancer of rat. Abstract of 42nd general meetings. Japanese Society of Cancer, P. 260 (in Japanese).
- 高橋武雄, 構山實, 1943. 本邦産 褐藻類의 化學的 組成(제2보), 朝鮮産 褐藻類의 化學的 組成(I). *一農化*, 20:522.
- 김두상, 이동수, 조득문, 김형락, 변재형, 1995. 식용해조류중의 미량요소와 특수기능성 당질: 2. 산지와 채취시기별 식이성섬유질 함량의 변화와 해조 다당류의 분포. *한국수산학회지*, 28:270-278.
- 김형균, 1974. 초생추에 있어서 해조분말의 사료가치시험. *한국축산학회지*, 16:330-335.
- 박영호, 1968. 알긴산제조엔 관한 研究. I. 原藻成分組成的의 季節的인 變化에 대하여. 부산수산대학 석사논문.
- 조경자, 이영숙, 류병호, 1990. 청각과 김에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국수산학회지*, 23:345-352
- 염월형, 지설하, 이영철, 1976. 부로일러에 대한 강류대치사료로서의 해조분의

이용 시험. 한국축산학회지, 18:349-354.

한인규, 이봉덕, 윤덕진, 백인기, 1975. 사료자원 개발을 위한 연구: I. 부로일리에 대한 해조분의 사료적 가치에 관한 연구. 한국축산학회지, 17:207-213.

하정기, 송우준, 고영두, 1975. 병아리 사료에 밀기울 대체로써 말의 효과. 한국축산학회지, 17:144-148.

## 제 2 절 감태 부산물의 사료 내 첨가가 산란계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향

### 1. 서론

갈조류의 alginic acid를 포함한 풍부한 다당류는 장내 세균의 에너지원으로 사용되어 유익균총을 형성함으로써 각종 소화기성 질병을 억제하고 사료의 이용성을 개선시키는 것으로 알려져 있다. 한편, 풍부한 렉틴(lectin)과  $\beta$ -glucan 계열의 laminarin 등은 면역세포를 자극하여 질병 저항력을 증진시키는 기능을 수행하며, 해조류 특유의 NDF는 콜레스테롤의 흡착, 배설효과가 뛰어나 장내 부패산물을 배설시키는 기능을 수행하여 독소의 작용을 방지하는 역할을 한다(Goldberg, 1994).

렉틴은 생물체 내에서 적혈구 세포 및 여러 가지 세포를 응집시키는 성질과(Matsubara와 Boyd, 1966) 암세포를 응집시키는 능력(Sharon과 Lis, 1989) 그리고 mitogenic factor로 lymphocyte 및 macrophage 등 면역관련 세포들을 자극하며 항원에 의한 세포성 및 체액성 면역에 중요한 역할을 한다(Debets 등, 1988).

한편, 한국산 갈조류 중 감태의 렉틴 추출 물질이 안전한 세포성 및 체액성 면역증강제라고 보고되었으며(이성태, 2001), 감태에서 렉틴을 추출하고 남은 부산물에는 미추출 렉틴 성분 외에도 제 2세부과제와 같이 영양적 성분이 남아 있으나 산업 폐기물로 처리되는 실정이다. 따라서 감태부산물의 사료 자원으로서의 유용성과 활용 가능성을 조사하기 위하여 본 실험은 제 2세부과제에서 측정된 감태부산물의 화학적 성분 분석치와 TME<sub>n</sub>, TAAA를 토대로 하여 산란계의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시험설계

37주령 Hy-line Brown 산란계 64수를 공시하여 4처리 4반복, 반복당 4수를 니플이 설치된 2단 알루미늄 케이지에 임의 배치하여 총 4주간에 걸쳐 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 옥수수, 대두박을 기초로 하여 감태부산물 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0%씩 첨가하여 4주간 급여하였다. 시험사료의 에너지 및 영양소의 수준은 NRC(1994) 요구량을 기초로 하였으며 시험사료의 배합비 및 영양소함량은 Table 32에 나타내었다.

4주 동안의 산란계 생산성 실험 종료 후 생산성 실험과 동일한 처리구와 반복구를 가지고 시험 29일째 *Salmonella*를 경구 투여하여 내병성에 미치는 효과를 조사하였다. 다만, *Salmonella*를 주입하지 않은 처리구를 두어 별도로 사육하면서 *Salmonella*에 감염된 처리구들과 비교하였다. 실험에 사용된 *Salmonella*(*Salmonella gallinarum*)균은  $8.6 \times 10^8$  cfu를 배양하여 모든 처리구에 각 개체마다 1ml씩 경구투여 하였다.

감태부산물(*Ecklonia residues*)은 자연 건조된 감태로부터 수용성 물질을 추출하고 남은 부산물을 이용하였으며, 제 2세부과제에서 조사된 감태부산물의 일반성분 분석치, 대사에너지 및 아미노산 이용률을 기초로 하여 실험 사료를 배합하였다.

### 나. 사양관리

본 시험은 외부환경에 의한 영향을 최소화 줄일 수 있도록 온도와 점등을 조절할 수 있는 산란계 시험용 무창계사에서 실시하였다. 물과 사료는 자유 채식시켰으며 매일 오전 9시에 사료를 급여하였다. 시험 전기간동안 점등은 17L:7D로 일정하게 유지하였다.

### 다. 조사항목

- 1) 사료섭취량, 산란율, 평균난중, 일산란량

매주 오전 9:30에 잔량을 측정하여 사료섭취량을 조사하였고, 시험기간 중 매일 오전 10:00에 산란수와 난중을 측정하여 산란율 및 평균난중을 조사하였다. 산란율은 연·과란 등을 모두 합한 총 산란수를 사육수수로 나누어 구하였으며, 난중은 정상란의 평균난중으로 하였다. 각 처리별, 반복별로 매일 생산된 계란의 총 무게를 산란된 계란 갯수로 나누어 평균 난중을 구한 후 산란율을 곱하여 일산란량을 산출하였다.

## 2) 계란의 품질(난각강도, 난각두께, Haugh Unit, 난황색)

시험사료 급여 후 매주 생산된 계란을 처리구당 무작위로 12개씩 수집하여 전란의 무게와 난황의 무게를 측정하였으며, 난각강도계(FHK Co., Japan)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로하여 수직으로 고정하고 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각 두께는 계란의 침단부, 둔단부 및 중앙부 3곳의 난각 파편을 채취하여 난각후도계(FHK Co., Japan)를 통해 측정된 두께의 평균치로 하였다. 난백고를 측정하여 Haugh Unit를 구하였으며(FHK 卵白測定台, FHK Co., Japan), Roche egg yolk color fan에 해당하는 색조 수치로 하였다.

## 3) 계란 난황 내 지질 함량 및 지방산 조성 조사

난황내 지질 함량 및 지방산 분석을 위한 sample은 시험종료일에 계란을 수집하여 난황만을 분리한 후 분석 시까지 냉동보관 하였다.

### 가) 난황 지질의 추출

지방산 분석을 위한 전처리는 수집한 계란에서 난황을 분리하고 잘 섞은 후 Folch 등(1957)의 방법에 의해 다음과 같이 처리하였다. 난황 1.5g에 Folch solution (chloroform:methanol=2:1, v/v, Folch 등, 1957)을 난황무게의 20배를 넣고 고속으로 3분간 homogenizing 하였다. 이 후 200ml cylinder로 Whatman #2 filter paper를 이용해 여과 후 Folch solution의 1/4 volume의 0.9% 생리식염수를 첨가하여 잘 혼합한 후 정치시키면 수용액층과 유기용매층으로 분리된다. Glass stopper를 이용하여 하층만을 분리하고 EYELA evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 유기용매를 제거하고 지질만을 분리한 후 N<sub>2</sub> gas로 남은

유기용매를 완전히 제거한 후 무게를 측정하여 난황내 지질의 함량을 얻었다.

#### 나) 지방산의 Methylation

Sukhija와 Palmquist(1988)의 방법으로 2ml의 chloroform을 넣어 유지를 녹인 후 이것을 지방산 분석용 sample로 이용하였다. 그리고 sample 0.6ml을 test tube에 넣고 methanolic HCl(methanol:acethyl chloride, 95:5, v/v) 3ml과 혼합하여 water bath에서 2시간 동안 95°C이상 유지시키면서 heating하여 methylation 시킨 후 hexane 1ml을 넣고, 6% potassium carbonate( $K_2CO_3$ ) 10ml로 반응시킨 다음, 원심분리(1,500 rpm×10min)하여 상층액을 취하여 활성탄과 sodium sulfate anhydrous( $Na_2SO_4$ )를 이용하여 색소와 수분을 제거하고 얻어진 최종 sample은 gas chromatography(Hewlett packard 6890 series)에 1  $\mu$ l를 injection 하였다.

#### 다) 지방산 조성의 분석

냉동 보관된 난황지질 시료를 Sukhija와 Palmquist(1988)의 방법에 의해 메틸 에스테르한 후 GC(HP 6890 series GC System, Hewlett packard, PA, USA)로 분석하였다. GC에는 FID(Flame Ionization Detector)가 장착되어 있으며, 칼럼은 fused silica capillary column [Omegawax 320;30×0.32mm(i.d.) with 0.25 $\mu$ m film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA] 을 사용하였고, 질소를 carrier gas로 하였다. Oven 온도는 다음과 같이 프로그램 하였다. 즉 초기 온도를 60°C로 하여 2분간 정치한 후, 190°C까지는 분당 5°C씩 증가시키고 3분간 정치, 225°C까지는 분당 1°C씩 증가시키고 1분간 정치하였다. Injector와 detector의 온도는 250°C로 고정하였다. 지방산의 standard는 Fame mix C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>(Supelco. Co. USA)를 이용하였으며, standard retention time과 비교하여 각 지방산의 peak를 확인하였다. Data는 Integrator(HP 3395; Hewlett packard, PA, USA)를 이용하여 산출하였다.

#### 4) 혈액분석

혈액 sample은 생산성 실험 종료시 각 처리구에서 4수씩 무작위로 선발하여 익하정맥에서 1회용 주사기를 이용하여 5ml를 채취하였다. 채취한 혈액



sample은 혈액 응고를 방지하기 위해 heparin으로 처리된 tube를 사용하였으며 채취후 원심 분리(1500rpm×15min.)하여 plasma를 얻었다. 혈장 내 GPT(gamma-pyruvate transpeptidase), GOT(glutamate-oxaloacetate transaminase), total lipid, total cholesterol 함량을 자동 혈액 분석기(Hitachi 7600-110, 7170)를 이용 측정하였다.

#### 5) *Salmonella* challenge에 따른 폐사율 및 조직 중량 측정

야외 분리된 *Salmonella gallinarum* 균주로부터 혈액 한천배지에서 집락 주위의 혈액을 분해하여 황색의 환을 형성하는 β-용혈성을 가지는 *Salmonella gallinarum*을 BHI(Brain Heart infusion) 한천배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 형성된 집락은 BHI 액체배지에 접종하여 37°C에서 하루동안 배양하였고, 다시 sheep blood를 5%(v/v) 함유한 BHI 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 하루동안 배양한 후 시험에 이용하였다.

사양시험 종료 후 준비된 *Salmonella gallinarum*을 자동연속주사기를 사용하여 수당 1 ml ( $8.6 \times 10^8$  cfu)를 경구투여 한 후 매일 폐사의 진행을 기록하였고 *Salmonella* challenge 3일 후 생존한 개체의 익하정맥으로부터 혈액을 각 처리구별로 4수씩 5ml를 채취하여 TNF-α assay에 이용하였다. 그리고 간장과 비장을 취하여 그 무게를 측정하고 생체중 100g당 g으로 표기하였다.

#### 6) Sandwich ELISA법을 이용한 TNF-α assay

TNF-α assay는 Fomsgaard 등(1988)의 방법을 기초로 하여 실시되었다. Lyophilized rabbit anti-mouse TNF-α polyclonal antibody(ID Labs Inc.)를 96 well plate에 coating하고 3% BSA-PBST solution으로 blocking시켰다. TNF-α standard는 lyophilized recombinant murine TNF-α(ID Labs Inc.)를 사용하였으며, 각 standard tube의 농도는 #1⇒ 1,000 pg/ml, #2⇒ 200 pg/ml, #3⇒ 100 pg/ml, #4⇒ 50 pg/ml, #5⇒ 25 pg/ml로 하였다.

Blank를 포함하여 준비된 6종류의 TNF-α standard solution을 96 well(precoated with rat anti-mouse TNF-α)에 50 μl씩 넣고, 50 μl plasma를 각 designed well에 넣었다. 그리고, 각 well에는 50 μl PBS buffer를 첨가하여 pH를 7.5로 중화시켰다. Plate를 37°C에서 1시간 동안 배양한 후

washing buffer(250  $\mu\text{l}$ /well)로 6번 씻어 내었다. 다음으로 primary antibody인 goat anti-murine TNF- $\alpha$  polyclonal antibody(ID Labs Inc.) 50  $\mu\text{l}$ 을 pre-coated 96 well에 첨가하여 혼합한 뒤, 1시간 동안 실온에서 배양한 후, washing buffer(250  $\mu\text{l}$ /well)로 6번 씻어낸 후, 증류수로 1번 씻어 내었다.

이후에 secondary antibody인 50  $\mu\text{l}$  streptavidin-HRP(horseradsh peroxidase) conjugate(Zymed Laboratories Inc.)를 pre-coated 96 well에 넣어 실온에서 1시간 배양하였고, 위에서와 같이 washing buffer(250  $\mu\text{l}$ /well)로 6번 씻어낸 후, 증류수로 2번 씻어 내었다.

여기에 100  $\mu\text{l}$  TMB(3,3',5,5; tetra methyl benzidine) single solution (Zymed Laboratories Inc.)을 pre-coated 96 well에 넣고 각 well별로 차별성이 있는 푸른 색깔이 나타나면(약 15분간 배양) stop solution( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 노란색으로 바뀌면서 반응이 고정되면, 450 nm에서 ELISA reader로 측정하여 TNF- $\alpha$ 의 양을 분석하였다.

#### 라. 통계분석

실험에서 얻어진 자료들의 통계분석은 statistical analysis system(SAS, 1996)의 general linear model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 통해 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였다.

Table 32. The composition of experimental diet for laying hen

Ingredients	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1.0%	3.0%
Yellow corn	65.20	65.20	64.90	64.30
Soybean meal	23.10	23.10	22.80	22.10
Dicalcium phosphate	1.68	1.69	1.69	1.72
Salt	0.24	0.24	0.23	0.20
Limestone	8.62	8.51	8.23	7.53
Vitamin-mineral mix <sup>1</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
DL-methionine	0.06	0.06	0.06	0.05
Animal fat	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Ecklonia</i> residue	-	0.10	1.00	3.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated Analysis				
Crude protein(%)			15.45	
Crude fat(%)			3.44	
Crude fiber(%)			3.42	
Ash(%)			12.87	
Ca(%)			3.64	
Available P(%)			0.35	
TME <sub>n</sub> (kcal/kg)			2,850	

<sup>1</sup> Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: Vitamin A, 12,000IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 4,000IU; Vitamin E, 30mg; Vitamin K<sub>3</sub>, 2mg; Vitamin B<sub>1</sub>, 2mg; Vitamin B<sub>2</sub>, 8mg; vitamin B<sub>6</sub>, 4mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 20mg; Niacin, 30mg; Oxystat, 65mg; Biotin, 0.2mg; Folic acid, 1mg; Pantothenic acid, 12mg; Mn, 65mg; Zn, 65mg; I, 1mg; Se, 0.15mg; Cu, 9mg, Fe, 60mg, Co, 0.15mg.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 사료섭취량, 산란율 및 난중의 변화

산란계 사료 내 감태부산물(*Ecklonia* residue)을 각각 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0%를 첨가하여 4주간 급여하였을 때 사료섭취량, 산란율 및 난중의 변화에 대한 결과를 Table 33에 나타내었다.

사료섭취량은 대조구를 포함한 모든 처리구에서 비슷하였다. 산란율에 있어서는 감태부산물 0.1% 및 1.0% 첨가구에서는 대조군과 비슷하였으나 3.0% 첨가구에서는 대조군을 비롯한 다른 처리구와 비교하여 유의하게 낮았고 ( $P<0.05$ ), 평균 난중은 감태부산물 0.1% 첨가구에서 가장 높았다( $P<0.05$ ). 그러나 1.0% 및 3.0% 첨가구에서는 이러한 결과는 관찰되지 않고 대조구와 비슷한 결과를 나타냈다. 따라서, 일산란량도 대조구와 0.1% 첨가구가 60~62g/d/bird 로 1.0% 및 3.0% 첨가구의 57.3g/d/bird 및 51.4g/d/bird 에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).

Middendorf 등(1959)은 산란계 사료에 1%의 dried kelp meal을 첨가하였을 때, 난중에는 뚜렷한 영향을 미치지 않는다고 보고하였고, 김형균(1974)은 감태가 20% 함유된 해조분말을 5% 및 10%를 추가하여 초생추의 성장 및 사료섭취량을 비교한 결과 3주령까지는 처리구간에 차이가 없었으나 3주 이후에는 증체량과 사료효율이 감소하는 것으로 보고하였다.

본 실험에서 3.0% 처리군에서는 사료섭취량은 감소하지 않았으나 1.0% 및 3.0% 첨가구에서 일산란량이 낮아지는 것은 제 1세부과제의 결과에서 진정 대사에너지값 및 아미노산 이용율이 낮은 것에 기인하는 것으로 판단된다. 감태부산물의 KOH 용해도가 유의하게 낮아짐으로서 영양소로서의 이용성 보다는 식이섬유로서의 효과가 크며, 이때 이용 가능한 지질 성분이나 비타민 및 무기물의 흡수 이용성이 저하하였고 기능성도 발현되지 못해 일산란량의 저하를 가져 왔다고 사료된다.

본 연구에서는 장의 용적 및 길이를 측정하지 않았으나 감태부산물의 장 기능 개선 효과 및 장내 유해 박테리아의 증식 억제 기능 등에 대하여는 더욱 연구가 필요한 흥미로운 분야로 판단되었다. 본 연구 결과 이용목적에 따라 사

용량을 조절할 필요가 있으며 적어도 산란계의 생산성을 위한 감태부산물의 첨가 수준은 1% 미만일 것으로 사료된다.

Table 33. Effects of dietary *Ecklonia* residue on feed intake, egg production, egg weight and egg mass in laying hens

Items	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1.0%	3.0%
Feed intake, g/d/bird	122.7 ±0.6	123.6 ±0.2	123.5 ±0.3	123.7 ±0.2
Egg production rate, %	92.0 ±0.4 <sup>a</sup>	91.5 ±0.2 <sup>a</sup>	91.3 ±0.4 <sup>a</sup>	81.0 ±0.3 <sup>b</sup>
Egg weight, g/d/bird	64.5 ±0.7 <sup>ab</sup>	66.0 ±0.7 <sup>a</sup>	63.0 ±0.7 <sup>b</sup>	63.2 ±0.6 <sup>b</sup>
Egg mass, g/d/bird	61.9 ±0.3 <sup>a</sup>	60.3 ±1.0 <sup>a</sup>	57.3 ±0.6 <sup>b</sup>	51.4 ±0.7 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Means ± SE within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

#### 나. 계란의 품질 변화

산란계 사료내 감태부산물을 각각 0%, 0.1%, 1%, 3%를 첨가하여 4주간 급여하였을 때 난각두께, 난각강도, 난황색, Haugh Unit 측정 결과를 Table 34에 나타내었다.

난각의 질을 나타내는 지표인 난각강도와 난각두께는 모든 처리간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또 난황색과 계란의 신선도의 척도가 되는

Haugh unit에서도 감태부산물 첨가 급여에 대한 뚜렷한 효과는 관찰되지 않았다.

Jensen(1963)은 산란계에 carotenoid가 결핍된 사료에 10%~15%의 kelp meal을 첨가한 바 난황의 색이 7.5~10배까지 현저하게 개선되었다고 보고하였고, Middendorf 등(1959)은 산란계 사료에 1%의 dried kelp meal를 첨가했을 때 난중과 난각의 두께에는 영향이 없다고 하였다.

본 실험에서는 감태부산물의 첨가 수준이 3% 이하이고 급여 기간도 비교적 짧아 난황색에서는 유의적인 차이를 볼 수 없었던 것으로 사료된다. 한편, 난각두께와 난각강도에서 뚜렷한 차이가 없었던 것으로 보아 장내 미생물의 대사산물 및 발효에 의한 Ca의 흡수 이용율에도 뚜렷한 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다.

Table 34. Effects of dietary *Ecklonia* residue on eggshell strength, eggshell thickness, yolk color and Haugh Unit in laying hens<sup>1</sup>

Items	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1.0%	3.0%
Egg shell strength, kg/cm <sup>2</sup>	4.0	4.0	3.8	3.8
Egg shell thickness, mm/100	35.3 ±0.1	35.5 ±0.1	34.3 ±0.0	34.9 ±0.2
Yolk color R.C.F <sup>2</sup>	7.0	7.2	7.1	7.3
Haugh Unit	86.3 ±0.2	82.4 ±0.2	82.2 ±0.1	82.8 ±0.8

<sup>1</sup> Values are means ± SE

<sup>2</sup> Roche color fan

다. 계란 난황 내 지질 함량 및 지방산 조성

산란계 사료 내 감태부산물을 각각 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0%를 첨가 급여하여 난황 내 지질 함량 및 지방산 조성을 조사하였다(Table 35, 36).

계란 난황 내 총지질 함량은 25.15%~26.75%로 처리간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 일반적으로 신선 난황 내 지방함량은 30.6%이고 냉동을 했을 경우 이 보다 작은 26.9%로 알려져 있다(한석현, 1996). 본 시험에서 계란을 수거하여 난황을 분리한 후 냉동 후 분석하였기 때문에 난황 내 지방 함량 수치가 신선 난황보다 낮게 나타난 것으로 사료된다.

계란 난황 내 지방산 조성을 살펴본 결과 대조구를 포함한 감태부산물 첨가구 모두 C18:1(42.35%~46.86%), C16:0(25.03%~26.04%), C18:2(8.71%~11.64%), C18:0(7.76%~8.12%), C16:1(2.87%~3.42%) 순으로 높았으며, C20:4인 arachidonic acid 함량도 1.81%~1.94%로 나타났다. 지방산 조성은 감태부산물 최대 첨가구인 3.0% 처리구에서도 실질적으로 첨가된 지방의 함량은 전체 지방 함량과 비교시 상대적으로 낮기 때문에 실험사료 내 옥수수 및 동물성 지방의 지방산 조성이 난황의 지방산 조성에 주로 반영된 결과로 판단되었다. 즉, 감태부산물에 다량 함유되어 있었던 arachidonic acid의 함량이나 DHA 함량에도 차이가 없었고, SFA/PUFA의 비율에도 차이가 없는 것으로 미루어 흡수된 지방이 계란에 축적되기 보다는 간장 내에서 새로이 합성된 지방산이 난황의 지방산 조성에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

Table 35. Influence of *Ecklonia* residue on the total lipid of egg yolk<sup>1</sup>

	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1.0%	3.0%
Total lipid	25.7 ±5.4	26.4 ±7.0	25.2 ±7.3	26.8 ±6.8

<sup>1</sup> Values are means ± SE

Table 36. Influence of dietary *Ecklonia* residue on the fatty acid composition of egg yolk lipid

Fatty acids	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1.0%	3.0%
		----- % of total fatty acid -----		
14:0	0.32	0.36	0.36	0.39
14:1	0.06	0.08	0.07	0.09
16:0	25.03	26.04	25.07	25.40
16:1n7	2.87	3.42	3.08	3.40
18:0	7.83	7.76	8.12	7.80
18:1n9	44.83	42.35	46.86	43.71
18:2n6	11.09	11.64	8.71	10.95
18:3n6	0.06	0.06	0.00	0.07
18:3n3	0.19	0.23	0.06	0.24
20:1n9	0.39	0.37	0.38	0.37
20:4n6	1.86	1.94	1.81	1.81
20:5n3	0.38	0.29	0.34	0.32
22:6n3	0.49	0.45	0.23	0.67
Others	4.60	5.01	4.92	4.78
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
SFA	33.18	34.16	33.55	33.59
MUFA	48.15	46.22	50.39	47.57
PUFA	14.07	14.61	11.14	14.06
n3	1.05	0.97	0.62	1.23
n6	13.01	13.64	10.52	12.83
n6/n3	12.35	14.13	17.00	10.45

SFA : saturated fatty acid

MUFA : monounsaturated fatty acid

PUFA : polyunsaturated fatty acid



라. 혈액분석

사료 내 감태부산물을 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0% 수준으로 첨가 급여한 산란계의 혈액분석 결과를 Table 37에 나타내었다.

감태부산물을 첨가하였을 때, 혈액내 총 지질 함량은 3% 첨가구에서 가장 낮은 1887.0 mg/dl로 나타났으나 처리간 유의차는 없었으며, 총 콜레스테롤 함량도 3% 첨가구에서 148.0 mg/dl로 가장 낮았으나 처리간 차이는 없었다. 또한, 간의 대사 이상을 측정하는 지표로 이용되는 혈청 내 GOT(glutamate-oxaloacetate transaminase)와 GPT(gamma-pyruvate transpeptidase)의 수준을 분석해 본 결과 모든 처리구간에서 차이가 나타나지 않았다.

본 연구는 당초 계란내 콜레스테롤 함량을 측정하고자 하였으나 혈액 내 콜레스테롤 함량 측정으로 대신하였다. 이는 혈액 내 콜레스테롤 함량 변화가 없으면 난황내로 콜레스테롤 변화를 기대하기 어렵기 때문이다. 총지질 및 총콜레스테롤 함량에 있어서 유의한 차이는 없었지만 3.0% 첨가구에서는 감소하는 경향이 나타난 것은 산란계의 생체 내 생합성 관련 효소활성을 측정하지 않아 정확한 원인은 알 수 없지만 장내에서 지질 및 콜레스테롤의 흡수 또는 재흡수를 감소시킨 것에 기인한 가능성도 배제할 수 없다고 사료된다.

Table 37. Effects of dietary *Ecklonia* residue on plasma GOT, GPT, total lipid and total cholesterol in laying hens<sup>1</sup>

	Control	<i>Ecklonia</i> residue		
		0.1%	1%	3%
GOT, IU/l	140.0± 7.6	147.5 ±9.3	168.3 ±26.9	147.±8 8.0
GPT, IU/l	1.3± 0.3	1.5 ±0.3	2.3 ±0.6	2.0± 0.0
Total lipid, mg/dl	2565.5± 633.7	2721.7 ±338.7	2826.0 ±512.4	1887.0± 181.3
Total cholesterol, mg/dl	163.5± 38.3	174.4 ±18.4	173.8 ±30.1	148.0± 12.7

<sup>1</sup> Values are means ± SE

마. 감태부산물 첨가시 *Salmonella* 경구 투여에 대한 산란계의 내병성에 미치는 영향

산란계 사료 내 감태부산물을 각각 0%, 0.1%, 1.0%, 3.0% 첨가 급여 시 *Salmonella* 경구 투여에 대한 산란계의 내병성 결과를 Table 38와 Figure 26에 나타내었다.

산란계 생산성 실험 종료 후 연속하여 내병성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기존의 실험사료와 동일한 첨가 수준의 사료를 제조하여 실험사료를 급여하고, 실험 특성상 *salmonella*에 감염되어 있지 않는 negative control구가 필요함으로 별도의 사육실에서 *salmonella*에 감염되지 않은 처리구를 두어 내병성 실험을 수행하였다. 생산성 실험 종료 후 1일이 경과한 후 배양된 *Salmonella gallinarum*( $8.6 \times 10^8$  CFU)균을 각 개체에다 1ml씩 경구투여 하여 감염시켰다. *Salmonella gallinarum*을 경구투여 한 후 5일이 지난 후 오전에 처리구별로 폐사가 급격히 일어나기 시작하면서 폐사율이 50%가 되는 시점에서 실험을 종료하고 살아 남은 개체를 도살하여 육안으로 장내 병변 검사 및 간과 비장의 병변 및 무게를 조사하였다.

*Salmonella gallinarum*에 감염된 대부분의 닭은 산란율이 현저히 떨어졌으며, 설사로 인해 항문 주위가 지저분하였고, 계분의 상태는 대부분 녹색 및 암녹색 설사가 관찰되었다. 폐사율은 살모넬라를 경구투여 하지 않은 처리구는 0%였고, 3.0% 첨가구는 12.5%로 대조구 58.3%에 비해 현저하게 떨어졌으며, 첨가 수준이 증가함에 따라 폐사율이 감소하는 경향이 관찰되었다.

병리 해부학적인 관찰로써, 전체적으로 간장은 살모넬라에 감염되지 않은 개체에 비해 대략 1.5배 종대 되어 있었고 구리색으로 변색이 되어 있었으며, 심한 것은 충혈과 괴사반점이 관찰되었다. 또한 비장도 정상적인 것에 비해 2배 이상 종대 되어 있었으며, 출혈반과 괴사반점을 보였다. 소장 내부를 살펴본 결과 감태부산물을 첨가한 처리구가 살모넬라에 감염된 대조구보다 출혈의 흔적들이 적게 관찰되었으며, 살모넬라에 감염된 닭들의 대부분은 복강 내 난포들의 활력이 없었으며, 암적색으로 변색된 것을 관찰할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 항종양면역에 있어서 중요한 역할을 하여 붙여진 것으로 Carswell 등(1975)에 의해 처음으로 설명되어진 macrophage 활성화의 주요한 지

표이다. TNF- $\alpha$ 는 보통 IL-1과 함께 감염과 암에 대한 면역반응의 cascade inflammatory cytokine으로서 작용하며, pathogenic bacteria, fungi, protozoa에 의한 감염이나 전이성 질병을 방어할 수 있다(Goeddel 등, 1986; Duncombe 등, 1990).

혈액내 TNF- $\alpha$  농도를 측정한 결과, 면역체계 자극을 유도하지 않은 닭에서는 22.5 pg/ml 이었는데, *Salmonella galinarium* 으로 감염을 유도한 결과 혈중 TNF- $\alpha$  농도가 72.8pg/ml 로 증가하였으며 감염을 유발시키고 감태부산물을 0.1% 급여한 닭에서는 134.7 pg/ml로 거의 2배 정도 증가한 것으로 나타났다. 그리고 감태부산물 1% 첨가 급여구에서는 211.4pg/ml, 3% 첨가급여구에서는 306.6pg/ml로서 감태첨가수준에 따라 농도의존적 증가 현상이 관찰되었다. 이 결과와 폐사율과의 상관관계를 보면, 매우 높은 역상관 관계가 있는 것으로 판단된다. 즉, 혈중 TNF- $\alpha$  농도가 높을수록 폐사율이 낮아져 감태부산물 첨가급여에 의한 면역체계활성화로 인해 산란계의 항병력이 증진되었을 가능성이 뚜렷하게 제시되었다.

최근, 해조류추출물 급여가 항종양효과 및 면역기능 강화효과가 있다는 것이 보고됨에 따라 더욱 관심이 높아지고 있다. Okai 등(1993, 1994)에 의하면, 해조류의 열수 추출 분획에서 분리한 다당류 또는 비다당류를 급여한 결과 모두 마우스의 비장세포가 활성화시켰으며, Yoshizawa 등(1993, 1995)도 해조류추출 다당류가 마우스의 macrophage 활성을 자극시킨다고 보고하였다. 또한, Liu 등(1997)은 해조류추출물을 마우스 임파세포에 처리한 결과, B세포에 의한 면역글로블린 G의 생산이 증가하였으며, macrophage의 TNF- $\alpha$  분비가 증가하였다고 보고하였다. 한편, 사람의 임파세포에 해조류추출물을 처리하여 receptor-ligand 결합반응 조사결과 T세포가 특이적인 반응을 나타내었으며, B세포나 natural killer 세포에서는 반응을 나타내지 않았다. 또한, 세포독성T세포활성(CTL)도 함께 유도되는 것으로 나타났으며, B세포에 의한 면역글로블린 생산 및 단핵구에 의한 TNF- $\alpha$  분비도 증가하였다(Shan 등, 1999).

본 실험에서 산란계의 각 면역세포에서의 면역기능을 조사하지는 않았지만, 감태부산물 첨가수준이 증가할수록 혈중 TNF- $\alpha$  농도가 증가한 결과는 선행 연구에서 보고된 마우스나 사람의 임파세포를 이용한 실험 결과와 비슷하였다. 한편, 감태부산물 첨가에 의해 폐사율이 유의하게 감소한 임상 실험

결과는 산란계의 항병력을 증진시키는 감태부산물의 중요한 임상면역 효과의 기초자료로 활용될 수 있다고 사료된다. 이로 미루어 감태부산물은 면역증강제로서 3% 까지 사용이 가능하며 질병에 대한 치료적인 개념이 아닌 생리활성을 촉진시키고 질병을 예방할 수 있는 유효한 사료자원이라고 판단된다.

Table 38. Effects of dietary *Ecklonia* residue on relative liver and spleen weights, TNF- $\alpha$  and mortality after 7 days of *Salmonella* challenge in laying hens<sup>1</sup>

Variables	Control	<i>Ecklonia</i> residue			
	(non challenged)	0%	0.1%	1.0%	3.0%
		-----g/100g body weight-----			
Liver	1.94 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	4.38 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	3.55 $\pm$ 0.13 <sup>bc</sup>	3.77 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	3.08 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
Spleen	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
T N F - $\alpha$ , pg/ml <sup>2</sup>	22.5 $\pm$ 2.8 <sup>d</sup>	72.8 $\pm$ 6.2 <sup>cd</sup>	134.7 $\pm$ 46.4 <sup>bc</sup>	211.4 $\pm$ 15.2 <sup>ab</sup>	306.6 $\pm$ 41.3 <sup>a</sup>
Mortality(%)	-	58.3 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	50.0 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	43.8 $\pm$ 12.0 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  S.E.

<sup>2</sup> TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$

<sup>a-d</sup> Means  $\pm$  SE within the same row with no common superscripts differ significantly(P<0.05).

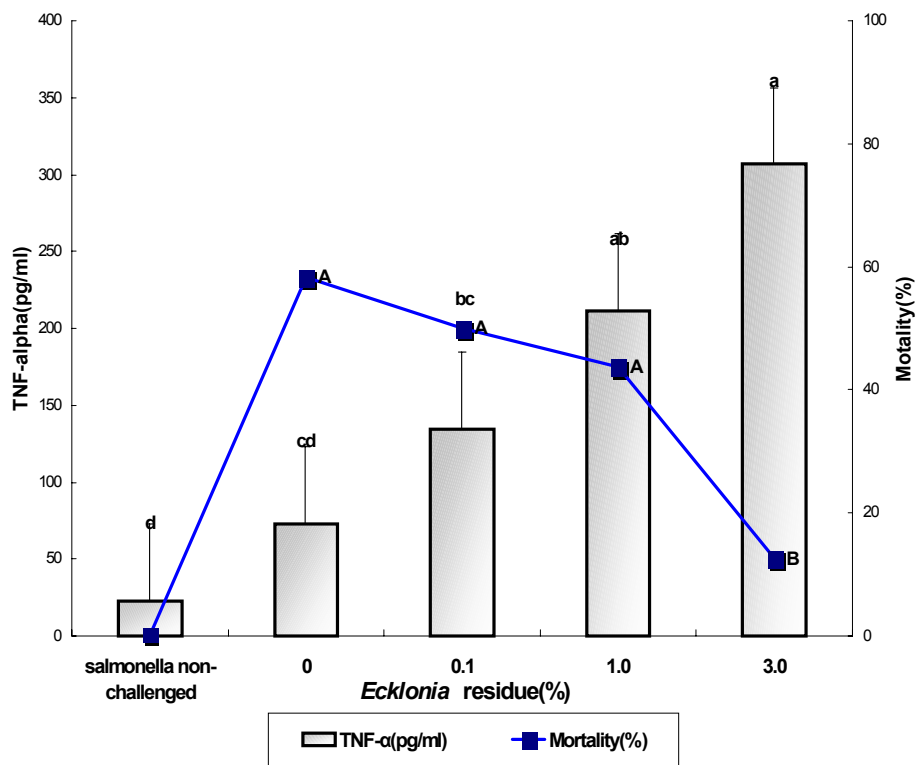


Figure 26. Effects of dietary *Ecklonia* residue on TNF- $\alpha$  and mortality after 7 days of *Salmonella* challenge in laying hens

<sup>a-d</sup> Mean values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 적요

감태에서 수용성 물질을 추출하고 남은 감태부산물의 사료 자원으로서의 유용성과 활용 가능성을 조사하기 위하여 제 2세부과제에서의 감태부산물의 화학적 및 영양적 가치 평가를 토대로 감태부산물을 수준별로 사료에 첨가하여 산란의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

37주령 Hy-line 갈색 산란계 총 64수를 감태부산물의 첨가 수준별로 각각 0, 0.1, 1 및 3%로 4처리 4반복으로 임의배치 하여 4주간 실시하였다. 생산성 시험 평가후 시험 29일째 살모넬라를 경구 투여하여 내병성을 평가하였다. 생산성 시험결과 산란율은 대조구에 비하여 감태부산물 0.1%, 1% 첨가구는 차이가 없었으나 3% 첨가구는 유의하게 감소하였고( $P<0.05$ ), 감태부산물 1.0, 3.0% 첨가 시 평균 난중은 대조구에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의차는 없었다. 그러나 감태부산물 1.0, 3.0% 첨가 시 일산란량은 대조구에 비해 유의하게 감소하였다( $P<0.05$ ). 난각 품질(강도, 두께)과 Haugh Unit는 처리간에 차이가 없었다. 또한 계란 난황 내 지질 함량 및 지방산 조성에서도 일반계란의 지질 함량과 지방산 조성과 유사하였다.

살모넬라를 경구 투여한 결과, 폐사율 및 간장과 비장의 무게가 감태부산물 3% 첨가구에서 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ). 또한 혈청 중 TNF- $\alpha$ 의 농도는 살모넬라 경구투여 후 급격한 증가를 나타냈으며 감태부산물 첨가수준에 따라서 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ). 또한, 폐사율에 있어서는 감태부산물 3.0% 첨가시 나머지 처리구에 비해 유의하게 감소하였다( $P<0.05$ ).

## 5. 참고문헌

- Carswell E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:3666.
- Debets, J.M.H., C.J. Van der Linden, I.E.M. Spronken, W.A. Buurman, 1988. T cell mediated production of tumour necrosis factor- $\alpha$  by monocytes. *Scand J. Immunol.* 27:601.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric.* 11:1-4.
- Duncombe A.S., A. Meager, H.G. Prentice, J.E. Grundy, H.E. Heslop, A.V. Hoffbrand, M.K. Brenner, 1990.  $\gamma$ -Interferon and tumor necrosis factor production after bone marrow transplantation is augmented by exposure to marrow fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Blood.* 76:1046-1053.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Fomsgaard, A., H. Wirsaee, and K. Bendten, 1988. Detection of tumor necrosis from lipopolysaccharide-stimulated human mononuclear cells by enzyme-linked immunosorbent assay and cytotoxicity bioassay. *Scand. J. Immunol.* 27:143-147.
- Goeddel D.V., B.B. Aggarwal, P.W. Gray, D.W. Leung, G.E. Nedwin, M.A. Palladino, J.S. Patton, D. Pennica, H.M. Shepard, B.J. Sugarman, 1986. Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 Pt. 1:597-609.
- Goldberg, I., 1994. Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Chapman & New York.
- Jensen, A., 1963. The effect of seaweed carotenoids on egg yolk coloration. *Poultry Sci.* 38:1229.
- Liu, J. N., Y. Yoshida, M. Q. Wang, Y. Okai, and U. Yamashita, 1997. B

- cell stimulating activity of seaweed extracts. *Int. J. Immunopharmac.* 19:135-142.
- Matsubara, S., W.C. Boyd, 1966. Alteration of the specificity of lectin by chemical modification. *J. Immunol.* 96:25-28.
- Middendorf, D.F., N.V. Helbacka, and G.F. Combs, 1959. Effect of protein levels and kelp ash on performance of laying hens. *Poultry Sci.* 38:1229.
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press. Washington D.C.
- Okai, Y., K. Higashi-Okai, and S. Nakamura, 1993. Identification of heterogeneous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweed, *Laminaria japonica*(Makonbu) and *Undaria pinnatifida*(Wakme) by umu gene expression system in *Salmonella typhimurium*(TA 1535/pSK 1002). *Mutation Res.* 302:63-70
- Okai, Y., and K. Higashi-Okai, 1994. Identification of antimutagenic activities in the extract of edible brown alga, *Hizikia fusiformis*(Hiziki) by umu gene expression system in *Salmonella typhimurium*(TA 1535/pSK 1002). *J. Food Agricul. Sci.* 66:103-110.
- SAS, 1996. SAS User's guide. Statistical Analysis System institute. Inc. Cary NC.
- Shan, B. E., Y. Yoshida, E. Kuroda, and U. Yamashita, 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes *in vitro*. *Int. J. Immunopharmac.* 21:59-70.
- Sharon, N., and H. Lis, 1989. Lectins. London, Champ and Hall.
- Sukhija, P.S., and D.L. Palmquist, 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Yoshizawa, Y., A. Enomoto, H. Todho, A. Ametani, and S. Kaminogawa. 1993. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine alga(*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotech. Biochem.*



57:1862-1866.

Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Ito, F. Fukui, and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of polysaccharide fraction from a marine alga(*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1933-1937.

김형균, 1974. 초생추에 있어서 해조분말의 사료가치시험. *한국축산학회지*, 16:330-335.

이성태, 2001. 한국산 해조류로부터 분리된 렉틴의 이화학적 특성과 면역생물학적 활성기전에 관한 연구. 강원대학교 대학원 박사학위논문.

한석현, 1996. 계란의 이용과 과학. 선진문화사. 서울.

### 제 3 절 면역기능성 추출물질의 사료 내 첨가가 돼 지의 생산성 및 내병성에 미치는 영향

#### 1. 서 론

가축의 질병을 통제하고 방제하기 위해 지금까지 무분별한 항생제를 남용하게 되어 가축이 특정 항생제에 대한 내성을 가지게 되어, 항생제의 효과가 감소되어 질병에 대한 내병성이 크게 떨어지고 있으며, 항생제의 남용으로 인한 축산물의 항생제 잔류로 인한 국민 건강을 위협하고 있다. 또한 소득 수준의 향상으로 인한 국민 식생활 패턴이 채소류에서 육류로 급격히 증가하고 있는 실정이다. 현재 유럽을 비롯한 축산 선진국들은 항생제의 사용을 전면 금지 또는 엄격히 규제하고 있으며, 이러한 문제는 국제 사회에 살고 있는 우리 나라에도 곧 적용이 될 것으로 생각된다. 따라서 항생제를 쓰지 않고 가축의 생산성을 증진시키고 면역능력을 향상시키면서 체내 대사를 활발히 촉진시켜 가축의 내병성을 증진시킬 수 있는 기능성 물질의 개발이 시급한 문제로 대두되고 있다.

현존하는 많은 기능성 물질 중 해양식물로부터 추출한 면역 증강 물질 중 식물성 렉틴(lectin)을 들 수 있다. 해양식물이라 함은 대부분이 해조류이고, 식물성 렉틴에 대한 연구는 그 동안 활발하게 연구되어 왔으나 해조류 렉틴에 대한 연구는 그다지 많지 않으며, 해조류로부터 분리한 추출물이 항암효과(Perry 등, 1992; Inagawa 등, 1992), 혈전용해효과(Nishino와 Nagumo, 1991) 및 국산 갈조류 중 갑태의 렉틴 추출 물질이 안전한 세포성 및 체액성 면역 증강제라고 보고되었다(이성태, 2001). 이와 같이 해조류에는 다량의 lectin과 polysaccharide가 존재하고, soy bean lectin 처럼 해조류 lectin과 polysaccharide에는 면역활성이 발견되었다(Her 등, 1999). 그러나 해조 추출물 및 해조 lectin에 관한 면역기능 강화 효과 등은 역학조사 및 실험동물만을 대상으로 수행한 연구에 국한되어 있으므로 해조 추출물이나 해조 lectin을 가축에 이용한 실제적 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 해조류로부터 추출한 면역 증강 물질인 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)의 사료내 첨가가 이유 자돈의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)

해조 lectin 분획 추출은 4℃에 보관 중인 자연 건조된 해조류 100g을 수돗물에 넣고 24시간 cold room에서 배양하여 증류수로 세척 후 해조류 잠길 정도로 증류수를 첨가하여 100℃에서 1 시간 동안 열탕하며 가정용 mixer에 넣고 2.5 분씩 2회 잘게 분쇄하여 4 시간 동안 homogenizing하였다. 이 후 약 12 시간 동안 cold room에서 침전 후 녹갈색의 맑은 상층용액을 high speed centrifuge를 이용해 12,500 rpm, 30 min., 4℃에서 원심분리하고 원심분리해서 얻은 상층액을 수집하여 Whatman NO. 2로 여과한 후 다시 Whatman NO.5로 여과하여 deep freezer에서 동결건조하여 갈색분말을 취한다.

해조에서 추출한 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)은 인간이 식품으로 사용하지 않은 갈조류(brown algae)중에 주로 감태(*Ecklonia cava*)와 약간의 툃(*Hizikia fusiforme*)으로부터 추출한 crude lectin으로 lectin 함량이 대략 25g/kg 함유하고 있고 약간의 polysaccharide을 포함하고 있으며, 수용성 물질인 해조 lectin을 추출하고 난 후의 잔사물을 부형제로 혼합하여 가축 사양 실험에 사용하였다.

### 나. 시험설계

개시시 체중이 12.25kg의 삼원교잡종 자돈(Yorkshire ×Large white×Duroc) 180두(male 90, female 90)를 공시하여 3처리 3반복, 반복당 20두를 총 30일간 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 옥수수과 대두박을 기초로 하여 면역기능성 추출물질을 0, 0.1, 0.3%씩 첨가하여 총 30일간 급여하였다. 시험사료의 에너지 및 영양소의 수준은 NRC(1998) 요구량을 기초로 하였으며 시험사료의 배합비 및 영양소함량은 Table 39에 나타내었다.

### 다. 사양관리

시험사료는 가루 형태로 자유채식 시켰으며, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 먹을 수 있도록 하였다. 이 때 급이기의 규격은 가로×세로×높이가 각각 22.5×20×15cm 였으며, 부분슬랏방식의 돈방 구조로 시험사료는 매일 오전 9시에 급여하였다.

#### 라. 조사항목

##### 1) 사료섭취량, 일당증체량, 사료요구율

사료섭취량과 증체량은 사양시험 개시 후 15일과 시험종료시에 측정하여 계산하였고 사료섭취량과 실험 종료시의 증체량을 근거로 사료요구율을 산출하였다.

##### 2) 혈액분석

혈액 sample은 생산성 실험 종료시 각 반복구에서 5수씩 선발하여 경정맥에서 1회용 주사기를 이용하여 5ml를 채취하였다. 채취한 혈액 sample은 혈액 응고를 방지하기 위해 heparin으로 처리된 tube를 사용하였으며 채취후 원심 분리(1500rpm×15min.)하여 plasma를 얻었다. 혈장 내 GPT(gamma-pyruvate transpeptidase), GOT(glutamate-oxaloacetate transaminase), total lipid, total cholesterol 함량을 자동 혈액 분석기(Hitachi 7600-110, 7170)를 이용 측정하였다.

##### 3) 혈청 내 돼지의 생식기와 호흡기 증후군, 위축성 비염, 흉막폐렴 백신 항체역가 조사

돼지 백신의 항체역가를 조사하기 위해 시험 개시시 반복당 5수씩 자돈의 오른쪽 귀를 이표기로 뚫어 이표를 설치하고 1~5번까지 번호를 표시하였다. 백신의 접종은 실험 농장의 백신 프로그램에 준하여 실시하였으며, 실험 농장의 백신 프로그램은 다음과 같다.

##### 가) 1 일령

- Bordetella Bronchiseptica-Pasteurella Multocida Bacterin-Toxoid

(독소형 보데텔라 브론키넙티카와 독소형 파스튜렐라 멀토시다 D형 과 A형에 의해 유발되는 위축성비염) : Ingelvac<sup>®</sup> AR4(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA)을 두당 1ml씩 근육주사

나) 3 주령

- Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine(PRRS, 돼지 생식기와 호흡기 증후군) : Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA)을 두당 2ml씩 근육주사
- *Mycoplasma Hyopneumoniae* Bacterin(M. hyo, 마이코플라즈마 하이 오뉴모니아 감염에 의한 폐렴) : Ingelvac<sup>®</sup> M. hyo(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA)을 두당 2ml씩 근육주사

다) 5 주령

- *Actinobacillus pleuropneumoniae*(APP, 흉막폐렴) : Ingelvac<sup>®</sup> H(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA)을 두당 2ml씩 근육 접종(1차)

라) 6 주령

- 돈단독 백신 : SE-VAC((주) 한국미생물연구소)을 1ml를 반드시 이근 부(二根部) 피하에 주사(1차)

마) 7 주령

- *Actinobacillus pleuropneumoniae*(APP, 흉막폐렴) : Ingelvac<sup>®</sup> H(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. USA)을 두당 2ml씩 근육 접종(2차)

바) 9 주령

- 돈단독 백신 : SE-VAC((주) 한국미생물연구소)을 1ml를 반드시 이근 부(二根部) 피하에 주사(2차)

시험 개시시, 15일 및 실험종료시에 각 반복당 5수씩 선발된 자돈의 경정 맥에서 1회용 주사기를 이용하여 2ml의 혈액을 채취하고 채취한 혈액은 serum separating tube에 넣고 2500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액인 혈청을 분리하고 위축성 비염(AR4), 흉막폐렴(APP), 돼지의 생식기와 호흡기 증후군(PRRS)백신에 대해서 혈청검사법에 의해 분석을 실시하였으며, PRRS

경우에는 양성 및 음성으로 표시만 하였다. 혈청검사방법은 각 진단 키트 제조 회사[AR4, APP(Cheilbio, Korea), PRRS(IDEXX, USA)]에서 제공한 표준 시험법에 의해 진행되었으며 실험방법은 다음과 같다.

혈청을 56℃로 가온한 수조에서 30분간 반응시켜 보체를 불활화시킨 다음 희석용 완충액 (145mM NaCl, 2.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.7mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% BSA(Bovine Serum albumin))에 100배로 희석하였다. 희석된 혈청과 함께 양성 및 음성 혈청을 상온에서 각각 30분씩 반응시킨 후 세척용 완충액 (145mM NaCl, 2.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.7mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% Tween 20, pH 7.4)으로 12 channel 세척기를 이용해 3회 세척하고 anti-chicken IgG peroxidase conjugate (Sigma)를 100  $\mu$ l씩 첨가하여 30분간 반응시킨 후 ABTS 용액 (3.5mM citric acid, 293mM glycine, 0.5mM 2,2-azino diethyl benzthiazolin sulfonate (ABTS), 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4.2)을 첨가하여 15분간 동안 반응시켜 발색시켰다. 15분간 발색 후 stop solution (0.05% sodium dodecyl sulfate)으로 반응을 중지시키고 ELISA reader (Bio-Tek, USA) 상에서 410nm로 흡광도를 측정하였다.

#### 4) Sandwich ELISA법을 이용한 TNF- $\alpha$ assay

TNF- $\alpha$  assay는 Quantikine<sup>®</sup> Porcine TNF- $\alpha$  kit(R&D Systems, USA)의 방법을 기초로 하여 실시하였으며 그 방법은 다음과 같다.

실험 개시 전에 모든 시약과 plasma들은 실온에 방치시켰다. Porcine TNF- $\alpha$  Control을 1.0ml의 증류수로 녹인 다음, Porcine TNF- $\alpha$  Conjugate 0.5ml을 11ml의 Conjugate diluent에 녹이고, wash buffer(25ml wash buffer + 600ml DW)를 준비한다.

Porcine TNF- $\alpha$  standard를 2ml의 calibrator diluent RD6-33(buffered protein solution)에 녹인 후 각 standard를 polypropylene tube에 #1 $\Rightarrow$  750 pg/ml, #2 $\Rightarrow$  375 pg/ml, #3 $\Rightarrow$  187.5 pg/ml, #4 $\Rightarrow$  93.8 pg/ml, #5 $\Rightarrow$  46.9 pg/ml, #6 $\Rightarrow$  23.4 pg/ml #7  $\Rightarrow$  0 pg/ml이 되도록 준비하였다. Porcine TNF- $\alpha$  standard을 96 well(precoated with monoclonal antibody specific for porcine TNF- $\alpha$ )에 assay diluent RD1-63(buffered protein solution)을 50  $\mu$ l씩 모두 넣고, Porcine TNF- $\alpha$  control를 포함하여 준비된 7개의 Porcine TNF- $\alpha$  standard

및 plasma를 각 well에 50  $\mu$ l를 넣고 1분 동안 순환 진탕기에서 가하였다. Plate cover를 덮고 2시간 동안 실온에서 배양한 후, wash buffer(400  $\mu$ l/well)로 5번 씻어내었다. 다음으로 porcine TNF- $\alpha$  conjugate(monoclonal antibody against porcine TNF- $\alpha$  conjugated to horseradish peroxidase)을 100  $\mu$ l을 각 well에 넣어 주고 새로운 plate cover를 덮고 다시 2시간 동안 실온에서 배양한 후, wash buffer(400  $\mu$ l/well)로 5번 씻어내었다. 여기에 substrate solution[color reagent A(hydrogen peroxide) + color reagent B(tetramethylbenzidine)]를 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 30분간 실온의 암실에서 배양한다. 이때 각 well 별로 차별성 있는 푸른색이 나타나고 여기에 stop solution(hydrochloric acid)을 well 당 100  $\mu$ l씩 넣으면 노란색으로 바뀌면서 반응이 고정되며, 이 때 450nm에서 ELISA reader로 측정하여 TNF- $\alpha$ 의 양을 분석하였다.

#### 5) Sandwich ELISA법을 이용한 IL-1 $\beta$ assay

IL-1 $\beta$  assay는 Quantikine<sup>®</sup> Porcine IL-1 $\beta$  kit(R&D Systems, USA)의 방법을 기초로 하여 실시하였으며 그 방법은 다음과 같다.

실험 개시 전에 모든 시약과 plasma들은 실온에 방치시켰다. Porcine IL-1 $\beta$  Control을 1.0ml의 증류수로 녹인 다음, Porcine IL-1 $\beta$  Conjugate 1ml을 22ml의 Conjugate diluent에 녹이고, wash buffer(25ml wash buffer + 600ml DW)를 준비한다.

Porcine IL-1 $\beta$  standard를 2ml의 calibrator diluent RD6-33(buffered protein solution)에 녹인 후 각 standard를 polypropylene tube에 #1 $\Rightarrow$  1,250 pg/ml, #2 $\Rightarrow$  625 pg/ml, #3 $\Rightarrow$  312 pg/ml, #4 $\Rightarrow$  156 pg/ml, #5 $\Rightarrow$  78.1 pg/ml, #6 $\Rightarrow$  39.1 pg/ml #7 $\Rightarrow$  0 pg/ml이 되도록 준비하였다. Porcine IL-1 $\beta$  standard을 96 well(precoated with monoclonal antibody specific for porcine IL-1 $\beta$ )에 assay diluent RD1-63(buffered protein solution)을 50  $\mu$ l씩 모두 넣고, Porcine IL-1 $\beta$  control를 포함하여 준비된 7개의 Porcine IL-1 $\beta$  standard 및 plasma를 각 well에 100  $\mu$ l를 넣고 1분 동안 순환 진탕기에서 가하였다. Plate cover를 덮고 2시간 동안 실온에서 배양한 후, wash buffer(400  $\mu$ l/well)로 5번 씻어내었다. 다음으로 porcine IL-1 $\beta$  conjugate(monoclonal antibody

against porcine IL-1 $\beta$  conjugated to horseradish peroxidase)을 200  $\mu$ l을 각 well에 넣어 주고 새로운 plate cover를 덮고 다시 2시간 동안 실온에서 배양한 후, wash buffer(400  $\mu$ l/well)로 5번 씻어내었다. 여기에 substrate solution[color reagent A(hydrogen peroxide) + color reagent B(tetramethylbenzidine)]를 각 well에 120  $\mu$ l씩 넣고 30분간 실온의 암실에서 배양한다. 이때 각 well 별로 차별성 있는 푸른색이 나타나고 여기에 stop solution(hydrochloric acid)을 well 당 120  $\mu$ l씩 넣으면 노란색으로 바뀌면서 반응이 고정되며, 이 때 450nm에서 ELISA reader로 측정하여 IL-1 $\beta$ 의 양을 분석하였다.

#### 마. 통계분석

실험에서 얻어진 자료들의 통계분석은 statistical analysis system(SAS, 1996)의 general linear model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 통해 유의수준  $P < 0.05$ 에서 검정하였다.



Table 39. Dietary compositions for the weaned pigs experiment

Ingredients	Control	Immunoregulator	
		0.1%	0.3%
Yellow corn	52.34	52.24	52.04
Soybean meal	37.15	37.15	37.15
Animal fat	6.00	6.00	6.00
Dicalcium phosphate	1.32	1.32	1.32
Salt	0.32	0.32	0.32
Limestone	0.97	0.97	0.97
Vitamin-mineral mix <sup>1</sup>	0.20	0.20	0.20
Biotin	0.05	0.05	0.05
Lysine-HCl	0.10	0.10	0.10
Molasses	1.50	1.50	1.50
Choline-Cl	0.05	0.05	0.05
Seaweed lectin	0.00	0.00	0.00
Total	100.00	100.00	100.00
Calculated analysis			
Crude protein(%)		20.9	
Crude fat(%)		8.16	
Crude fiber(%)		3.97	
Ash(%)		5.46	
Ca(%)		0.70	
Available P(%)		0.35	
ME(kcal/kg)		3300	

<sup>1</sup> Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: Vitamin A, 7,500IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 1,400IU; Vitamin E, 20.4mg; Vitamin K<sub>3</sub>, 24mg; Vitamin B<sub>1</sub>, 1.2mg; Vitamin B<sub>2</sub>, 3.2mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 20 $\mu$ g; Biotin, 0.1mg; Choline, 1.2g; Na, 1.53g; Cl, 0.22g; Mn, 64mg; Zn, 99mg; I, 1mg; Se, 0.25mg; Cu, 10.11mg, Fe, 0.143mg.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율

옥수수과 대두박을 기초로 한 대조구 및 면역기능성 추출물질을 각각 0.1%, 0.3%를 이유 자돈에 급여하였을 때 개시체중, 종료시 체중, 일당사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율을 Table 40에 나타내었다.

개시체중은 두당 평균 체중이 12.25kg으로 균일하게 맞추어 실험을 개시하였다. 종료시 두당 평균 체중은 면역기능성 추출물질 0.1% 첨가구가 대략 두당 1kg 무거웠지만 처리구간에 통계적 유의차는 없었다. 사료섭취량은 대조구를 포함한 모든 처리구에서 0.80~0.82 kg/d/pig로 유사하였다. 일당증체량은 면역기능성 추출물질 0.1% 첨가구가 대조구와 0.3% 첨가구에 비해 높았으나 통계적 유의차는 없었다. 사료요구율에 있어서 면역기능성 추출물질 0.1% 첨가구가 1.80으로 대조구에 1.93에 비해 우수하였으나 처리구간에 통계적인 유의차는 인정되지 않았다.

본 시험은 순수 정제한 렉틴을 가축에 급여한 것이 아니고 crude한 렉틴과 부형제로 감태부산물을 사용하여 가축의 생산성 및 면역관련 연구를 수행하였다. 해조 추출물 중 렉틴을 가지고 돼지 사양 및 면역 실험에 관련한 연구는 지금까지 국내외로 찾기가 매우 힘들었으며, 돼지 생산성과 관련하여 Bae 등(1999)은 감태분을 1~3% 수준으로 첨가하였을 때 비육돈에서 사양성적에는 차이가 없었으나, 조단백질, 조지방 및 칼슘의 소화율이 3% 첨가시 현저히 저하하고, 감태분 첨가구가 등지방 두께가 증가하는 경향을 나타내었고, 2% 첨가시 A, B 등급 출현율이 가장 높아 감태분 첨가시 상대적으로 사료비 절감 및 비육돈 두당 이윤이 높았다고 보고한 바 있다.

본 실험은 사료내 항생제를 배제한 사료로 실험을 실시하였으며, 생산성 실험 결과 면역기능성 추출물질의 사료내 첨가가 가축의 생산성에 크게 영향을 미치는 않는 것으로 사료되며, 돼지 사료내 적정 첨가수준은 0.1%가 적당할 것으로 사료된다.

본 연구는 당초 비육돈을 이용한 생산성 실험을 하고 이에 따른 도체 특성 및 육질에 미치는 영향을 조사할 계획이었으나, 면역 실험과 관련하여 실험

을 같이 병행하여야 하는 문제와 실험기간 중 여러 지역에서 돈콜레라가 발생하여 실험상의 어려움 점들이 발생하였다. 그러나 다행이 본 실험을 실시한 농장은 돈콜레라로부터 전염은 되지 않았으나 본 질병의 특성상 장기간 동안의 실험을 계속 수행하는 것은 어려운 일이었다. 따라서 이유자돈을 비육 후기까지 키우는 것이 불가능하였으며 이로 인해 돼지를 도살하여 도체 특성 및 육질 평가는 실시하지 못하여 아쉬움이 남았다.

Table 40. Effect of dietary supplementation of Immunoregulator on performance of weaned pigs<sup>1</sup>

	Control	Immunoregulator	
		0.1%	0.3%
Initial body weight, kg	12.25	12.25	12.25
Final body weight, kg	25.53 ±3.95	26.57 ±2.14	25.70 ±2.98
Feed consumption, kg/d/pig	0.80 ±0.13	0.82 ±0.06	0.81 ±0.10
Body weight gain, kg/d/pig	0.40 ±0.07	0.46 ±0.05	0.42 ±0.06
Feed conversion rate, feed/gain	1.98 ±0.03	1.80 ±0.07	1.93 ±0.08

<sup>1</sup> Values are means ± S.E.

#### 나. 혈액분석

옥수수와 대두박을 기초로 한 대조구 및 면역기능성 추출물질을 각각 0.1%, 0.3%를 이유 자돈에 급여하였을 때 돼지의 혈액분석 결과를 Table 41에 나타내었다.

면역기능성 추출물질을 첨가하였을 때 실험 종료시 혈액 내 glucose 함량은 처리구간에 통계적인 유의차가 나타나지 않았다. 간장의 대사 이상을 측정하는 지표로 이용되는 혈액 내 GOT 및 GPT의 수준을 분석해 본 결과 모든 처리구간에서 차이가 나타나지 않았다.

혈액 내 총지질(total lipid), 총콜레스테롤(total cholesterol), 및 중성지질(triglyceride) 함량에 있어서도 처리구간에 유의한 차이는 나타나지 않았고, 혈액 내 BUN(blood urea nitrogen)도 처리구간에 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 또한 혈액 내 칼슘과 인의 함량에 있어서도 유의차가 인정되지 않았다.

본 혈액 분석 결과 모든 처리구간에 GOT 및 GPT 수준의 변화가 없는 것으로 보아 면역기능성 추출물질은 간장의 대사 이상을 유발하지 않는 것으로 사료되고, 혈액 내 BUN도 처리구간에 유의차가 없는 것으로 보아 돼지에 있어 만성 및 급성 질환 및 신장 질환에 감염될 가능성이 낮다고 사료된다.

Table 41. Effects of dietary Immunoregulator on plasma Glucose, GOT, GPT, total lipid, total cholesterol, triglyceride, BUN, Ca and P in weaned pigs<sup>1</sup>

	Control	Immunoregulator	
		0.1%	0.3%
Glucose, mg/dl	101.17±3.23	101.50±4.26	101.38±3.44
GOT, IU/L	53.67±3.41	54.25±5.94	65.00±6.52
GPT, IU/L	42.33±4.75	45.13±8.38	42.00±2.18
Total lipid, mg/dl	323.83±2.73	330.60±8.78	339.50±4.79
Total Cholesterol, mg/dl	83.67±2.93	91.83±2.40	90.33±2.46
Triglyceride, mg/dl	54.83±5.00	50.43±5.05	40.75±3.82
BUN, mg/dl	16.98±1.33	15.37±1.11	15.87±1.40
Ca, mg/dl	10.87±0.29	10.98±0.22	10.68±0.20
P, mg/dl	7.75±0.32	7.51±0.31	8.16±0.30

<sup>1</sup> Values are means ± S.E.

다. 혈청 내 돼지의 흉막폐렴과 위축성 비염 항체 역가 조사

옥수수수와 대두박을 기초로 한 대조구 및 면역기능성 추출물질을 각각 0.1%, 0.3%를 이유 자돈에 급여하였을 때 돼지의 위축성 비염(Atropic rhinitis, AR)과 흉막폐렴(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 백신에 대한 기간별 항체 역가는 Table 42에 나타내었다.

모든 반복구에서 실험 개시시와 동시에 5두씩 귀에 이표를 설치하고 면역기능성 추출물질 급여전(0일째), 급여후 15일째, 30일째 되는 날에 경정맥

에서 2m씩 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 흉막폐렴, 위축성비염, 돼지의 생식기와 호흡 증후군(Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine, PRRS) 백신 역가를 측정하였다.

흉막폐렴 5형(APP5)의 경우 면역기능성 추출물질 0.1, 0.3% 첨가구에서 본 물질을 투여 전부터 백신의 역가가 대조구에 비해 유의하게 높았다. 따라서 이러한 결과는 본 농장의 돼지들은 모든 수준에서 야외감염이 있었던 것으로 사료되며 0.1%와 0.3% 첨가구에서는 모체이행 항체 수준이 상당히 높아 접종 당시 항체가 수준이 대조구와 상당히 달랐던 것으로 생각된다.

위축성 비염의 백신 역가를 측정한 결과에서 파스튜렐라 멀토시다 A형(*Pasteurella multocida* Type A, PmA)의 경우, 0일째 백신의 역가가 673.5~764.4로 처리구간에 유사하였으며, 각각 15일째와 30일째까지 전 처리구에서 백신의 역가가 전형적으로 상승하였으나 모든 처리구간에 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 파스튜렐라 멀토시다 D형(*Pasteurella multocida* Type D, PmD)의 경우, 0일째의 백신 역가가 603.2~709.1로 처리구간에 유사하였고 15일째 백신의 역가가 다소 증가하듯 보이다가 오히려 30일째의 백신 역가는 모두 감소하는 양상을 보였다. 이것은 사용한 백신 때문인 것으로 파악되는데 위축성 비염의 경우 *Pasteurella multocida*가 방출하는 상피 괴사 독소 (DNT : Dermo Necrotic Toxin)에 의해 출혈과 비갑개가 굽혀지는 일이 생기는데 이를 방지하기 위해 외산 백신들은 toxoid를 사용한다. 따라서 실험결과는 사용한 백신이 *Pasteurella multocida* whole cell bacterin 백신이 아니라 toxoid(inactivated toxin)으로 된 백신을 사용했기 때문에 본 ELISA kit의 정제 항원인 OMP(Outer membrane protein)과 cross reactivity가 없었던 것으로 사료된다. 만약 이 경우에는 사용한 백신과 같은 종류의 toxin을 정제해서 진단 키트를 만든 다음, ELISA 역가를 계산해보면 항체가 수준이 PmA 처럼 증가하는 양상을 보이게 될 것으로 사료된다.

돼지의 생식기와 호흡 증후군(PRRS)의 경우 본 실험에서 3주령에 근육주사를 하고 실험 개시전에 백신역가를 측정해 본 결과 대조구 1두, 면역기능성 추출물질 0.1, 0.3% 첨가구에서 각각 2두씩 음성으로 판정되었으나 실험 개시 15일째부터 모든 처리구에서 양성으로 판정이 되어 정확한 백신의 접종을 확인할 수 있었다.

따라서 본 백신 역가 분석 결과는 해조류로부터 면역기능성 추출물질이 체액성 면역(Plasma cell proliferation)에 영향을 주지 않았지만, 본 실험 결과만으로는 정확한 해석이 힘들었다. 왜냐하면 본 농장의 돼지들은 모든 수준에서 야외감염이 있어던 것 같으며, 모체이행 항체 수준이 상당히 높아 정확한 백신의 역가를 측정하는 것은 힘들었다. 그러나 이러한 연구는 일반적으로 돼지를 대규모로 생산하는 농가에서 매우 중요한 자료로 해석이 되며 추후, 본 연구와 유사한 실험을 할 경우 특정 병원균 부재(specific pathogen free, SPF)돈을 사용하여 환경 조절이 용이한 실험장소에서 실험을 실시하여야만 야외감염 및 모체 이행 항체에 대한 영향을 받지 않고 정확한 항체 역가를 측정할 수 있으리라 사료된다.

Table 42. Effects of dietary Immunoregulator on serum APP5, PmA and PmD in weaned pigs

		Control	Immunoregulator	
			0.1%	0.3%
APP5 <sup>1</sup>	0 d	128.1±35.8 <sup>b</sup>	797.6±171.3 <sup>a</sup>	1155.8±194.1 <sup>a</sup>
	15 d	705.7±228.0	821.0±262.2	1245.1±243.2
	30 d	875.7±267.5	921.4±198.3	1450.6±288.0
PmA <sup>2</sup>	0 d	764.4±148.0	728.8±92.0	673.5±91.0
	15 d	1043.0±173.3	1538.3±247.3	1345.5±156.8
	30 d	2155.0±430.5	1970.2±231.1	2042.0±146.2
PmD <sup>3</sup>	0 d	709.1±140.9	603.2±73.7	696.6±79.2
	15 d	904.3±128.7	628.6±73.6	820.3±137.4
	30 d	249.4±39.7	169.9±37.6	194.2±34.0

<sup>1</sup> APP : *Actinobacillus pleuropneumoniae*

<sup>2</sup> PmA : *Pasteurella multocida* Type A

<sup>3</sup> PmD : *Pasteurella multocida* Type D

#### 라. Sandwich ELISA법을 이용한 TNF- $\alpha$ 및 IL-1 $\beta$ assay

옥수수과 대두박을 기초로 한 대조구 및 면역기능성 추출물질을 각각 0.1%, 0.3%를 이유 자돈에 급여하였을 때 혈장내 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 변화를 Table 43에 나타내었다.

면역기능성 추출물질을 급여한 후, 15일 및 실험종료시에 돼지의 경정맥에서 반복구별로 5수씩 혈액을 채취하고 혈장을 분리한 후, 혈장 내 cytokine 중 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 을 R&D system의 porcine TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  kit를 이용하여 분석을 하였다.

혈장 내 TNF- $\alpha$  농도를 측정한 결과, 15일째 혈장에서 면역기능성 추출물질 0.3% 첨가구가 305.2 pg/ml, 0.1% 첨가구가 304.2 pg/ml, 대조구가 228.5 pg/ml로 대조구에 비해 면역기능성 추출물질 첨가구가 증가하는 경향은 보였으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 실험 종료시도 이와 마찬가지로 면역기능성 추출물질 0.3% 첨가구가 361.3 pg/ml, 0.1% 첨가구가 351.3 pg/ml, 대조구가 240.8 pg/ml로 나타났으며, 면역기능성 추출물질 0.1, 0.3% 첨가구는 대조구보다 대략 TNF- $\alpha$ 의 농도가 1.5배 높았으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 한편, 혈장 내 IL-1 $\beta$  농도를 측정한 결과, 15일째 혈장에서 모든 처리구간에서 통계적인 유의차가 나타나지 않았으나, 실험 종료시에는 면역기능성 추출물질 0.3% 첨가구에서 30.9 pg/ml로 대조구의 17.5 pg/ml에 비해 유의하게 높았으며( $P < 0.05$ ), 면역기능성 추출물질 첨가구 사이에서는 통계적 유의차는 나타나지 않았다.

TNF- $\alpha$ 는 항종양면역에 있어서 중요한 역할을 하여 붙여진 것으로 Carswell 등(1975)에 의해 처음으로 설명되어진 macrophage 활성화의 주요한 지표이다. TNF- $\alpha$ 는 보통 IL-1 $\beta$ 와 함께 감염과 암에 대한 면역반응의 cascade inflammatory cytokine으로 작용하며, pathogenic bacteria, fungi, protozoa에 의한 감염이나 전이성 질병을 방어할 수 있다(Goeddel 등, 1986; Duncombe 등, 1990). 본 실험 결과 TNF- $\alpha$  농도는 면역기능성 추출물질을 첨가했을 때 그 농도가 증가하는 경향이 있었으며, IL-1 $\beta$  농도도 이와 마찬가지로 면역기능성 추출물질을 첨가했을 때, 농도가 증가하는 경향 또는 유의차가 나타났다. 또한 본 연구과제 중 감태부산물의 사료내 첨가 급여가 산란계에 있어서 살모



넬라 감염시킨 후 TNF- $\alpha$ 의 농도 및 폐사율을 측정해 본 결과 첨가 수준이 증가할수록 TNF- $\alpha$  농도가 증가하고 폐사율이 감소하는 결과를 도출하였는데, 이는 사료내 면역기능성 추출물질의 첨가가 돼지의 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 증가하는 현상과 유사한 결과를 도출할 수 있었다. 이러한 현상은 가축이 특정 질병에 걸렸을 경우와 일반적인 경우에도 cytokine을 분비한다는 것을 의미하는 것이며, 이 때 면역기능성 추출물질(면역증강제)을 경구 투여하였을 때 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역 능력을 상승시킬 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 앞선 돼지의 각종 백신에 관한 실험에서 SPF돈을 이용한 보다 더 정밀한 실험을 통해 면역증강제를 백신과 함께 투여하였을 때 백신만을 투여한 경우에 비해 백신의 효과가 더 증진되는 것이 밝혀진다면 완전한 면역증강제로서의 역할을 할 수 있으리라 사료되며, 추후 무항생제 실험사료를 계속 제조하여 여러 가지 가축에 있어 내병성 실험을 통한 검증으로 가축의 항생제 내성 문제나 축산물내에 항생제 잔류 문제 등을 줄여줄 수 있을 것으로 사료된다.

Table 43. Effects of dietary Immunoregulator on plasma TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in weaned pigs<sup>1</sup>

	Control	Immunoregulator	
		0.1%	0.3%
----- pg/ml -----			
TNF- $\alpha$			
15d	228.5 $\pm$ 11.8	304.2 $\pm$ 40.7	305.2 $\pm$ 35.2
30d	240.8 $\pm$ 40.6	351.3 $\pm$ 45.3	361.3 $\pm$ 65.9
IL-1 $\beta$			
15d	14.3 $\pm$ 2.8	20.1 $\pm$ 2.1	20.5 $\pm$ 2.1
30d	17.5 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 4.6 <sup>ab</sup>	30.9 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  S.E.

<sup>a,b</sup> Means  $\pm$  SE within the same row with no common superscripts differ significantly(P<0.05).

#### 4. 적요

해조류로부터 추출한 면역 증강 물질인 면역기능성 추출물질 (Immunofence)의 사료내 첨가가 이유 자돈의 생산성 및 내병성에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

본 실험은 45일령의 삼원교잡종 이유자돈(Yorkshire×Large white×Duroc) 180두(male 90, female 90)를 공시하여 3처리 3반복, 반복당 20두를 총 30일간 생산성 실험 및 내병성 실험을 실시하였다. 시험사료는 옥수수과 대두박을 기초로 하여 면역기능성 추출물질(Immunoregulator)을 0, 0.1, 0.3%씩 첨가하여 총 30일간 급여하였다. 조사항목으로 사료섭취량, 일당증체량, 사료요구율을 2주마다 측정하였으며, 혈액분석, 실험 농장의 백신프로그램을 이용한 백신의 역가 조사 및 ELISA 법을 이용한 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 를 분석하였다.

사료섭취량, 일당증체량 및 사료요구율에 있어서 처리구간에 통계적 유의차는 나타나지 않았지만 면역기능성 추출물질 0.1% 첨가구가 나머지 처리구에 비해 우수하였다. 실험종료시에 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈액분석을 실시한 결과 혈장 내 glucose, GOT, GPT, total lipid, total cholesterol, triglyceride, BUN, Ca, 및 P 함량에 있어서 처리구간 모두 유의차가 없었다.

실험개시시, 15일째, 30일째 혈액을 채취하여 돼지의 AR, APP5 및 PRRS의 항체 역가를 분석한 결과, AR 중에 PmA는 실험 개시시보다 15일째와 30일째에 전 처리구에서 백신의 역가가 상승하였으나 처리구간에 유의차는 없었다. PmD는 15일째 백신의 역가가 증가하듯 보이다가 30일째 백신 역가가 모두 감소하는 경향을 보였으나 유의차는 없었다. 면역기능성 추출물질을 급여한 후 15일째와 30일째 혈장을 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 를 분석해 본 결과, 15일째와 30일째 TNF- $\alpha$ 의 농도가 대조구에 비해 면역기능성 추출물질의 첨가구가 증가하는 경향은 보였으나 유의차는 없었다. 혈장 내 IL-1 $\beta$  농도는 15일째 모든 처리구에서 통계적인 유의차는 없었으나, 30일째 면역기능성 추출물질 0.3% 첨가구에서 대조구에 비해 유의하게 높았다( $P<0.05$ ).

따라서 면역기능성 추출물질은 돼지 사료 내 첨가 시 돼지의 생산성에 영향을 주지 않으면서 혈장 내의 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 가 상승하는 효과가 있는 것으로 보아 가축 사료내의 면역증강제로서의 역할을 하며, 무항생제 사용으로

인한 안전한 축산물 및 축산물 내 항생제 잔류 문제 등을 줄여줄 수 있을 것으로 사료된다.

## 5. 참고문헌

- Bae, K.H., W.D. Chung, W.T. Cho, C.B. Yang, and I.K. Han, 1999. Effects of kelp meal on the growth performance and carcass characteristics of finishing pigs. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 23:163-172.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric.* 11:1-4.
- Duncombe A.S., A. Meager, H.G. Prentice, J.E. Grundy, H.E. Heslop, A.V. Hoffbrand, M.K. Brenner, 1990.  $\gamma$ -Interferon and tumor necrosis factor production after bone marrow transplantation is augmented by exposure to marrow fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Blood.* 76:1046-1053.
- Goeddel D.V., B.B. Aggarwal, P.W. Gray, D.W. Leung, G.E. Nedwin, M.A. Palladino, J.S. Patton, D. Pennica, H.M. Shepard, B.J. Sugarman, 1986. Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 Pt. 1:597-609.
- Her E., S.H. Jang, and S.G. Hwang, 1999. The effect of Korean seaweed extracts on the cytokine production of peritoneal macrophage in mouse. *Biochemica Biophysica ACTA* Submitted.
- Inagawa, H., T. Nishizawa, D. Tsukioka, T. Suda, Y. Chiba, T. Okutomi, A. Morikawa, G.I. Soma, and D. Mizuno, 1992. Homeostasis as regulated by activated macrophage. II. LPS of plant origin other than wheat flour and their concomitant bacteria. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo, Japan,* 40(4):994-997.
- Nishino. T., and T. Nagumo, 1991. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fuacan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Res. (Netherlands).* 214:193-197.
- NRC, 1998. Nutrient requirements of Swine. 10th ed. National Academy Press. Washington D.C.
- Perry, N.B., Blunt, J.W., and Munro, M.H, 1992. A cytotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown

- algae, *Landsburgia quercifolia*. J. Nat. Prod. (USA) 54:978-985.
- SAS, 1996. SAS User's guide. Statistical Analysis System institute. Inc. Cary NC.
- 이성태, 2001. 한국산 해조류로부터 분리된 렉틴의 이화학적 특성과 면역생물학적 활성기전에 관한 연구. 강원대학교 대학원 박사학위논문.