



고온기 생균제 급여가 육계의 혈액, 소장 점막 및 간 조직에서 항산화 생화학 지표 및 항산화 효소에 미치는 영향

서문강¹ · 장인석^{2*}

¹경상국립대학교 농업생명과학대학 동물생명융합학부 대학원생, ²경상국립대학교 농업생명과학대학 동물생명융합학부 교수

Effects of Probiotics on Antioxidant Biochemical Parameters and Antioxidant Enzymes in the Blood, Intestinal Mucosal Tissues and Liver of Broiler Chicks under High Ambient Temperature Conditions

Kang-Min Seomoon¹ and In-Surk Jang^{2*}

¹Graduate Student, Division of Animal Bioscience and Integrated Biotechnology, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

²Professor, Division of Animal Bioscience and Integrated Biotechnology, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

ABSTRACT Four-d-old broiler chicks were randomly assigned to 3 groups with 9 replicates (8 birds/cage) under high ambient temperature; birds fed a basal diet (CON), a basal diet supplemented with 0.25% of probiotic complex (LPB, 1×10^6 *Lactobacillus plantarum*, 1×10^6 *Bacillus subtilis*, and 1×10^6 *Saccharomyces cerevisiae*) and 0.5% probiotic complex (HPB). Immediately after 28-d feeding trial, 6 birds having average body weight per group were sacrificed for evaluating the effects of probiotics on antioxidant parameters in the serum, intestine, and liver of birds. As results, serum biochemical parameters of nitrogen components including total protein, albumin, urea nitrogen, and glutathione were unaffected by dietary probiotics. In addition, serum superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione S-transferase (GST) activities, and lipid peroxidation (MDA) were not changed by dietary probiotic supplement in birds. In the intestinal mucosa, SOD activity in the HPB group significantly ($P<0.05$) increased compared with that in the CON and the LPB groups. Lipid peroxidation in the HPB group significantly ($P<0.05$) decreased compared with that in the CON group. However, there was no statistical difference in GPX, and GST activities in the intestinal mucosa among treatment groups. In the liver, the activities of SOD, GPX, and GST, and the level of MDA were unaffected by probiotic supplement. In conclusion, 0.5% of probiotics significantly increased SOD activity and decreased lipid peroxidation in the intestinal mucosa, suggesting that probiotic complex could be potential to improve the small intestinal antioxidant capacity of bird under high ambient temperature conditions.

(Key words: broiler, probiotics, high ambient temperature, antioxidant enzymes, lipid peroxidation)

서론

생균제(probiotics, direct-fed microbial)는 시대적 요구에 적합한 친환경 기능성 사료 첨가제로서 국내에서 널리 사용되고 있다. 생균은 유익 미생물 균총으로서 장관 내 정착하면 병원성 미생물을 경쟁적으로 억제하여 면역 증진 등의 작용으로 닭의 생산성을 개선한다고 보고 되었다(Nava et al., 2005; Huyghebaert et al., 2011). 그러나 지금까지 다양한 연구 결과를 살펴보면 생균제 급여가 닭의 생리적 작용과 생산성에 미

치는 효과는 일정하지 않는데(Bai et al., 2013; Lee et al., 2014; Wang et al., 2016), 이러한 이유로써 생균제 균주 종류 및 유효 숫자, 첨가 방법과 시기, 사육환경 등 다양한 요인들에 의해 작용 효과가 영향을 받기 때문이다(Jin et al., 1998; Aktas et al., 2016). 생균제로서 유산균에 속하는 *Lactobacillus(L.)*는 위장관 내 정착률이 우수하지만 강한 위산으로부터 생존할 수 있는 저항성이 높아야 하며(Kabir, 2009), *Bacillus(B.) subtilis* 는 아포 형성균으로 고온 등에 대한 저항성이 강하고 유산균의 정착을 도와 장내 환경 조절제로서 우수하다(Gadde et

* To whom correspondence should be addressed : ijjang@gnu.ac.kr

al., 2017). 다양한 배양물을 함유하는 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*) 역시 면역체계를 자극하여 소화기관의 항상성을 높이는 것으로 보고되었다(Bai et al., 2013). 따라서 이러한 유익균들은 소화기관에서 장내 환경 조절제로서 우수한 효과를 나타내므로 단일 생균제보다는 복합생균제가 닭에게 효과적인 사료 첨가제가 될 수 있다(Lee et al., 2014). 생균제의 주요 작용 기전은 소화관에서 유익균의 정착을 도와 소장 점막 세포의 구조적 안정화 및 병원성균을 억제하여 면역 작용을 높이는 것으로 알려져 있다(Rajput et al., 2013; Lee et al., 2014). 최근 연구 결과 복합생균제 급여 시 소장 점막 세포에서 병원성 미생물 방어에 중요한 분비형 면역 글로불린(sIgA) 수준이 증가하고 유익균총이 증가하는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2020).

닭에서 면역과 항산화 작용은 밀접한 관계가 있으며, 체 조직에서 다양한 요인에 의해 발생하는 산화 스트레스가 염증을 유발하고 이를 효과적으로 제거하는 물질은 면역을 증가시킬 수 있다(Molvarec et al., 2011). 특히 육계는 고온기에 열 스트레스에 따른 심각한 산화적 스트레스를 받는다(Puthongsiriporn et al., 2001). 열 스트레스로 소화기 염증 유발과 이에 따른 면역 저하로 폐사율이 급격히 증가함으로 고온 사육환경에서 생균제는 장내 유익균을 정착시켜 숙주의 면역 증가에 효과적으로 작용할 수 있다(Molvarec et al., 2011; Mohammed et al., 2019). Chen et al.(2022)의 보고에 의하면 고온기에는 닭의 장관 내 유익균과 유해균의 불균형을 초래하여 소장 흡수 세포의 구조적 문제와 면역 저하를 유발하기 때문에 열 스트레스 상황에서 생균제의 유용성이 더욱 높다고 하였다. 또한 Khan et al.(2019)도 고온 환경에서 육계에게 생균제를 급여하면 친염증 사이토카인이 감소하고 항산화 효소가 증가하여 산화적 스트레스가 완화된다고 보고하였다. 따라서 소화기 염증의 발생이 증가하는 고온 사양 조건에서 생균제는 염증을 완화해 면역을 증강하는데 이는 항산화 방어작용과 관련이 높다(Ergine et al., 2016). Bai et al.(2018)은 육계에서 생균제 급여 시 소장 점막 조직의 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPX)가 증가하고 지질과산화 수준이 감소하는 것으로 보고하였다.

또한, 생산성 위주로 육종된 육계는 근육의 성장에 비례적으로 소화기관의 발달이 이루어지지 못해 소화기에서 산화 스트레스 발생이 높다. 특히 닭은 간에서 체지방의 80% 이상을 합성하며 지방간 현상이 빈발하여 과도한 산화적 스트레스가 유발된다(Lin et al., 2021). 따라서 고온 시 생균제 급여는 소화기관의 항상성 유지와 더불어 간 조직의 기능을 회복시킬 수

있는 것으로도 생각된다. 최근 연구에서 *L. acidophilus*를 급여 시, 육계의 간 조직에서 지질합성 유전자의 발현 감소와 지질 분해 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다(Dev et al., 2021). 또한 생균제 급여 시 육계의 혈중 total cholesterol, LDL-cholesterol 및 triglyceride 수준을 감소시키는 것으로 보고되었다(Shokryazdan et al., 2017). 위의 선행 연구들은 생균제 급여가 소화기관의 염증 저하와 간에서 지방축적을 감소시켜 산화 스트레스를 낮출 수 있다는 증거를 제시하고 있다. 따라서 육계에서 생균제 급여는 소화기관에서 염증 발생과 지방축적을 완화하여 체 조직의 항산화 방어 적용을 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 여름철 고온 스트레스 사양 조건에서 육계에게 복합생균제(0.25% 및 0.5% *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *Saccharomyces cerevisiae*)를 급여하여 혈장, 소장 점막 및 간 조직에서 항산화 관련 지표를 분석하여 생균제의 항산화 방어 작용에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시험설계 및 사양관리

육계(Ross 308) 216수를 대조군(CON), 0.25% 생균제(LPB) 및 0.5% 생균제(HPB) 급여군 등 3 처리군에 9 반복(8수/cage)으로 완전임의 배치하였다. 사양시험은 4~32일령까지 총 28일로서 옥수수과 대두박 위주의 상업용 사료를 기초 사료로 사용하였다. 육계 전기(4~10일령), 중기(11~21일령) 및 후기(22~33일령) 사료로 구분하여 시험설계에 따라 기초 사료에 생균제를 배합하였다(Table 1). 생균제는 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 등 10^6 CFU g^{-1} 이상 함유된 복합생균제(D&A, Haman, Korea)를 시험에 사용하였다. 케이지 사육 시 사료와 음수는 자유 급이하고 점등 관리는 23시간 점등하였으며, 계사 온도는 33℃에서 육계 사육실 온도관리 프로그램에 따라 점감하였다. 본 시험을 실시한 하절기(7월 20일~8월 17)의 계사 평균온도는 주간 32~34℃, 야간 27~29℃이며 상대습도는 70~90% 수준을 보였다. 기타 일반 사양관리는 경상국립대학교 동물사육장의 사양관리 방법을 준수하였다. 본 연구는 동물실험윤리 위원회의(2019-13)의 승인을 받아 동물실험을 시행하였다.

2. 시험 샘플 채취 및 분석 방법

1) 혈장 및 장기 조직

생균제 급여 사양시험 종료 후 항산화 방어작용 지표분석을 위해 처리 군당 평균 체중에 가까운 6수(n=6)를 선발하

Table 1. Chemical composition of basal diet for broiler chicks

Items	Starter	Grower	Finisher
Energy and nutrient level			
MEn (kcal/kg)	3.10	3.15	3.20
Crude protein (%)	22.00	20.00	18.50
Calcium (%)	0.80	0.75	0.70
Phosphorus (%)	1.00	0.90	0.90
Methionine (%)	0.70	0.65	0.60

¹ Provided per kilogram of diet: vitamin A, 10,000,000 IU; vitamin D₃, 2,000,000 IU; vitamin E, 30,000 IU; vitamin K₃, 1,500 mg; vitamin B₁, 2,000 mg; vitamin B₂, 7,500 mg; vitamin B₆, 3,000 mg; vitamin B₁₂, 20 mg; niacin, 50,000 mg; pantothen, 10,000 mg; folic acid, 1,000 mg; biotin, 50 mg; FeSO₄ · 7H₂O, 70,000 mg; CuSO₄, 250 mg, CuSO₄ · H₂O, 24,000 mg; MnSO₄ · H₂O, 70,000 mg; ZnSO₄ · H₂O, 50,000 mg; Ca(IO₃)₂ · H₂O, 800 mg; Na₂SeO₃ · 5H₂O, 200 mg.

였다. 각 처리군당 선발된 육계는 에테르 흡입 마취 후 경정맥에서 채혈하여 sodium heparin 코팅 시험관에 보관하였다. 혈액 생화학 성분과 항산화 지표분석을 위해 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후 얻은 혈장을 -70℃에 냉동 보관하였다. 복강을 절개하여 간, 소장 및 췌장을 채취하고 무게를 측정 후 -70℃에 분석 시까지 보관하였다.

2) 소장 점막 세포 채취

소장의 점막 조직을 채취하기 위해 십이지장-맹장 부위를 획득하여 절개한 후 생리식염수로 3회 연속으로 세척하고 소화물을 제거하였다. 이어서 grass slide로서 점막 조직을 분리하고 일정량의 생리식염수를 혼합하여 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리(Vision, VS-15,000 CF) 후 무게를 측정하고 -70℃에 분석 시까지 냉동 보관하였다.

3) 혈액 생화학적 성분 및 항산화 지표

혈중 생화학 성분 중 total protein, albumin 및 blood urea nitrogen(BUN) 등은 자동혈액생화학분석기(Mindray, BS-120, Mindry Bio Medical Electronics co., Shnzhen, China)로 분석하였다. 혈중 glutathione(GSH) 분석은 96 well plate에 희석한 혈장을 0.3 M Na₂HPO₄를 혼합하고 0.04% 5',5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 용액을 가하여 실온에서 10분간 저장하였다. 반응 후 405 nm에서 ELISA reader로서 흡광도를 측정하고 표준물질로서는 reduced GSH를 이용하였다.

4) 혈장, 소장 점막 및 간 조직에서 항산화 효소활성도 및 지질과산화 분석

항산화 지표분석은 혈장, 소장 점막과 간 조직에서 각각

분석하였다. 소장 점막과 간 조직의 cytosol과 microsome 분리는 Kupfer and Levin(1972) 방법에 기초하여 실시하였다. 분리 방법으로 조직 1 g 당 5 mL의 0.25 M sucrose 용액 (0.25 M, sucrose, 0.005 M MgCl₂, 0.025 M KCl 및 0.008 M CaCl₂ pH 7.4)을 혼합하여 균질기(Omni tissue homogenizer, Omni Int. NW USA)로서 균질화하였다. 균질액에 완충 용액 (0.0125 M sucrose, 0.005 M MgCl₂, 및 0.008 M CaCl₂)을 첨가하여 10,000× g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 일정 비율의 완충 용액을 혼합하고 다시 10,000x g에서 15분 원심하여 상층액은 사이토졸로 분획하였다. 펠렛은 1 mL의 1.15% KCl 용액에 균질화하여 microsome 분획으로 -70℃에 분석 시까지 냉동 보관하였다. Cytosol의 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 Sigma kit(Sigma assay kit 19160, Sigma-Aldrich, MO, USA)로서 측정하였다. 효소활성도는 xanthine oxidase를 혼합한 시료를 첨가한 후 반응을 시킨 후 ELISA reader(450 nm, V_{Max}, Molecular Devices, CA, USA)에서 흡광도를 측정하였다. 그 외 상세한 방법은 kit에 제시된 방법에 따라 분석하였다. 단위 값은 시료에 존재하는 효소가 SOD의 활성도 50%를 저해하는 값을 1 unit로 정의하였다. Glutathione peroxidase(GPX) 활성도는 Tappel et al.(1978) 방법에 따라 시료에 반응 용액(0.1 mM NADPH, glutathione reductase 1 unit/mL, reduced glutathione, 0.25 mM; pH 7.4)을 첨가한 후 5분간 37℃에 저장하고 H₂O₂를 혼합하여 분광광도계에서 흡광도(340 nm)의 감소 속도를 측정하였다. GPX 활성도 unit는 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH nmol 수로 정의하였다. Glutathione S-transferase(GST) 측정은 Habig et al.(1974)의 방법으로 반응은 1 mM reduced glutathione을 chlorodinitrobenzene(CDNB) 혼합물에 희석한

시료를 가한 후 340 nm에서 흡광도의 변화 비율을 측정하였으며, 1 unit는 mg protein당 1분간 반응하는 CDNB μmol 수로 표시하였다. Microsome의 지질과산화물은 thiobarbituric acid 방법에 따라 malondialdehyde(MDA) 생성량을 분광광도계(532 nm)로 측정하였다(Bidlack and Tappel, 1973). 간 및 소장 조직에서 효소의 특이적 활성도는 단백질 mg당 농도로 나누어 표시하고 혈액에서는 mL당으로 표시였다. 단백질 분석은 BCA kit(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 ELISA reader(560 nm)로서 측정하였다.

3. 통계처리

생균제 급여에 연구 결과는 SAS program(SAS, 1996)을 이용하여 General Linear Model(GLM) 절차에 따라 통계적 유의성 검정을 실시하였다. 유의차가 인정될 때 Tukey 방법

에 따라 95% 수준에서 다중검정을 수행하고 그 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 장기 무게 및 혈액의 항산화 생화학적 지표

고온기 생균제 급여(0.25% 및 0.5%)에 따른 항산화 지표분석에 이용한 육계의 체중 및 소화 장기의 상대적 무게는 Table 2에 제시하였다. 육계 체중, 간 및 췌장의 상대적 무게는 차이가 없었으나, 소장 점막 무게는 0.25% 생균제 급여군(LPB)에서 대조군(CON)에 비해 유의하게($P<0.05$) 증가하였다. 육계의 혈장에서 분석한 항산화 생화학 지표는 Table 3에 나타낸 바와 같다. 혈액의 생화학적 지표에서 항산화력을 가진 total protein, albumin, BUN 등의 질소화합물과 glutathione(GSH)

Table 2. Effect of probiotic complex supplement on body weight and the relative organ weights of broiler chickens

Item	Treatment ¹			Significance ² (<i>P</i> -value)
	CON	LPB	HPB	
Body weight at 32-d ³ (g/bird)	2,362.00 \pm 31.79	2,309.33 \pm 30.63	2,341.67 \pm 70.65	0.25
Liver (g/100 g BW)	1.87 \pm 0.38	1.79 \pm 0.13	1.75 \pm 0.11	0.68
Small intestinal mucosa (g/100 g BW)	0.72 \pm 0.18 ^b	0.94 \pm 0.16 ^a	0.75 \pm 0.13 ^{ab}	0.02
Pancreas (g/100 g BW)	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.41

Values indicate mean \pm SD (n=6).

¹ CON (basal diet), LPB (basal diet supplemented with 0.25% of probiotic complex; *L. plantarum*, 1×10^6 , *B. subtilis* 1×10^6 , and *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6) and HPB (basal diet supplemented with 0.5% of probiotic complex; *L. plantarum*, 1×10^6 , *B. subtilis* 1×10^6 , and *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6).

² Significance (*P*-value) indicated the treatment *P*-value of ANOVA.

³ Body weight of broiler chicks for harvesting tissue samples.

Table 3. Effect of probiotic complex supplement on serum antioxidant biochemical parameters of broiler chickens

Item	Treatment ¹			Significance ² (<i>P</i> -value)
	CON	LPB	HPB	
Total protein (g/dL)	2.53 \pm 0.48	2.40 \pm 0.28	2.60 \pm 0.43	0.69
Albumin (g/dL)	0.77 \pm 0.12	0.77 \pm 0.12	0.82 \pm 0.13	0.73
BUN (mg/dL)	0.53 \pm 0.12	0.60 \pm 0.36	0.51 \pm 0.11	0.75
Glutathione (mg/mL)	1.98 \pm 0.11	2.01 \pm 0.16	2.10 \pm 0.11	0.30

Values indicate mean \pm SD (n=6).

¹ CON (basal diet), LPB (basal diet supplemented with 0.25% of probiotic complex; *L. plantarum*, 1×10^6 , *B. subtilis* 1×10^6 , and *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6) and HPB (basal diet supplemented with 0.5% of probiotic complex; *L. plantarum*, 1×10^6 , *B. subtilis* 1×10^6 , and *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6).

² Significance (*P*-value) indicated the treatment *P*-value of ANOVA.

수준은 생균제 급여에 따른 유의적 차이는 없었다.

혈액에서 항산화제 방어작용은 여러 종류의 단백질, 효소 및 비타민 등이 모두 관여하는 것으로 복잡한 상호작용 시스템에 의해 작동한다. Park and Kweon(2013)에 의하면 혈장 total protein, albumin과 uric acid 등과 같은 질소화합물은 총 항산화력의 약 70% 이상을 담당하는 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고하였다. Albumin은 Cu 이온 의존성 지질 과산화 작용과 수산화기 형성을 억제하여 항산화 방어력을 나타낸다(Halliwell and Gutteridge, 1990). Albumin은 저효율성 항산화 작용 단백질이지만 그 함량이 많아 혈장의 총 항산화력에 미치는 기여도는 매우 높다고 알려져 있다(Wayner et al. 1987). GSH는 글루탐산, 시스테인 및 글리신으로 구성된 펩타이드로서 유해산소, 과산화물, 지질 과산화물 등과 같은 활성산소로부터 세포 손상을 방지하는 물질로서 혈액에서 중요한 항산화력을 나타낸다(Wu et al., 2004).

지금까지의 연구 결과를 살펴보면 Wu et al.(2019)는 생균제(*L. plantarum*)를 육계에게 급여 시 혈액의 total protein, albumin, globulin 등에는 유의한 차이가 없었음을 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 한편 Gong et al.(2018)은 *Bacillus* 계열 생균제를 육계에 급여 시 albumin은 차이가 없으나 total protein과 globulin은 증가하였다고 보고하였다. Attia et al.(2022)은 *Saccharomyces cerevisiae*를 육계에 급여 시 albumin과 globulin은 차이가 없었지만, total protein은 증가한다고 보고하였다. Abdel-Monein et al.(2020)은 생균제 (*B. subtilis*) 급여 시 고수준(10^9)에서 혈액 total protein과 albumin을 증가시키지만 10^{7-8} 수준에서는 변화가 없었고 10^5 이상에서 GSH 수준이 증가하였다고 보고하였다. Song et al.(2022)은 synbiotics(*L. plantarum* + 프락토올리고당)을 육계에 급여 시 혈액의 총 항산화력에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였다. 이상의 연구 결과들을 종합하면, 생균제가 닭의 혈액에서 항산화 계열 단백질 구성에 미치는 효과는 생균제 종류 및 수준, 사육환경 및 사료 영양 수준 등 요인에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 판단된다. 본 시험에서 급여한 복합생균제 종류와 수준은 육계의 혈장 질소 물질의 항산화 지표에는 영향이 없었다.

2. 혈액, 소장 점막 및 간 조직에서 항산화 효소 및 지질 과산화도

고온 환경에서 생균제 급여 후 육계의 혈장, 소장 점막 및 간 조직의 항산화 효소 활성화도 및 지질과산화도에 미치는 결과는 Fig. 1, 2 및 3에 각각 나타낸 바와 같다. 먼저 혈장에서 SOD, GPX 및 GST 활성화도는 생균제 급여와 급여 수준에

따른 유의한 차이 없이 모든 처리군에서 비슷한 수준을 보였다(Fig. 1A, B, C). 또한, 혈장의 지질과산화(MDA) 수준 역시 모든 처리군에서 유사한 값을 보여 생균제 급여가 혈장의 지질과산화도에는 유의한 영향을 미치지 않는 것으로

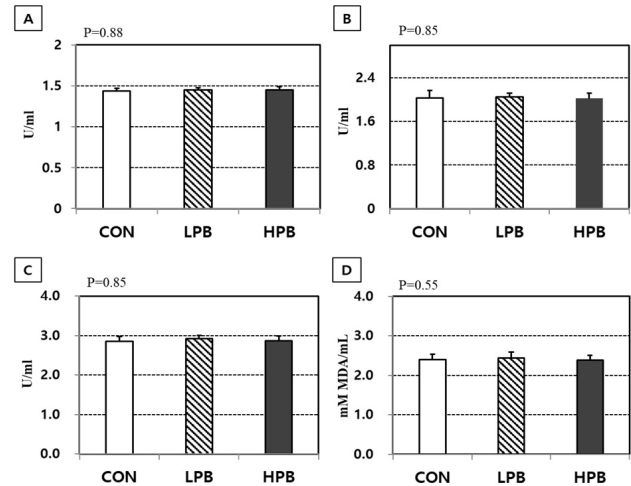


Fig. 1. The activity of antioxidant enzymes (A: SOD, B: GPX, and C: GST) and malondialdehyde level (MDA, D) in the serum of broiler chicks fed a basal diet (CON), a basal diet supplemented with 0.25% probiotic complex (LPB), and a basal diet supplemented 0.5% probiotic complex (HPB). *P*-value indicates ANOVA *P*-value of significance.

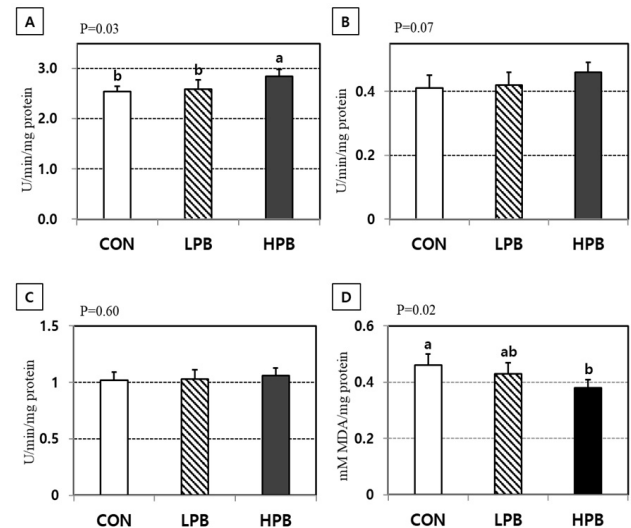


Fig. 2. The specific activity of antioxidant enzymes (A: SOD, B: GPX, and C: GST) and malondialdehyde level (MDA, D) in the small intestinal mucosa of broiler chicks fed a basal diet (CON), a basal diet supplemented with 0.25% probiotic complex (LPB), and a basal diet supplemented 0.5% probiotic complex (HPB). ^{a,b} Values (Mean±SD, n=6) with different superscripts differ significantly (*P*<0.05) among treatments. *P*-value indicates ANOVA *P*-value of significance.

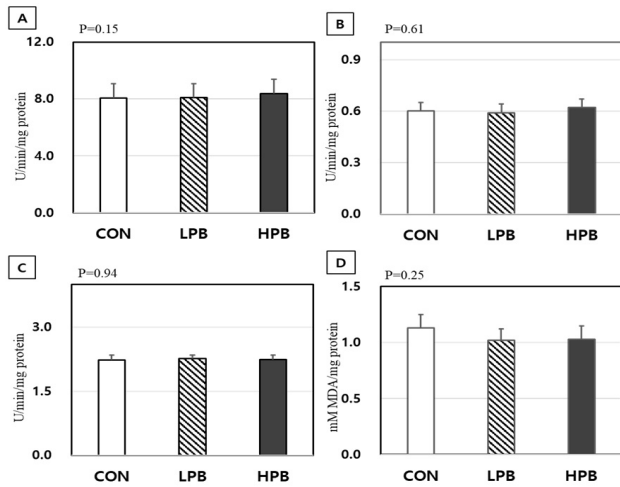


Fig. 3. The specific activity of antioxidant enzymes (A: SOD, B: GPX, and C: GST) and malondialdehyde level (MDA, D) in the liver of broiler chicks fed a basal diet (CON), a basal diet supplemented with 0.25% probiotic complex (LPB), and a basal diet supplemented 0.5% probiotic complex (HPB). *P*-value indicates ANOVA *P*-value of significance.

나타났다(Fig. 1D).

소장 점막조직에서 조사한 SOD 활성도는 0.5% 생균제 급여군(HPB)에서 대조군(CON) 및 0.25% 생균제 급여군(LPБ) 보다 유의하게($P < 0.05$) 증가하였다(Fig. 2A). 소장 점막조직의 GPX는 통계적 차이는 없었지만 HPB군에서 증가하는 경향($P = 0.07$)을 보였다(Fig. 2B). GST 활성도는 생균제 급여와 급여 수준에 따른 유의적 차이 없이 모든 처리군에서 비슷한 수준을 보였다(Fig. 2C). 한편 0.25% 생균제 급여군(LPБ)의 SOD, GPX 및 GST 활성도는 대조군(CON)과 유사한 수준을 보였다. 소장 점막조직의 지질과산화물(MDA)은 대조군(CON)과 비교 시 0.5% 생균제 급여군(HPB)에서 유의한($P < 0.05$) 수준으로 감소하였다(Fig. 2D). 그러나 대조군(CON)과 0.25% 생균제 급여군(LPБ) 간의 지질과산화물 수준은 차이가 없었다.

간 조직에서 조사한 SOD와 GPX 활성도는 생균제 급여와 급여 수준에 따른 영향을 받지 않고 대조군(CON)과 유사한 수준을 보였다(Fig. 3A, B). 항산화 기능과 이물질 대사기능을 동시에 가지는 GST 활성도 역시 생균제 급여에 따른 활성도 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 3C). 간 조직의 지질과산화물 수준 역시 모든 처리군에서 비슷한 경향을 보여 생균제 급여 및 급여 수준이 간 조직의 지질과산화도에는 유의미한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3D).

닭이 열 스트레스에 노출될 경우 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 발생에 따른 산화적 스트레스는

체 조직의 항산화 방어작용에 심각한 위협을 초래한다(Mujahid et al., 2007; Tan et al., 2010). 특히 열 스트레스에 의해 증가한 활성산소는 친염증 사이토카인 발생을 촉진하여 염증을 증가시키는 원인으로 알려져 있다(Lin et al., 2006; Tan et al., 2010). Bartlett and Smith(2003)는 열 스트레스에 의해 유발된 산화 스트레스는 항산화 방어기전을 방해하여 세포 면역 작용을 저해함으로써 가축에 심각한 건강 문제를 초래할 수 있다고 보고하였다. 따라서 육계 사육 시 고온 스트레스 환경에서 활성산소의 발생을 줄이고 면역 작용을 강화는 사양관리 방법이 매우 중요하다. 다양한 연구 결과 고온기에 항산화 물질을 급여하면 Interleukin(IL)-1 β , IL-6, Interferon(IFN)- γ , Toll like receptor(TLR)-4 등의 친염증 사이토카인과 Heat shock protein(HSP) 70 발현을 현저히 감소하는 것으로 보고되었다(Mahmoud et al., 2004; Panda et al., 2008; Jang et al., 2014). 생균제 급여 역시 항산화 물질처럼 육계에서 IL-1 β 와 nuclear factor- κ (NF- κ B)의 발현을 감소시키고 sIgA 분비량을 증가시키는 것으로 보고되었다(Rajput et al., 2013; Li et al., 2015). 이러한 이유로서 생균제는 육계의 위장관에서 유익균의 정착을 도와 점막 세포의 구조 안정화 및 면역 단백질 생성으로 염증 반응을 억제하기 때문인 것으로 보인다(Lee et al., 2014). 따라서 생균제의 항염증 작용은 체 조직의 항산화 방어작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 주목받고 있다. 동물에서 염증을 유발하는 과도한 산화적 스트레스가 발생하면 항산화 효소와 비효소적 항산화 물질에 의해 활성산소를 제거하는 항산화 방어체계가 작동한다(Espinosa-Diez et al., 2015). 효소적 항산화 방어작용은 SOD, GPX, catalase 및 GST 등이 체계적으로 작용하는 경로로서 특히 SOD는 체 조직에 널리 분포하며 O $_2$ 를 H $_2$ O $_2$ 로 전환하여 지질과산화물을 억제한다(Suari, 2003). GPX는 조직에서 생성된 H $_2$ O $_2$ 를 H $_2$ O로 전환하는 효소로서 지질과산화물의 생성을 억제하는 역할을 한다(Tappel et al., 1978). GST는 산화 스트레스로 발생한 대사산물을 제거하는 항산화 작용과 비극성 독성물질을 해독하는 역할을 동시에 수행하는 효소이다(Hayes et al., 2005).

지금까지 생균제의 항산화 작용과 관련된 연구 결과들을 살펴보면, 육계에게 생균제 급여는 체 조직에서 친염증 사이토카인의 발생을 감소시키고 SOD 등과 같은 항산화 효소의 발현을 증가하여 산화 스트레스로부터 체 조직을 보호하는 것으로 알려져 있다(Khan et al., 2019). 생균제 급여 시 특히 위장관에서 염증 발생이 상당히 완화되는 것으로 보고되고 있는데 이는 항산화 방어작용의 활성화와 관련이 있다(Ergine et al., 2016). Inatomi and Otomaru(2018)는 육계에게

생균제를 급여 시 소장 흡수세포의 형태적 개선, 장내 유익 미생물 정착 및 체 조직의 항산화력 증강 등 일련의 생리적 작용 효과가 있음을 증명하였다.

특히 고온 환경조건에서 육계에게 생균제 급여 시 간 조직의 SOD와 GPX 발현량의 증가와 지질과산화물의 감소와 동시에 IL-6, IL-10 등 친염증 사이토카인 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Khan et al., 2019). Mohammed et al.(2019)도 고온 스트레스에서 육계에게 생균제(*Bifidobacterium*, *L. spp*) 급여 시 혈장 GPX 활성도가 증가하여 고온에 따른 산화적 스트레스를 완화할 수 있음을 보고하였다. Ogbuagu et al.(2018) 역시 고온 스트레스에서 육계에게 생균제(*Saccharomyces cerevisiae*) 급여 시 혈장 SOD가 증가하고 지질과산화물(MDA)이 감소한다고 보고하였다. 그러나 Cramer et al.(2018)은 고온 스트레스에서 생균제(*B. subtilis*) 급여 시 육계의 근육에서 항산화 소거능은 증가하였지만, SOD, GPX와 CAT 활성도에서는 변화가 없음을 보고하였다. 이와 같은 다양한 연구 결과를 살펴보면 고온 사육환경에서 생균제 급여는 닭의 소화기관의 항산화 유지에 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

한편 생균제의 항산화 작용 효과에서 각 소화 장기별로 그 정도의 차이가 있는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 생균제 급여에 따라 혈액, 소장 및 간에서 항산화 방어 효과를 조사한 결과, 오직 소장 점막조직에서만 유효한 효과가 나타났다. Bai et al.(2018)은 육계에게 생균제(*B. subtilis*) 급여 시 소장 점막조직에서 SOD와 GPX 활성도가 증가하고 MDA 수준이 감소하는 것을 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. Wu et al.(2019) 연구 결과도 생균제(*L. plantarum*) 급여 시 소장 점막조직에서 CAT와 SOD 활성도가 증가하고 지질과산화물(MDA)은 감소하였고 혈장에서도 GPX는 증가하고 지질과산화물은 감소하였다. 또한 간 조직에서 항산화 효소들과 지질과산화물에는 차이가 없음을 보고하여 본 연구 결과와 부분적으로 일치하였다. 그러나 육계에게 생균제(*B. subtilis*) 급여 시 혈액과 간 조직에서 모두 SOD 및 GPX 수준의 증가와 MDA가 감소하였다는 보고(Gong et al., 2018)는 본 연구의 결과와 차이가 있었다. Shen et al.(2014) 역시 생균제(*L. plantarum*) 급여 시 육계의 혈장과 간에서 모두 GPX는 증가하고 지질과산화물은 감소하였다고 보고하였다.

생균제 급여가 체 조직에서 항산화 관련 지표에 영향을 미치는 또 다른 요인으로 생균의 종류와 더불어 유효 생균 숫자인 것으로 판단된다. Wang et al.(2020) 가금에게 *Bacillus* 속 생균제를 수준별(10^{3-9})로 급여한 결과 고수준의 생균제 급여군에서만 혈액의 총 항산화력이 증가하고 MDA 생성이 감소하는 결과를 얻었다. 본 연구에서도 0.5% 생균

제 급여 군에서만 소장 점막 조직의 항산화 방어 능력이 향상된 결과를 얻어 이러한 사실을 뒷받침한다. 열 스트레스에 노출된 닭의 위장관에서 미생물균총의 불균형이 초래될 가능성이 높다. 따라서 고온기에 생균제 급여가 위장관의 유해 세균을 억제하여 점막 세포의 항상성 기능을 증가시키는 것과 밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다. Chen et al.(2022)은 고온기에는 닭의 장관 내 유익균과 유해균의 불균형을 초래하여 소장 흡수 세포의 구조적 문제와 면역 저하를 유발할 수 있기 때문에 열 스트레스 저감 사료 첨가제로서 생균제는 매우 유용하다고 보고하였다. 지금까지의 연구에 의하면 생균제 급여가 닭의 항산화 방어작용에 미치는 효과는 사육환경, 유효 생균의 균주 종류 및 숫자, 사료 오염, 소화기관의 산화적 스트레스 반응 정도 등 다양한 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 보인다.

이상의 연구 결과를 종합하면 고온 환경에서 육계에게 0.5% 수준의 복합생균제 급여 시 소장 점막 조직의 SOD 활성도는 증가하고 지질과산화도는 감소하였다. 따라서 0.5% 복합생균제 급여는 육계의 소장 점막 조직의 항산화 방어력을 증가시켜 고온기에 소화 장기의 항산화에 유리한 사양 환경을 만들 수 있을 것으로 생각된다. 닭의 소화기관에서 효과적으로 항산화 방어 효과를 나타낼 수 있는 생균제의 작용 기전, 균의 종류 및 용량에 관한 지속적인 연구가 요구된다.

적 요

본 연구는 고온기 복합생균제(*L. plantarum*, *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*) 급여가 육계의 항산화 방어작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대조군(CON), 0.25% 생균제 급여군(LPB) 및 0.5% 생균제 급여군(HPB) 등 3 처리군으로 설정하여 혈장, 소장 점막 및 간 조직에서 항산화 지표를 분석하였다. 실험 결과, 혈장 total protein, albumin, blood urea nitrogen(BUN) 및 glutathione(GSH) 수준 등 질소화합물은 처리군 간 차이가 없었다. 혈장에서 조사한 항산화 효소 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX)와 glutathione S-transferase(GST) 및 지질과산화(MDA) 역시 생균제 급여에 따른 유의적 차이가 없었다. 소장 점막조직에서 SOD 활성도는 0.5% 생균제 급여군(HPB)에서 대조군과 LPB군 보다 유의하게($P<0.05$) 증가하였다. 소장 점막조직의 MDA 수준은 대조군보다 HPB군에서 현저하게($P<0.05$) 감소하였다. 그러나 소장 점막조직의 GPX와 GST 활성도는 생균제 급여에 따른 차이는 없었다. 간 조직에 존재하는 SOD, GPX, GST 활성도 및 MDA 수준은 생균제 급여

여와 급여 수준에 따른 영향을 받지 않았고 모든 군에서 비슷한 수준을 보였다. 따라서 HPB군의 소장 점막조직에서 SOD 활성도가 증가하고 지질과산화도가 감소하는 결과로 보아 고온기에 0.5% 생균제 급여는 육계 소장 점막조직의 항산화 방어작용에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 나타났다. (색인어 : 육계, 고온기, 생균제, 항산화 효소, 지질과산화)

사 사

본 연구는 경상국립대학교 동물생명산업센터와 고려산업(주)의 일부 지원하에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

ORCID

Kang-Min Seomoon <https://orcid.org/0000-0002-4537-9021>

In-Surk Jang <https://orcid.org/0000-0001-9021-8852>

REFERENCES

- Abdel-Moneim AE, Selim DA, Basuony HA, Sabc EM, Saleh AA, Ebeid TA 2020 Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* spores on growth performance, oxidative status, and digestive enzyme activities in Japanese quail birds. *Trop Anim Health Prod* 52(2):671-680.
- Aktas B, De Wolfe TJ, Safdar N, Darien BJ, Steele JL 2016 The impact of *Lactobacillus casei* on the composition of the cecal microbiota and innate immune system is strain specific. *PLoS One* 11(5):e0156374.
- Attia YA, Al-Khalafah H, Abd El-Hamid HS, Al-Harthi MA, Alyileili SR, El-Shafey AA 2022 Antioxidant status, blood constituents and immune response of broiler chickens fed two types of diets with or without different concentrations of active yeast. *Animals* 12(4):453.
- Bai K, Feng C, Jiang L, Zhang L, Zhang J, Zhang L, Wang T 2018 Dietary effects of *Bacillus subtilis fmbj* on growth performance, small intestinal morphology, and its anti-oxidant capacity of broilers. *Poult Sci* 97(7):2312-2321.
- Bai SP, Wu AM, Ding XM, Lei Y, Bai J, Zhang KY, Chio JS 2013 Effects of probiotic supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult Sci* 92(3):663-670.
- Bartlett JR, Smith MO 2003 Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poult Sci* 82:1580-1588.
- Bidlack WR, Tappel AL 1973 Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipid* 8(4):177-182.
- Chen Q, Wang Z, Shao D, Shi S 2022 Effects of heat stress on the intestinal microorganisms in poultry and its nutritional regulations: A review. *World's Poult Sci J* 78(4):935-952.
- Cramer TA, Kim HW, Chao Y, Wang W, Cheng HW, Kim YHB 2018 Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on meat quality characteristics of breast muscle from broilers exposed to chronic heat stress. *Poult Sci* 97(9):3358-3368.
- Dev K, Begum J, Biswas A, Kannoujia J, Mir NA, Sonowal J, Kant R, Narender T 2021 Dietary *Lactobacillus acidophilus* and mannan-oligosaccharides alter the lipid metabolism and health indices in broiler chickens. *Probiotics Antimicrob Proteins* 13(3):633-646.
- Ergine B, Aydin FA, Ergine T, Tanik C, Abbasoglu SD, Soysal FG, Keskin E, Celik A, Salman T 2016 Antioxidant effects of probiotics in experimentally induced peritonitis. *Surg Infect* 17(1):114-118.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P, Cadenas S, Lamas S 2015 Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 6:183-197.
- Gadde UD, Oh S, Lee Y, Davis E, Zimmerman N, Rehberger T, Lillehoj HS 2017 Dietary *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials alleviate LPS-induced intestinal immunological stress and improve intestinal barrier gene expression in commercial broiler chickens. *Res Vet Sci* 114:236-243.
- Gong L, Wang B, Mei X, Xu H, Qin Y, Li W, Zhou Y 2018 Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. *Anim Sci J* 89(11):1561-1571.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974 Glutathione S transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249(22):7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge JM 1990 The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280(1):1-8.

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR 2005 Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F 2011 An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J* 187(2):182-188.
- Inatomi T, Otomaru K 2018 Effect of dietary probiotics on the semen traits and antioxidative activity of male broiler breeders. *Sci Rep* 8(1):5874.
- Jang I, Ko Y, Moon YS, Sohn SH 2014 Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Aust J Anim Sci* 27(5):749-756.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S 1998 Growth performance, intestinal microbial population, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* culture. *Poult Sci* 77:1259-1265.
- Kabir SM 2009 The role of probiotics in the poultry industry. *Int J Mol Sci* 10:3531-3546.
- Khan AZ, Khan IU, Khan S, Afzal S, Hamid M, Tariq M, Haq IU, Ullah N, Khan MA, Bilal S, Huwang K, Liu R 2019 Selenium-enriched probiotics improve hepatic protection by regulating pro-inflammatory cytokines and antioxidant capacity in broilers under heat stress conditions. *J Adv Vet Anim Res* 6(3):355-361.
- Kim MJ, Jeon DG, Ahn HS, Yoon IG, Moon ES, Lee CH, Lim Y, Jang I 2020 Effects of probiotic complex on performance, blood biochemical and immune parameters, digestive enzyme activity, fecal microbial population and noxious gas emission in broiler chicks. *Kor J Poult Sci* 47(3):169-180.
- Kupfer D, Levin E 1972 Monooxygenase drug metabolizing activity in CaCl_2 -aggregated hepatic microsomes from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 47(3):611-618.
- Lee KW, Lillehoj HS, Jang SI, Lee SH 2014 Effects of salinomycin and *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses in broiler chickens. *Res Vet Sci* 97(2):304-308.
- Li HL, Li ZJ, Wei ZS, Liu T, Zou XZ, Liao Y, Luo Y 2015 Long-term effects of oral tea polyphenols and *Lactobacillus brevis* M8 on biochemical parameters, digestive enzymes, and cytokines expression in broilers. *J Zhejiang Univ Sci B* 16(12):1019-1026.
- Lin CW, Huang TW, Peng YJ, Lin YY, Mersmann HJ, Ding ST 2021 A novel chicken model of fatty liver disease induced by high cholesterol and low choline diets. *Poult Sci* 100(3):100869.
- Lin H, Decuypere E, Buyse J 2006 Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 144:11-17.
- Mahmoud KZ, Edens FW, Eisen EJ, Havenstein GB 2004 Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 137(1):35-42.
- Mohammed AA, Jiang S, Jacobs JA, Cheng HW 2019 Effect of a synbiotic supplement on cecal microbial ecology, antioxidant status, and immune response of broiler chickens reared under heat stress. *Poult Sci* 98(10):4408-4415.
- Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karádi I, Prohaszka Z, Rigo T Jr 2011 Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. *Clin Chim Acta* 412:1957-1962.
- Mujahid A, Akiba Y, Warden CH, Toyomizu M 2007 Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens. *FEBS Lett* 581:3461-3467.
- Nava GM, Bielke LR, Callaway TR, Castaneda MP 2005 Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev* 6(1):105-118.
- Ogbuagu NE, Aluwong T, Ayo JO, Sumanu VO 2018 Effect of fisetin and probiotic supplementation on erythrocyte osmotic fragility, malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity in broiler chickens exposed to heat stress. *J Vet Med Sci* 80(12):1895-1900.
- Panda AK, Ramarao SV, Raju MV, Chatterjee RN 2008 Effect of dietary supplementation with vitamins E and C on production performance, immune responses and antioxidant status of White Leghorn layers under tropical summer conditions. *Br Poult Sci* 49:592-599.
- Park JH, Kweon GR 2013 Clinical applications of antioxidants. *Hanyang Med Rev* 33:130-136.
- Puthongsiriporn U, Scheideler SE, Sell JL, Beck MM 2001 Effects of vitamin E and C supplementation on per-

- formance, *in vitro* lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poult Sci* 80:1190-1200.
- Rajput IR, Li LY, Xin X, Wu BB, Juan ZL, Cui ZW, Yu DY, Li WF 2013 Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poult Sci* 92(4):956-965.
- SAS 1996 User's Guide: Statistics Version 6.12 Ed. SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
- Shen X, Yi D, Ni X, Zeng D, Jing B, Lei M, Bian Z, Zeng Y, Li T, Xin J 2014 Effects of *Lactobacillus plantarum* on production performance, immune characteristics, antioxidant status, and intestinal microflora of bursin-immunized broilers. *Can J Microbiol* 60(4):193-202.
- Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ramasamy K, Sieo CC, Ho YW 2017 Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PLoS One* 12(5):e0175959.
- Song D, Li A, Wang Y, Song G, Cheng J, Wang L, Liu K, Min Y, Wang W 2022 Effects of synbiotic on growth, digestibility, immune and antioxidant performance in broilers. *Animal* 16(4):100497.
- Surai PF 2003 Natural antioxidant in avian nutrition and reproduction. Pages 1-25 In: *Antioxidant Systems in the Animal Body*. Nottingham University Press, Thrumpton, England.
- Tan GY, Yang L, Fu YQ, Feng JH, Zhang MH 2010 Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poult Sci* 89:115-122.
- Tappel AL 1978 Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth Enzymol* 52:506-513.
- Wang X, Farnell YZ, Peebles ED, Kiess AS, Wamsley KG, Zhai W 2016 Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. *Poult Sci* 95(6):1332-1340.
- Wang Y, Wang H, Wang B, Zhang B, Li W 2020 Effects of manganese and *Bacillus subtilis* on the reproductive performance, egg quality, antioxidant capacity, and gut microbiota of breeding geese during laying period. *Poult Sci* 99(11):6196-6204.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ 1987 The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924(3):408-419.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND 2004 Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134(3):489-492.
- Wu Y, Wang B, Zeng Z, Liu R, Tang L, Gong L, Li W 2019 Effects of probiotics *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in broilers. *Poult Sci* 98(10):5028-5039.

Received May. 8, 2023, Revised May. 30, 2023, Accepted Jun. 2, 2023