ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2022** Vol. 32. No. 9. 706~711 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2022.32.9.706

- Note -

Comparison of Stress in General Farms and Animal Welfare Farms Using Feather Corticosterone Analysis

Jong-Ryun Kim, Ho-Seong Choe* and Kwan-Seob Shim*

Department of Animal Biotechnology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Received May 20, 2022 /Revised July 8, 2022 /Accepted July 25, 2022

Broiler chickens are exposed to various stresses throughout their lives, and those stresses affect their well-being and meat quality. Therefore, the farm breeding system is critical for reducing stress in broilers and improving animal welfare. This study was conducted to evaluate the difference between general farms and animal welfare farms and to evaluate feather corticosterone as an index for measuring stress. Samples of 28-day-old broilers (blood, feathers, and muscle) were collected from slaughter-houses, and corticosterone, along with HSP70, glycogen, and L-lactate, were extracted from feathers and serum as indicators of broiler stress levels and energy metabolism. The analysis results confirmed a significantly (p<0.01) higher feather cortisone level in the general farm group than in the welfare farm group, but no significance was detected for serum corticosterone. HSP70 levels did not differ in muscles and feathers. Glycogen levels were significantly higher in the general farm group than in the welfare farm group (p<0.01), but L-lactate levels showed no difference. Our results suggest that feather corticosterone can be used as an indicator to evaluate stress differences between general farms and animal welfare farms and that long-term stress can be assessed.

Key words : Animal welfare, broiler, corticosterone, feather, stress

서 론

동물복지란 동물의 5대 자유를 바탕으로 동물이 건강하고 편안하며 좋은 영양 및 안전한 상황에서 원래의 습성을 나타낼 수 있으며, 고통 및 두려움 등의 부정적인 감정을 느끼지 않는 것을 의미한다. 현재 전 세계적으로 사육되는 닭의 생산량은 연간 600억 마리에 육박하고 있다[10]. 또한 가금류 산업은 동물 복지와 제품 품질, 안전 및 선호도에 관한 소비자의 요구 사항을 충족하기 위해 노력하고 있다[10].

육계는 도축 전에 절식, 포획, 운송을 비롯한 여러 잠재적인 스트레스 요인에 노출되며, 이러한 취급 방식은 가금의 복지와 도체 품질에 가장 큰 영향을 미치는 요인 중 하나이다[14]. 스트레스는 세포의 생화학적 및 생리학적 상태의 변화를 촉진하여 항상성을 방해하고 식육의 품질과 양을 감소시킨다. 스트레스를 받은 개체는 체내 항상성 유지를 위해 즉각적인 체내 반응을 유도한다[19]. 스트레스의 생리학적 측정은 많은 시스템의 상호 작용에 따라 달라지며 일부 스트레스 반응은 관련된 기본 시스템의 기능을 통해 측정할 수 있다[8]. Corticosterone (CORT), heat shock protein (HSP), glycogen 및 L-lactate는 모두 가금류의 스트레스를 측정하는 데 사용할 수 있는 생화학인자이다.

광범위하게 사용되는 생리학적 지표는 hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) 축이 활성화될 때 방출되는 스테로이드계 호르몬의 분석이다[22]. 스트레스는 닭의 CORT 상승을 유발하며, 스트레스가 복지를 악화시키기 때문에 CORT 수치의 상승은 복지 상태가 좋지 않음을 나타낸다[7].

또한 높은 주변 온도로 인한 스트레스와 이와 관련된 산화 스트레스는 육계의 건강을 악화시킨다[21]. 열 스트레스에 노출되면 스트레스에 대한 반응으로 세포와 조직에서 생성되는 HSP의 합성이 증가한다[13]. HSP는 단백질 접힘 메커니즘에서 중요한 역할을 하는 분자 샤페론 계열로[3], HSP70은 산화적 손상을 감지하고, 외부 스트레스에 의해 손상된 단백질의 구조를 회복시켜 복구하거나, 잘못 접혀진 단백질을 분해하여 제거하는 역할과 세포사멸을 조절하는 중요한 생리적 기능을 수행한다[24].

해당과정은 신체의 수많은 생리학적 과정에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 육류의 풍미 및 품질에도 영향을 미치고, 고품질 육계 품종의 육종을 위한 유용한 바이오

***Corresponding authors**
Tel : +82-63-270-2513, Fax : +82-63-270-2614
E-mail : hschoe@jbnu.ac.kr (Ho-Seong Choe)
Tel : +82-63-270-2609, Fax : +82-63-270-2614
E-mail : ksshim@jbnu.ac.kr (Kwan-Seob Shim)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

마커를 제공한다[16]. 살아있는 유기체는 해당과정을 통해 에너지를 생산하는데 glycogen은 해당과정을 위한 포도당의 주요 공급원이다[15]. glycogen은 골격근의 주요 에너지 저장형태로[26], 세포가 자체적으로 사용하거나 다른 세포로 내보내기 위해 포도당을 저장하는 세포 저장소 역할을 한다[5].

현재 농장 시스템의 영향을 받은 육계의 복지 상태를 모니터링한 연구가 많이 진행되었으나, 육계의 feather를 이용하여 일반농장과 동물복지농장의 복지 수준의 차이를 비교한 연구는 아직까지 미흡하다.

따라서 본 연구는 육계의 feather 내 CORT를 분석하여 샘플 수집 시 육계에게 주는 스트레스를 최소화시켜 동물복지를 실현하고, 일반농장과 동물복지농장의 복지 수준을 비교하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물, 샘플수집

모든 동물 실험은 대한민국 전북대학교 동물윤리위원회(CBNU2018-097)의 승인을 받았다. 본 연구에 이용된 공시재료는 일반농장과 동물복지농장의 28일령 육계(cobb)이다. 육계의 feather (n=27)는 도계 전의 28일령 육계의 닭의 날개(vane)와 목(pulp)에서 채취하였다. Serum (n=20)은 날개정맥에서 혈액을 채취한 후, 원심분리(3,000× g, 15 min, 4℃)하여 serum을 분리하였다. Muscle tissue (n=10)는 도계장에서 처리 후 생산되는 식육의 가슴육 부위를 채취한 후, 곧바로 액체질소에 냉동하고 잘게 분쇄하였다. 모든 sample은 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

Serum corticosterone 분석

Serum CORT 분석은 Corticosterone ELISA kit (Enzo, New York, USA)를 사용하였다. Serum에 Steroid Displacement Reagent (SDR) solution을 넣고 vortexing 한 뒤 5 min 동안 그대로 두었다. 그 후, ELISA assay buffer를 추가하여 sample을 준비하였다. 준비된 sample은 제조업체의 방법에 따라 분석을 진행하여 CORT 농도를 측정하였다.

Feather corticosterone 분석

Feather corticosterone은 메탄올 기반 추출 기술을 사용하여 추출하였다[2]. Feather의 vane을 수집하고 Bead beating homogenizer (Benchmark Scientific, Sayreville, USA)로 균질화 후 HPLC 등급의 메탄올을 첨가하였다. Sample을 sonication water bath에서 30 min 동안 처리 후 shaking water bath에서 overnight하였다. 그 다음 메탄올을 여과지를 이용하여 feather sample과 분리했으며, 3 ml 메탄올을 추가하여 feather 잔여물 및 원래 sample tube를 세척하였다. 메탄올 추출물을 50°C water bath에서 증발시켰고, 잔여 pellet은 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 용출하였다. 추출된 sample을 Corticosterone ELISA kit (Enzo, New York, USA)를 사용하여 제조업체 지침에 따라 feather sample의 corticosterone 농도를 측정하였다.

단백질 추출 및 Western blotting

Feather (pulp)과 muscle 내 단백질은 분쇄된 sample에 protease inhibitor가 포함된 Radio immune precipitation assay buffer (Biosesang, Sungnam, Korea)를 넣고 균질화 한 후 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4℃) 하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 DC kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 정량 후 샘플은 12% acrylamide gel에서 전기영동하였고, 분리된 단백질은 PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane으로 옮겼다. Membrane을 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.05% Tween 20)에 5%로 희석한 skim milk로 실온에서 90 min 동안 blocking 한 뒤, 1차 항체를 5% skim milk에 희석하여 4℃에서 overnight 하였다. 1차 항체의 종류와 희석배율은 다음과 같다: HSP70 (1:2,500, ADI-SPA-820, Enzo, San Diego, CA, USA), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:2,500, sc-47724, Santa Cruz, CA, USA). TBST로 membrane을 washing한 후, 2차 항체(goat anti-mouse IgG, Enzo, San Diego, CA, USA)를 5% skim milk에 1:5,000으로 희석하여 실온에서 1.5 hr 반응시킨 후, TBST로 washing 하였다. 마지막으로 membrane을 ECL kit (SuperSignal WestPico Plus, Thermo Fisher, USA)에 반응시키고 iBright CL100 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 단백질 발현 수준을 시각화 하였다. 단백질 발현은 GAPDH로 표준화하였다.

근육 내 glycogen 및 L-lactate 분석

근육 내 glycogen 및 L-lactate는 각각 Glycogen Assay kit (ab65620, Abcam)과 L-lactate Assay kit (ab65330, Abcam)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

통계 분석

통계 분석은 SAS 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 수행되었다. 일반농장과 동물복지농장 간 비교는 Student's t-test를 통해 유의성 검정을 하였다. 모든 결과 값은 평균과 표준오차(Mean ± SE)로 나타내었으며, 유의 수준은 $p<0.01$에서 분석하였다.

결과 및 고찰

Corticosterone 비교

일반 및 동물복지농장의 serum과 feather CORT 함량을

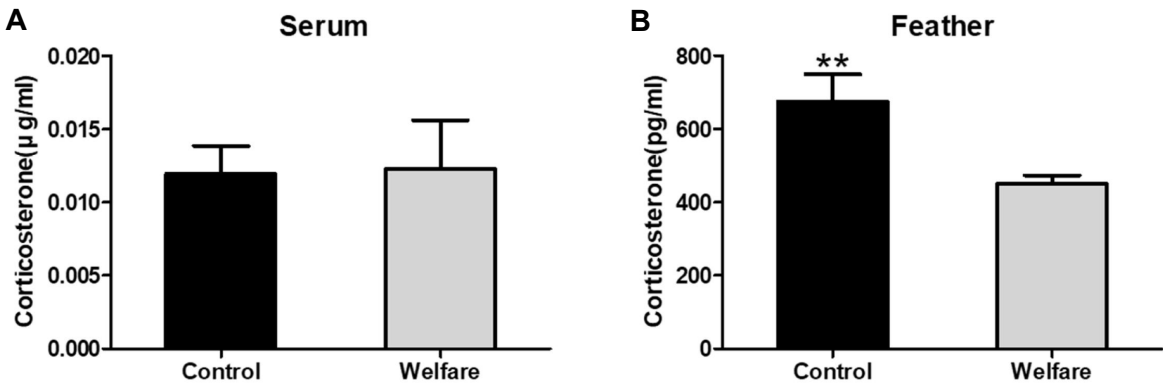

Fig. 1. Corticosterone level of serum (n=20) and feather (n=27). (A) Corticosterone (μg/ml) levels in serum. (B) Corticosterone (pg/ml) levels in feather. Abbreviations: Control, general farm; Welfare, animal welfare farms. Values are presented as the mean ± SE. Significant differences are represented $^{**}p<0.01$.

분석한 결과, Fig. 1과 같이 나타내었다. Serum CORT은 유의적인 차이를 보이지 않았다. Feather CORT은 일반농장에서 유의적으로 높은 수치를 보였다($p<0.01$). HPA 축은 스트레스에 반응하여 활성화되어 부신에서 corticosteroid의 분비가 증가한다[25]. CORT은 조류 내분비계에서 일차적인 스트레스 유발 corticosteroid이며[23], CORT는 조류의 상태를 평가하는 데 널리 사용되는 척도이다[12]. Serum CORT는 HPA 축의 활성을 결정하는 데 선호되는 방법으로[23], 샘플링 전의 24시간 동안의 급성 스트레스를 나타낸다[2]. Feather CORT은 장기간의 스트레스를 나타내며 feather의 CORT 침착이 다양한 생활사 단계에 따라 혈장 호르몬 수준에서 평가된 HPA 활동의 조절과 유사하다[4]. 또한 feather은 만성 스트레스 상태를 분석하는 데 정확하기 때문에 만성 스트레스를 측정하는 데 feather CORT이 serum CORT보다 더 신뢰할 수 있고 정확한 분석이다[2]. 따라서 일반농장과 동물복지농장의 육계의 복지 수준을 비교하기 위해 급성스트레스의 영향을 받는 serum CORT를 비교하기보다는 장기간의 스트레스를 평가하는 데 더욱 정확한 feather CORT를 비교하면 일반농장과 동물복지농장의 사육 환경이 육계에게 미치는 영향을 분석할 수 있음을 시사한다.

Heat shock protein 70 비교

일반 및 동물복지농장의 muscle과 feather HSP70 단백질의 발현 수준을 분석한 결과, Fig. 2과 같이 나타내었다. Muscle HSP70 단백질의 발현 수준은 일반 및 동물복지농장 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 feather HSP70 단백질의 발현 수준도 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 스트레스는 HSP 계열에 속하는 스트레스 단백질 그룹의 합성 증가를 빠르게 유도한다[9]. 특히 스트레스 단백질 중 가장 흔한 단백질인 HSP70의 발현이 증가한다[17]. HSP70의 증가된 발현은 손상으로부터 세포를 보호하는 데 중요한 역할을 한다[1]. HSP70은 가장 흔하고 단백질 손상에 대해 매우 강한 반응을 나타내기 때문에 바이오마커에 대한 이상적인 후보이다[20]. Feather HSP70 단백질 분석에 사용된 pulp는 혈액에 직접적인 영향을 받아 성장하기 때문에[15] 단기간의 스트레스를 평가할 수 있다. 하지만 Kannan [14]의 연구에서 사육 기간동안 지속적인 스트레스가 육계를 스트레스에 적응시켜 스트레스와 두려움을 줄일 수 있다고 보고하였다. 따라서 스트레스에 대한 내성이 생긴 일반농장의 육계와는 다르게 동물복지농장의 육계가 샘플 채취 이전의 handling 과정에서 받은 스트레스에 비교적 민감하게 반응하여 HSP70의 발현 수준이 증가하여 결과적으로 스트레스 환경에서 자라온 일반농장의 육계와 동물복지농장의 육계의 HSP70 발현 수준에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러므로 HSP70 단백질을 이용하여 일반농장과 동물복지농장의 사육 환경이 육계에게 미치는 영향을 분석하기에는 적합하지 않음을 시사한다.

근육 glycogen 및 L-lactate 비교

일반 및 동물복지농장의 근육 내 glycogen과 L-lactate함량 분석 결과, Fig. 3과 같이 나타내었다. 일반농장의 근육 내 glycogen은 동물복지농장에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였다($p<0.01$). 근육 내 L-lactate는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 에너지를 생성하고 남은 포도당은 glycogen으로 저장되지만[5], 스트레스 상황에서는 포도당이나 glycogen이 L-lactate로 전환되고[18], 근육에서는 L-lactate 생산이 증가한다[27]. 전환된 L-lactate는 포도당을 대신하여 해당과정을 조절할 수 있는 분자로 작용할 수 있다[6]. 따라서 스트레스에 민감한 동물복지농장의 육계가 도축 전 handling 과정에서 받은 스트레스로 인하여 에너지 소모가 증가하여 glycogen 함량이 낮지만, L-lactate 함량은 처리구 간 유의적인 차이가 없는 것으로 사료된다. 그러므로 glycogen이 L-lactate를 이용하여 일반농장과 동물복지농장의 환경이 육계에게 미치는 스트레스 수준을 분석

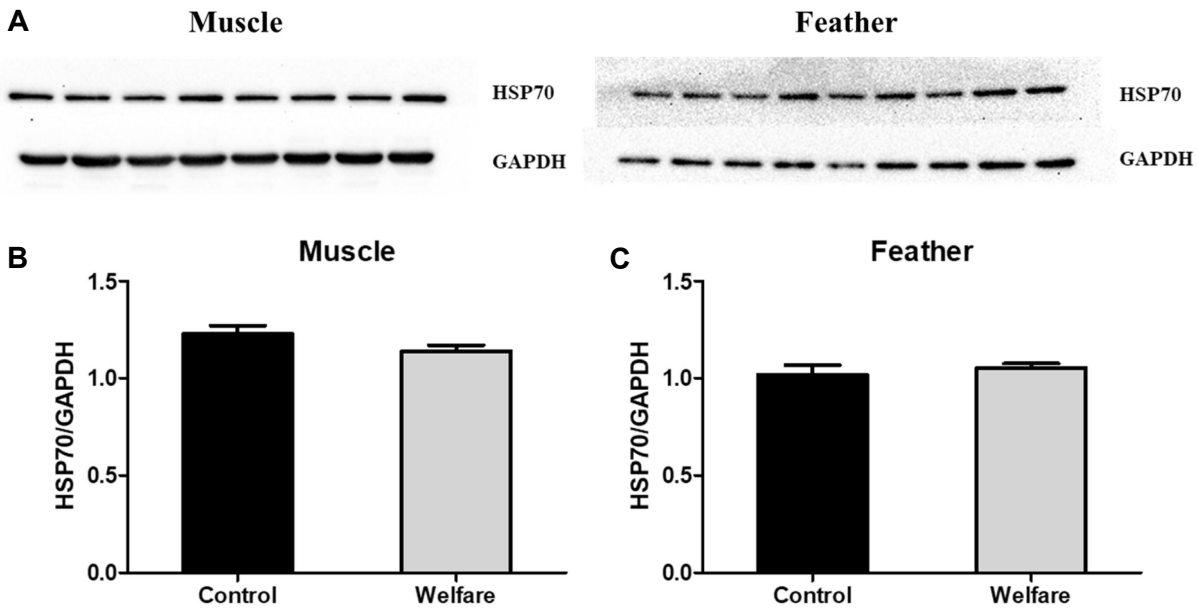

Fig. 2. HSP70 protein expression by western blot in the broiler muscle tissue (n = 10) and feather (n = 27). (A) Protein bands of HSP70 and GAPDH. Each lane showed each bird. (B) HSP70 protein expression level in muscle calculated with GAPDH. (C) HSP70 protein expression level in feather calculated with GAPDH. Abbreviations: Control, general farm; Welfare, animal welfare farms; HSP70, heat shock protein 70; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Values are presented as the mean ± SE.

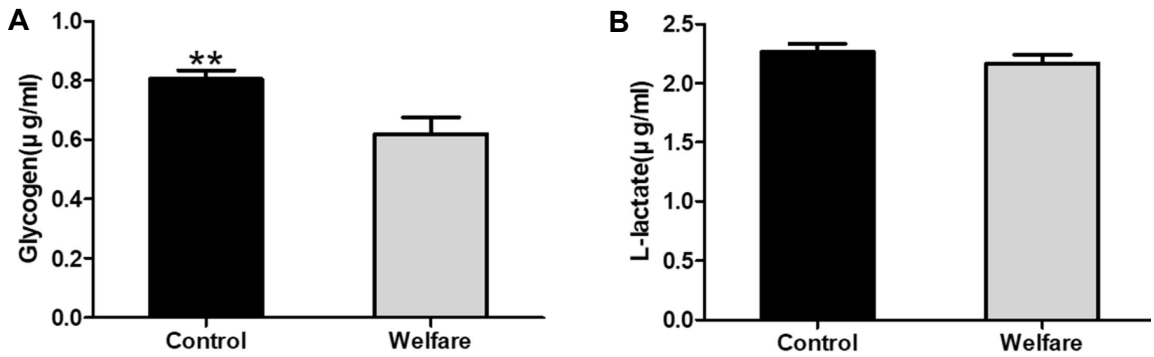

Fig. 3. Glycogen and L-lactate level of muscle tissue (n=10). (A) Glycogen (μg/ml) levels in muscle tissue. (B) L-lactate (μg/ml) levels in muscle tissue. Abbreviations: Control, general farm; Welfare, animal welfare farms Values are presented as the mean ± SE. Significant differences are represented **p<0.01.

하기 위한 지표로는 적절하지 않음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명산업 기술개발사업의 지원(318022-04-2-CG000)을 받아 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Taha, A. E. and Noreldin, A. E. 2019. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *J. Therm. Biol*. **79**, 120-134.
2. Ataallahi, M., Nejad, J. G., Song, J. I., Kim, J. S. and Park, K. H. 2020. Effects of feather processing methods on quantity of extracted corticosterone in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Technol*. **62**, 884.
3. Baykalir, Y. and Simsek, U. G. 2018. Impact of different rearing systems and age on Bovans White layer's performance, egg quality traits and synthesis of heat shock protein

70 kDa. *Ann. Anim. Sci*. **18**, 1045-1060.
4. Bortolotti, G. R., Marchant, T. A., Blas, J. and German, T. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Funct. Ecol*. **22**, 494-500.
5. Brown, A. M. and Ransom, B. R. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **55**, 1263-1271.
6. Calì, C., Tauffenberger, A. and Magistretti, P. 2019. The strategic location of glycogen and lactate: from body energy reserve to brain plasticity. *Front. Cell. Neurosci*. **13**, 82.
7. Caulfield, M. P. and Padula, M. P. 2020. HPLC MS-MS analysis shows measurement of corticosterone in egg albumen is not a valid indicator of chicken welfare. *Animals* **10**, 821.
8. Fazio, E. and Ferlazzo, A. 2003. Evaluation of stress during transport. *Vet. Res. Commun*. **27**, 519-524.
9. Figueiredo, D., Gertler, A., Cabello, G., Decuypere, E., Buyse, J. and Dridi, S. 2007. Leptin downregulates heat shock protein-70 (HSP-70) gene expression in chicken liver and hypothalamus. *Cell Tissue Res*. **329**, 91-101.
10. Food, N. A. 2016. FAOSTAT database. FAO-ESS, Rome.
11. Gou, Z., Abouelezz, K., Fan, Q., Li, L., Lin, X., Wang, Y., Cui, X., Ye, J., Masoud, M. and Jiang, S. 2021. Physiological effects of transport duration on stress biomarkers and meat quality of medium-growing Yellow broiler chickens. *Animal* **15**, 100079.
12. Jenni Eiermann, S., Helfenstein, F., Vallat, A., Glauser, G. and Jenni, L. 2015. Corticosterone: effects on feather quality and deposition into feathers. *Methods Ecol. Evol*. **6**, 237-246.
13. Jiang, S., Mohammed, A., Jacobs, J., Cramer, T. and Cheng, H. 2020. Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress. *Poult. Sci*. **99**, 142-150.
14. Kannan, G. and Mench, J. 1997. Prior handling does not significantly reduce the stress response to pre-slaughter handling in broiler chickens. *Appl. Anim. Behav. Sci*. **51**, 87-99.
15. Lillie, F. R. 1940. Physiology of development of the feather. III growth of the mesodermal constituents and blood circulation in the pulp. *Physiol. Zool*. **13**, 143-176.
16. Liu, X., Liu, L., Wang, J., Cui, H., Chu, H., Bi, H., Zhao, G. and Wen, J. 2020. Genome-wide association study of muscle glycogen in Jingxing yellow chicken. *Genes* **11**, 497.
17. Mazzi, C. M., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Savino, V. J. M., Coelho, A. A. D. and Macari, M. 2003. Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in Broiler chickens (Gallus gallus) of different breeds. *Genet. Mol. Biol*. **26**, 275-281.
18. Mouzo, D., Rodríguez-Vázquez, R., Lorenzo, J. M., Franco, D., Zapata, C. and López Pedrouso, M. 2020. Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review. *Trends Food Sci. Technol*. **99**, 520-530.
19. Park, J., Cho, E. J., Choi, E. S., Hong, Y. H., Choi, Y. H. and Sohn, S. H. 2016. The relationship of the expressions of stress-related markers and their production performances in Korean domestic chicken breed. *Kor. J. Poult. Sci*. **43**, 177-189.
20. Ryan, J. A. and Hightower, L. E. 1996. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. *EXS* **77**, 411-424.
21. Shehata, A. M., Saadeldin, I. M., Tukur, H. A. and Habashy, W. S. 2020. Modulation of heat-shock proteins mediates chicken cell survival against thermal stress. *Animals* **10**, 2407.
22. Spencer, R. L. and Deak, T. 2017. A users guide to HPA axis research. *Physiol. Behav*. **178**, 43-65.
23. Strong, R. J., Pereira, M. G., Shore, R. F., Henrys, P. A. and Pottinger, T. G. 2015. Feather corticosterone content in predatory birds in relation to body condition and hepatic metal concentration. *Gen. Comp. Endocrinol*. **214**, 47-55.
24. Tang, S., Yin, B., Xu, J. and Bao, E. 2018. Rosemary reduces heat stress by inducing CRYAB and HSP70 expression in broiler chickens. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2018**, 7014126.
25. Vera, F., Zenuto, R. and Antenucci, C. D. 2017. Expanding the actions of cortisol and corticosterone in wild vertebrates: A necessary step to overcome the emerging challenges. *Gen. Comp. Endocrinol*. **246**, 337-353.
26. Zhang, L., Li, J., Gao, T., Lin, M., Wang, X., Zhu, X., Gao, F. and Zhou, G. 2014. Effects of dietary supplementation with creatine monohydrate during the finishing period on growth performance, carcass traits, meat quality and muscle glycolytic potential of broilers subjected to transport stress. *Animal* **8**, 1955-1962.
27. Zhang, Z., Jia, G., Zuo, J., Zhang, Y., Lei, J., Ren, L. and Feng, D. 2012. Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poult. Sci*. **91**, 2931-2937.

초록 : Feather corticosterone 분석을 통한 일반농장과 동물복지농장의 스트레스 비교

김종륜 · 최호성* · 심관섭*
(전북대학교 동물생명공학과)

육계는 도축 전에 다양한 스트레스에 노출되며, 스트레스는 육계의 복지 수준과 도체 품질에 영향을 미친다. 따라서 농장의 사육 시스템은 육계의 스트레스를 감소시키고 동물복지를 향상시키기 위해서 매우 중요하다. 본 연구는 일반농장과 동물복지농장의 차이를 평가하고 스트레스를 측정하기 위한 지표로 feather corticosterone를 제시하기 위해 수행되었다. 육계의 스트레스 수준과 에너지 대사를 나타내는 HSP 70, glycogen, L-lactate와 함께 feather과 serum에서 추출한 corticosterone를 분석하기 위해 도축장에서 28일 된 육계의 샘플(혈액, 깃털, 근육)을 수집했다. Feather corticosterone은 일반농장군이 복지농장군보다 유의하게 (p<0.01) 높았으나 serum corticosterone에서는 유의성이 없었다. HSP70은 muscle과 feather에서 유의적인 차이가 없었다. Glycogen은 일반농장군이 복지농장군보다 유의하게 높았으나(p<0.01), L-lactate에서는 차이가 없었다. 본 연구 결과는 feather corticosterone 이 일반농장과 동물복지농장의 차이를 평가하고 장기간의 스트레스를 평가할 수 있는 지표임을 시사한다.