

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000750-01

Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용

Development and Application of Carnosine Enriched Animal Products.

연구기관

중 앙 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010년 12월 19 일

주관연구기관명 : 중 앙 대 학 교

주관연구책임자 : 백 인 기

연 구 원 : 남 궁 년, 신 광 석

연 구 원 : 박 광 월, 이 아 름

연 구 원 : 서 영 민, 김 찬 호

연 구 원 : 신 동 훈, 백 승 주

협동연구기관명 : 중 앙 대 학 교

협동연구책임자 : 어 중 혁

연 구 원 : 박 기 환, 박 윤 중

연 구 원 : 김 유 미, 김 승 기

연 구 원 : 방 미 경,

참 여 기 업 : (주) 이노바이오

제1세부과제

Carnosine 강화 축산물 생산과 실용 가능한 사료
배합비 개발

Development of Carnosine Enriched Animal
Products and Feed Formulation.

연구기관
중앙대학교

농림수산식품부

요 약 문

I. 제 목

Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Carnosine(β -alanyl-L-histidine)과 carnosine으로부터 유도되는 Anserine(β -alanyl-methyl-L-histidine)은 포유동물의 근육조직에서 발견되는 dipeptides이다. 이러한 dipeptides는 그 효과에 있어서 많은 연구가 이루어 졌으며 대표적인 기능으로는 항산화 능력, 혈관확장 작용, 효소들의 조절, 신경전달 물질의 역할과 같은 신체 여러 분야의 대사도우미 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 dipeptides중 carnosine의 중요성이 날로 더해지고 있는데 그 이유는 carnosine의 광범위한 항산화 능력을 통한 노화방지와 젊은 외모의 유지라는 큰 이슈와 더불어 현대의학으로도 완치가 어려운 알츠하이머와 같은 뇌질환의 예방에 효과가 있다는 것 때문이다. 이와 같은 carnosine의 효능은 glycation에 의한 유리기의 비정상적 세포 공격 방어, 젖산 축적 방지, 중금속이온의 Chelator, 유리기의 제거 등 다양하며 이는 모두 carnosine의 광범위한 항산화효과의 결과라고 사료된다. 축산물의 품질과 가격경쟁이 치열한 현 상황에 더하여 FTA 체결에 따른 외국산 축산물의 무차별 공격이 멀지 않은 시점에서 차별화 된 기능성 제품은 가장 큰 경쟁력이며 이미 이러한 노력들이 여러 곳에서 이루어지고 있다. 이러한 시대변화에 적응하기 위한 일환으로 carnosine 강화 축산물의 생산방법을 구상하게 되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도(2009)에는 육류내 carnosine과 유도체인 anserine의 함량 분석 방법 확립을 실시하였으며 carnosine합성 촉진을 위한 관련 효소의 catalyst규명을 실시하였다. 또한 계육내 carnosine함량을 증가시키는 사료(배합비)개발을 실시하였으며, carnosine강화 계육생산을 위해 육계실험을 실시하였다. carnosine강화 축산물(계육, 계란)의 관능적 품질특성 및 기호도 조사를 실시하였다. 그리고 계육으로부터 carnosine 추출법을 개발하기 위해 기존 OPA 유도체 방법에서 UV-dectector를 이용한 분석방법으로 변경하여 실시하였다. 2차년도(2010)에는 돈육내 carnosine함량을 증가시키는 사료(배합비)개발과 carnosine강화 돈육생산을 위해 양돈실험을 실시

하였으며, carnosine강화 축산물(돈육)의 관능적 품질특성 및 기호도 조사를 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1-1. 연구 개발 결과

1차년도

1차 육계실험에서 수준별 혈분에 이한 육계의 가슴, 다리 근육에서의 carnosine 함량에 있어서 처리별로 유의하지 않은 결과를 얻었지만 혈분 첨가에 의해 가슴근육에서 carnosine 함량이 높아지는 경향치를 보였다. anserine 함량의 경우 혈분의 증가에 따라 가슴 근육에서 유의하게 감소하였다. 섭취량에 있어서 유의적인 차이가 없었던 반면 증체량에 있어서는 혈분의 함량에 증가함에 따라 증체량도 증가되었다. 2차 실험에서는 각 처리의 사료에 iso-calorie, iso-pretein 을 고려하여 실험을 하였다. 이 결과 혈분 5% 수준에서 carnosine의 함량이 유의적으로 강화되었다. 혈분 10% 수준에서는 carnosine 함량 및 섭취량, 증체량이 심하게 감소하여 다량의 혈분으로 인한 영양적인 문제가 있음을 보였다. 반면, anserine은 혈분 10%수준에서 유의적으로 가장 높은 함량을 보였다. 2차 시험을 통해 carnosine 강화를 위해서는 혈분수준은 5%가 적당한 것으로 잠정 결론을 지었으며 그에 따라 3차 시험으로 혈분 5% 및 alanine, MgO의 효과검증 시험을 수행하였다. 3차 산란 노계실험의 결과 carnosine의 함량에 있어서 모든 처리구간에 유의적인 함량의 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 Basal+BM2.5+MgO 처리구를 제외한 나머지 동일한 처리구를 개별로 볼 때는 기간이 1주에서 5주로 증가할수록 carnosine 함량도 고도로 유의한 직선적 감소를 보였다. 이것은 carnosine 함량이 산란계의 노화가 심화될수록 감소한다는 결과를 나타냈다.

2차년도

앞선 1차년도의 양계시험의 결과를 가지고 혈분, histidine, β -alanine, MgO의 수준을 양돈을 이용하여 사양시험을 실시하였다. 증체량과 사료섭취량 그리고 사료효율은 phase 1(63kg시작시부터 83kg도달시)에서 모든 처리구들에서 유의적인 차이가 없었다. 그러다 phase 2(83kg시작시부터 105kg도달시)에서는 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보였다. phase 2에서 증체량의 경우 MgO를 급여한 처리구(BMF + MgO, BM + MgO)들이 급여를 안한 처리구들(BMF, BM)에 비교해 유의적으로 떨어지는 수치를 보였다. phase 1의 기간 동안에 혈분과 MgO를 공급하였을때 평균 일당 증체량의 경우 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 phase 2기간동안 혈분을 첨가한 처리구는 평균 일당 증체량이 유의적으로 증가하였다. 그러나 MgO의 효과

는 보이지 않았다. 수분 손실율과 pH값의 경우 모든 처리구에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 수분 손실율의 경우 대조구가 다른 처리구보다 높은 경향을 보였다. LD muscle의 pH값의 경우 처리구들간의 유의적 차이는 없었다. 그러나 BMF, BMF + MgO, BM처리구들은 시간이 지남에 따라 조금씩 감소하는 경향치를 보여주었다. 수분손실율과 pH값의 측정은 PSE(pale, soft, exudative)육 또는 RSE(red, soft, exudative)육을 알아보기위해 실시되었다. 이번 시험에 사용된 사료를 먹은 육성돈 샘플은 PSE 또는 RSE육이 아닌 것을 알수 있었다. 경도의 경우 대조구와 처리구들간에 유의적 차이가 없었다. 색도의 경우 CIE L* 의 경우 BMF 처리구에서 가장 낮게 나타났다. 또한 MgO를 첨가한 처리구들이 그렇지 않은 처리구에 비해 높은 수치를 나타냈다. CIE a*의 경우 T5처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. CIE b*의 경우 BM + MgO가 전기간 동안 높았으며 MgO의 첨가 효과를 보여주었다. LD muscle의 carnosine과 anserine함량은 모든 처리구들 사이에서 유의적으로 차이가 없었다. 그러나 대조구에 비해 처리구들이 높은 경향치를 보였다. 특히 LD muscle의 carnosine함량이 BM, BM + MgO처리구가 높은 경향치를 보였다. carnosine함량의 경우 VI muscle보다 LD muscle이 높은 것으로 보였다. 그러나 anserine의 경우 반대의 성향을 보였다. 결과적으로 돼지의 LD muscle과 VI muscle에서의 carnosine함량은 혈분 또는 혈분과 MgO를 함께 첨가한 처리구에서 LD muscle안에 carnosine이 linear하게 증가했다는 것을 알수 있었고 anserine의 경우 MgO의 고급효과가 VI muscle에 영향을 주었다는 것을 알 수 있었다.

1-2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

본 연구 결과 항산화 능력을 통한 노화방지, 근육피로의 개선, 뇌질환 예방 등의 작용을 하는 carnosine이 강화된 축산물을 사료 영양학적으로 생산하는 기술이 확립됨으로 인해 carnosine의 추출과 정제기술의 개발으로 carnosine 강화 기능성 축산물 생산 및 브랜드화로 부가가치를 높이고 수입축산물에 대응할 수 있는 기반을 마련해 농가 수익이 증대될 것으로 사료된다.

SUMMARY

I . Title

Development and Application of Carnosine Enriched Animal Products.

II . Objectives

Carnosine (beta-alanyl-L-histidine) is a dipeptide of the amino acids; β -alanine and histidine. It is highly concentrated in muscle and brain tissues. Carnosine was identified by the Russian biochemist Vladimir Gulevich in 1900, when he was looking for unidentified nitrogen-containing compounds in meat extract. Accordingly, he named the discovered molecule carnosine ('carnis' is Latin for meat/fish). It has subsequently been found to be widely distributed in animal tissues. Some tissues of many vertebrates, including mammals, also contain other aminoacyl-histidine dipeptides; anserine (β -alanyl-L-1-methylhistidine) and homocarnosine (γ -aminobutyryl-L-histidine). β -Alanyl-L-3-methylhistidine has been described in snake and whale muscle, referred to as ophidine or balenine. In some species, the muscle tissue contains only one type of dipeptide, such as frog (only carnosine) and in trout (only anserine). Thus, since the occurrence of these molecules (dipeptides, β -alanine and histidine) in skeletal muscle is highly variable among species. Carnosine has various physiological functions, the first reference to the biological significance of carnosine as an effective biological pH buffer was made by Smith. He noticed that the pK values of carnosine (6.9) and anserine (7.1) indicate that these compounds are ideal buffers at physiological pH. He also demonstrated that 40% of the buffer capacity of fast twitch muscle was due to these dipeptides. The buffering capacity of muscle has been correlated with carnosine concentrations in horse, dog and human, buffering capacity of these dipeptides could explain why higher concentrations were found in white muscle fiber where anaerobic metabolism was common. It described the first clear function of carnosine as a pH buffer in muscle. Using isolated frog muscle, they demonstrated that in the presence of carnosine, the muscle could accumulate large amounts of lactate without obstruction but in the absence of carnosine, lactate causes dramatic acidification of the tissue, thus inducing contraction. Recently, many researchers have been

studied that of carnosine's multifunctional roles; antioxidants, metal-complexing agent, protectors of proteins from modification and neuromediators.

III. Contents and Scopes of Studies

In the first year of the project (2009), development of carnosine and anserine enriched in broiler meat. study of carnosine and anserine to LC condition. establish of carnosine, compare to carnosine physiology active. In the second year(2010), Development of Carnosine Enriched pork.

IV. Results and Recommendation

The first year's study, research was to evaluate the effects of dietary supplementation of blood meal (**BM**) and magnesium (**Mg**) on carnosine (**L-Car**) and anserine (**L-Ans**) content in the chicken breast muscle (**CBM**). In Experiment 1, 384 Ross[®] broiler chicks 1-d of age were assigned to 3 dietary treatments: 100% basal diet(**BM-0**), 95% basal diet + 5% BM (**BM-5**), and 90% basal diet + 10% BM (**BM-10**). Each treatment had 8 replications, and 16 broilers (8 males + 8 females) were assigned to each replication. In Experiment 2, 144 hatched Ross[®] broiler chicks were fed BM-treated diets, including 0% BM(**BMI-0**), 5% BM (**BMI-5**), and 10% BM (**BMI-10**) with isocalorie and isonitrogen adjustment. Each treatment had 3 replications of 16 broilers each. Broilers were reared in stainless steel cages for 5 wks. In Experiment 1, the content of L-Car linearly ($P<0.01$) increased at wks 4 and 5 as the level of BM increased but there was no significant difference between BM-5 and BM-10 treatments. Conversely, the content of L-Ans linearly ($P<0.01$) decreased at wks 1, 3, 4, and 5 as the level of BM increased. In Experiment 2, L-Car showed a highly significant ($P<0.01$) \cap -shaped quadratic response at wks 1, 3, and 5. The content of L-Ans showed significant ($P<0.05$) U-shaped quadratic response at wks 3 and 5. The growth performances were not significantly affected by treatments in Experiment 1; in Experiment 2, however, a linear decrease ($P<0.01$) in feed intake and weight gain, and a linear increase ($P<0.01$) in feed conversion ratio were observed as the BM was increased. In conclusion, addition of 5% BM and Mg in broiler diet increases the L-Car but not L-Ans in CBM.

Experiment 3, A 32 day feeding trial was conducted to evaluate the effects of

blood meal and MgO supplementation on carnosine and anserine content in broiler breast muscle. Two hundred ten hatched broiler chicks (Ross[®]) were randomly allocated to completely randomized block arrangement of seven diets: C, control diet; His, control diet + histidine; β -Ala, control diet + β -alanine; His + β -Ala, control diet + histidine + β -alanine; His + β -Ala + MgO, control diet + histidine + β -alanine + MgO; BM, control diet(95%) + bloodmeal(5%); BM + MgO, control diet(95%) + bloodmeal(5%) + MgO. Histidine, β -alanine and MgO were supplemented at a level 2.9 g/kg, 3.7 g/kg and 4 g/kg diet, respectively. Weight gain, feed conversion rate and mortality were not significantly different among treatments in all experimental period. Feed consumption of His treatment was significantly ($P < 0.05$) higher than other treatments. Carnosine content of broiler breast muscle was significantly ($P < 0.05$) different, all treatments were increased with the passing of time, and especially His + β -Ala treatment was the highest ($P < 0.05$) among treatments in each period (except 32 d), also carnosine, anserine and the sum of carnosine and anserine showed significant ($p < 0.0001$) linear increase as the bird aged in all treatments. Magnesium supplementation effect was appeared that about 1.5% (His + β -Ala vs His + β -Ala + MgO) and 3.1% (BM vs BM + MgO) increased, respectively at 32 d. Anserine content was not significantly different since then 21 d and shown to different trend compared with carnosine content. Anserine levels were about 3 times higher than carnosine levels in each week.

In conclusion, growth performance was not influenced by blood meal and MgO supplementation except feed intake. Carnosine content was increased by blood meal supplementation, but anserine content was not affected. Magnesium supplementation slightly increased the carnosine, but the effect was inconsistent in anserine content in tested meats.

CONTENT

Chapter 1 Outline of research and development project

Part 1. Purposes and scopes of reaserch-----	13
1. Necessity of reaserch -----	13
Part 2. Puropses and contents of reaserch -----	14
1. The First year (2009) -----	14
2. The Second year (2010) -----	14

Chapter 2 Current situation of technology development related to the project

1. Carnosine -----	15
2. Components of carnosine -----	17
A. Histidine -----	17
B. β -alanine -----	19
3. Carnosine's metabolism -----	19
4. Carnosine's physiologic function -----	21
A. Antioxidative Potential and Metal-Chelation -----	22
B. Anti-Aging and Antiglycation Effect -----	22
C. Therapeutic Effect -----	26

Chapter 3 Result of research

Part 1. Content of carnosine and anserine in the meat of broilers fed blood meal supplemented diets-----	29
1. First broiler test -----	29
A. Introduction -----	29
B. Material and methods -----	30
(1) Experimental design and diets -----	30
(2) Performance -----	31
(3) Samples preparation -----	31
(4) Analytical reagent -----	31
(5) HPLC system -----	31
(6) Statistical analysis -----	31
C. Results -----	32
(1) Performance -----	32
(2) Content of carnosnie and anserine in the broiler meat -----	32
D. Discusion -----	32
2. Second broiler test -----	35
A. Introduction -----	35

B. Material and methods	-----	35
(1) Experimental design and diets	-----	35
(2) Performance	-----	35
(3) Samples preparation	-----	35
(4) Analytical reagent	-----	36
(5) HPLC system	-----	36
(6) Statistical analysis	-----	36
C. Results	-----	36
(1) Performance	-----	36
(2) Content of carnosine and anserine in the broiler meat	-----	36
D. Discussion	-----	36
3. Third broiler test	-----	46
A. Introduction	-----	46
B. Material and methods	-----	46
(1) Experimental design and diets	-----	46
(2) Performance	-----	46
(3) Samples preparation	-----	46
(4) Analytical reagent	-----	47
(5) HPLC system	-----	47
(6) Statistical analysis	-----	47
C. Results	-----	47
(1) Performance	-----	47
(2) Content of carnosine and anserine in the broiler meat	-----	48
D. Discussion	-----	48
Part 2. Effect of supplementary blood meal on the carnosine content, performance and egg qualities of old laying hens	-----	55
A. Introduction	-----	55
B. Material and methods	-----	55
(1) Experimental design and diets	-----	55
(2) Performance	-----	55
(3) Egg quality	-----	55
(4) Samples preparation	-----	56
(5) Analytical reagent	-----	56
(5) HPLC system	-----	56
(6) Statistical analysis	-----	56
C. Results	-----	57
(1) Performance	-----	57
(2) Egg quality	-----	57
(2) Content of carnosine and anserine in the breast meat	-----	57
D. Discussion	-----	57

Part 3. Content of carnosine and anserine in the meat of pigs fed blood meal supplemented diets-----	63
A. Introduction -----	63
B. Material and methods -----	63
(1) Experimental design and diets -----	63
(2) Meat quality -----	63
(3) Samples preparation -----	64
(4) Analytical reagent -----	64
(5) HPLC system -----	64
(6) Statistical analysis -----	64
C. Results -----	65
D. Discussion -----	65
Chapter 4 Achievements of aims and contribution to related areas	
Part 1. Aims, scope and evaluation point of research -----	76
1. Aims of research-----	76
2. Aims and scope of research-----	76
3. The point of research's evaluation -----	77
Chapter 5 Application of result	
1. The R&D result -----	78
Chapter 6 References -----	79
The 2nd Sub Reaserch Project -----	91

목 차

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적과 범위 -----	13
1. 연구개발의 필요성 -----	13
제2절 연구개발의 목표 및 내용 -----	14
1. 제1차년도 (2009) -----	14
2. 제2차년도 (2010) -----	14

제2장 국내외 기술개발 현황

1. Carnosine -----	15
2. Carnosine의 구성성분 -----	17
가. Histidine -----	17
나. β -alanine -----	19
3. Carnosine의 대사 -----	19
4. Carnosine의 생리학적 기능 -----	21
가. Antioxidative Potential and Metal-Chelation -----	22
나. Anti-Aging and Antiglycation Effect -----	25
다. Therapeutic Effect -----	26

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 혈분의 급여가 육계 계육의 carnosine과 anserine함량에 미치는 영향 -----	29
1. 1차 육계 시험 -----	29
가. 서론 -----	29
나. 재료 및 방법 -----	30
(1) 시험 구성 및 분석항목 -----	30
(2) 생산성 -----	31
(3) 재료의 전처리 -----	31
(4) 분석 시약 -----	31
(5) HPLC 분석 -----	31
(6) 통계 분석 -----	31
다. 결과 -----	32
(1) 생산성 -----	32
(2) 계육 내 carnosine, anserine 함량 -----	32
라. 고찰 -----	32
2. 2차 육계 시험 -----	35
가. 서론 -----	35
나. 재료 및 방법 -----	35

(1) 시험 구성 및 분석항목 -----	35
(2) 생산성 -----	35
(3) 재료의 전처리 -----	35
(4) 분석 시약 -----	36
(5) HPLC 분석 -----	36
(6) 통계 분석 -----	36
다. 결과 -----	36
(1) 생산성 -----	36
(2) 계육내 carnosine, anserine 함량-----	37
라. 고찰 -----	37
3. 3차 육계 시험 -----	46
가. 서론 -----	46
나. 재료 및 방법 -----	46
(1) 시험 구성 및 분석항목 -----	46
(2) 생산성 -----	46
(3) 재료의 전처리 -----	46
(4) 분석 시약 -----	47
(5) HPLC 분석 -----	47
(6) 통계 분석 -----	47
다. 결과 -----	47
(1) 생산성 -----	47
(2) 계육내 carnosine, anserine 함량 -----	48
라. 고찰 -----	48
제2절 혈분의 급여가 산란 노계의 생산성과 난품질, carnosine함량에 미치는 영향 -55	
가. 서론 -----	55
나. 재료 및 방법 -----	55
(1) 시험 구성 및 분석항목 -----	55
(2) 산란율, 난중, 연파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율 -----	55
(3) 난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit -----	55
(4) 재료의 전처리 -----	56
(5) 분석 시약 -----	56
(6) HPLC 분석 -----	56
(7) 통계 분석 -----	56
다. 결과 -----	57
(1) 산란율, 난중, 연파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율 -----	57
(2) 난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit -----	57
(3) 계육 내 carnosine, anserine 함량 -----	57
라. 고찰 -----	57
제3절 혈분의 급여가 돈육내 carnosine과 anserine 함량에 미치는 영향 -----	63

가. 서론 -----	63
나. 재료 및 방법 -----	63
(1) 시험 구성 및 분석항목 -----	63
(2) 돈육품질(pH, 색도, 경도, 수분손실율) -----	63
(3) 재료의 전처리 -----	64
(4) 분석 시약 -----	64
(5) HPLC 분석 -----	64
(6) 통계 분석 -----	64
다. 결과 -----	65
라. 고찰 -----	65

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점 -----	76
1. 연구개발 목표 -----	76
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 범위 -----	76
3. 연구평가의 착안점-----	77

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발과제의 연구 성과 -----	78
------------------------	----

제6장 참고문헌 -----79

제2 세부과제 -----91

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 필요성

Carnosine (β -alanyl-L-histidine) 과 carnosine으로부터 유도되는 Anserine (β -alanyl-methyl-L-histidine)은 포유동물의 근육 조직에서 발견되는 dipeptides이다. 이러한 dipeptides는 그 효과에 있어서 많은 연구가 이루어 졌으며 대표적인 기능으로는 항산화 능력, 혈관확장 작용, 효소들의 조절, 신경전달 물질의 역할과 같은 신체 여러 분야의 대사도우미 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 dipeptides중 carnosine의 중요성이 날로 더해지고 있는데 그 이유는 carnosine의 광범위한 항산화 능력을 통한 노화방지와 젊은 외모의 유지라는 큰 이슈와 더불어 현대의학으로도 완치가 어려운 알츠하이머와 같은 뇌질환의 예방에 효과가 있다는 것 때문이다.

이와 같은 carnosine의 효능은 glycation에 의한 유리기의 비정상적 세포공격 방어, 젖산 축적 방지, 중금속 이온의 Chelator, 유리기의 제거등 다양하며 이는 모두 carnosine의 광범위한 항산화효과의 결과라고 사료된다. 축산물의 품질과 가격경쟁이 치열한 현 상황에 더하여 FTA 체결에 따른 외국산 축산물의 무차별 공격이 멀지 않은 시점에서 차별화 된 기능성 제품은 가장 큰 경쟁력이며 이미 이러한 노력들이 여러 곳에서 이루어지고 있다. 이러한 시대변화에 적응하기위한 일환으로 carnosine 강화 축산물의 생산방안에 대한 연구의 개발이 필요하다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 제 1차 년도 (2009)

- 혈분 및 MgO, Histidine, β -Alanine 등의 carnosine, anserine 합성 효과를 알아보기 위해 다양한 처리를 구성하여 실험 실시.

실험 1. 혈분의 급여가 계육의 carnosine과 anserine 함량에 미치는 영향

연구목적 : 수준별 혈분에 의한 육계의 가슴, 다리 근육에서의 carnosine 함량을 처리별로 육계의 생산성에 미치는 영향을 검정하기 위한 사양실험 실시.

실험 2. 혈분급여시 iso-calorie, iso-protein 을 고려한 사료를 이용한 실험.

연구목적 : 1차 실험에서 수준별 유의적 차이가 확인하지 않아 혈분 수준을 다시 구성하고 사료배합시 iso-calorie, iso-protein 을 고려하여 carnosine함량과 육계의 생산성에 미치는 영향을 검정하기 위한 사양실험 실시

실험 3. 효과적인 carnosine 합성 촉매의 수준 및 종류의 검증

연구목적 : β -alanine, MgO의 효과 및 다양한 가능성을 비교하기 위한 처리 구분의 육계 시험 실시

실험 4. 혈분의 급여가 산란 노계의 생산성과 난품질, carnosine함량에 미치는 영향

연구목적 : 혈분과 마그네슘의 수준별 첨가에 따른 산란 노계의 가슴근육내 carnosine증가효과를 검증하며 동시에 생산성 및 난품질에 미치는 영향을 검정하기 위한 사양실험 실시

2. 제 2차 년도 (2010)

- 돼지의 근육 내 carnosine, anserine 함량 측정

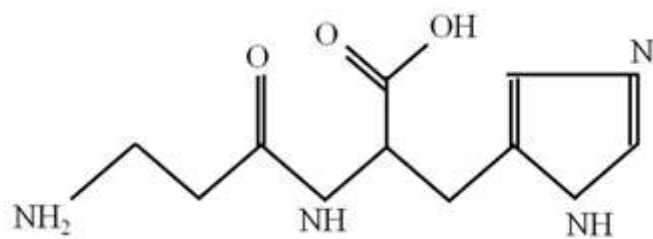
실험 1. carnosine이 강화된 돈육 생산

연구목적 : carnosine이 강화된 돈육 생산과 실용 가능한 사료 배합비를 개발하기 위한 실험 실시.

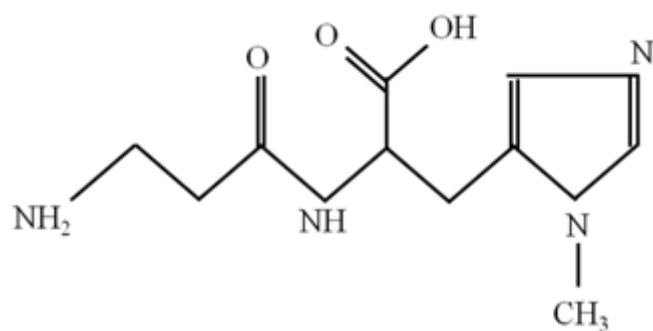
제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. Carnosine

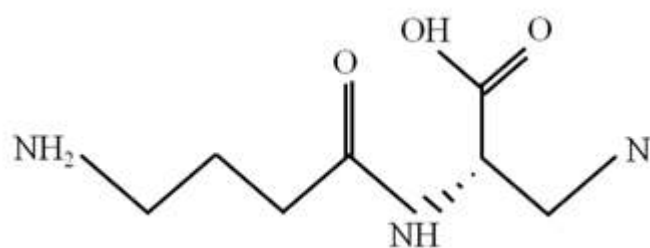
Carnosine(β -alanyl-L-histidine)은 β -alanine과 histidine 로 구성된 dipeptide이다. 이것은 근육과 뇌의 조직과 근육에 농축되어 있다. Carnosine은 고기에서 정의되지 않은 질소를 포함하는 화합물을 찾은 러시아 화학자 Vladimir Gulevich가 1900년에 처음으로 정의하였다. 따라서 그는 발견된 물질을 carnosine('carnis'는 라틴어로 고기와 물고기라는 의미)이라고 명명하였다. 이것은 결과적으로 동물의 조직에서 널리 분포되어있는 것을 발견하였다(Crush, 1970). 포유류를 포함하는 많은 척추동물의 조직에서는 또한 다른 aminoacyl-histidine dipeptides를 포함하고, 그 dipeptides는 anserine(β -alanyl-L-methylhistidine)과 homocarnosine(γ -aminobutryl-L-histidine)으로 되어 있다. 뱀과 고래의 근육안에 있는 β -Alanyl-L-3-methylhistidine은 ophidine 또는 balenin 으로서 묘사되어 진다(Figure A-1). 어떤 동물의 경우, 근육 조직에서는 오직 dipeptide의 한 형태만을 포함하고 있다(개구리는 오직 carnosine 형태; 송어). 따라서, 골격근 안에서 이 분자들(dipeptides, β -alanine과 histidine)의 발생은 종(species)에 따라 매우 다르다(Tamaki et al., 1976). Carnosine은 다양한 생리적인 역할을 가지고 있고, 첫 번째로 언급되는 것이 carnosine의 생물학적 의미인데, Smith(1938)에 의해 만들어진 효과적인 생물학적 pH buffer로서의 역할이다. 그는 carnosine(6.9)과 anserine(7.1)의 pK value는 이 화합물들이 생물학적 pH의 측면에서 보면 이상적(ideal)인 buffers인 것을 나타내는 것에 주목하였다. 그는 또한 백색근(fast twitch muscle)의 buffer량의 40%는 이 dipeptides에서 기인한다고 하였다. 근육의 buffering량은 말, 개, 그리고 사람에서 carnosine 함량과 연관성이 있고, 이 dipeptides의 buffering량은 왜 백색근섬유(white muscle fiber)에서 발견 되어 높게 농축되는지와 일반적으로 혐기적 대사 과정의 어디에서 일어나는 지에 대해 설명하고 있다. Severin et al.(1953)은 최초로 근육에서의 pH buffer로서의 carnosine의 명백한 기능을 설명하였다. 개구리 근육으로부터 carnosine을 분리하여 존재를 확인하였고, 그 근육은 carnosine의 부재에는 방해가 없는 젖산의 상당량이 축적되어 있었고, 젖산은 조직의 급격한 산성화를 야기하였으며, 따라서 근육의 수축을 유도하였다. 최근, 많은 연구자들은 항산화(antioxidant), 금속 복합제(metal complexing agent), modification과 신경전달물질(neuromediators)로 부터의 단백질을 보호하는 등 carnosine의 다기능적 역할에 관해 연구를 하고 있다.



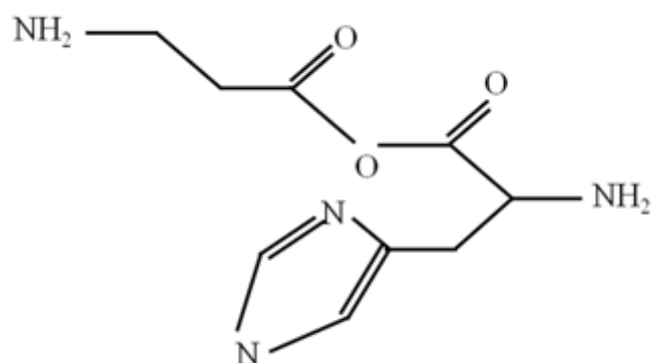
Carnosine



Anserine



Homocarnosine



Balenine (Ophidine)

Figure A-1. Structures of carnosine and carnosine-related dipeptides

2. Carnosine 의 구성성분

가. Histidine

Histidine은 일반적으로 자연에 존재하는 20개의 아미노산(amino acids) 중 하나이다. Histidine은 준 필수 아미노산으로 분류되지만, 어린이에게는 필수 아미노산으로 여겨진다. Histidine 조직의 성장과 재생, 궤양(ulcers), 위산과다증(hyperacidity), 소화액과 위액을 조절, 그리고 백혈구와 적혈구를 생산 하는데 중요한 역할을 한다. Histidine은 사람의 식품에서는 고기, 닭, 생선, 유제품, 쌀, 호밀 그리고 밀이 있고 동물의 사료에서는 혈분이 주된 원료원이다(Table 1). Histidine의 구조는 Figure 2와 같다. Histidine의 결사슬은 이온화된 이미다졸 고리(imidazole ring)을 포함한다. 이미다졸은 헤테로고리화합물(heterocyclic)로 방향성 유기 화합물이다. 그것은 더 나아가 알칼로이드(alkaloid)로 분류된다. 이미다졸은 화합물 $C_3H_4N_2$ 로 나타내는 반면, 그러나 다양한 치환기를 제외한 유사링(similar ring)의 구조를 가지는 헤테로고리화합물에 속한다. 이 링(ring) 계통은 histidine과 그 연관된 호르몬 histamine 중요한 생물체의 구조 블록(block)에서 존재하고 있다. 이미다졸은 염기와 약산으로서 작용을 할 수 있다. Histidine(pKa 6.1)의 이미다졸 링은 좋은 pKa이고 생물학적인 범위에서의 pH buffer로서의 역할을 한다. 그 pKa는 산의 해리를 지속하고, 이것은 근세포의 생리적인 pH 범위(6.5~7.1)안에서 이상적이다. 그래서 이것은 수축이 유도된 산독증에 걸려있는 동안 양자를 동력학적이게 수용하게 된다. Histidine이 β -alanin으로 될 것 같을 때, histidine의 pKa는 6.8로 조금 증가하고, 수축중이고 피로한 근세포(myocytes)의 pH 범위 안에 들어있게 된다. 이미다졸은 두 개의 호변체(tautomeric)를 가지고 있으며 수소(H)원자는 두 개의 질소(N)사이로 이동하게 된다. 많은 약들은 이미다졸 링을 포함하는데, 항곰팡이제와 니트로 이미다졸(nitroimidazole)이 있다.

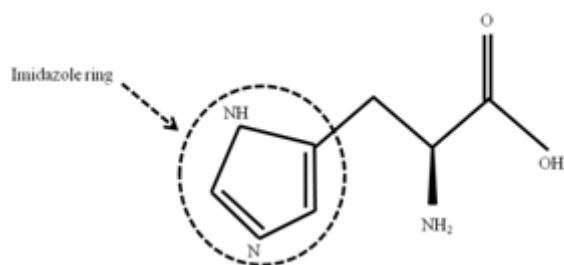


Figure B-1. Structure of histidine

Table B-1. Histidine composition of some commonly used feedstuffs.

Ingredients	Crude protein, %		Histidine, %	
	NRC ¹	Feedstuffs ²	NRC	Feedstuffs
Blood meal	86.0	80.0	5.18	3.05
DDGS ³	27.0	27.0	0.64	0.65
Corn gluten meal, 60%	61.2	60.0	1.40	1.20
Cottonseed meal, solvent	41.7	41.0	1.01	1.10
Feather meal, poultry	84.9	85.0	0.47	0.78
Fish meal, anchovy	65.5	65.0	1.60	1.50
Fish meal, menhaden	61.2	62.0	1.44	1.52
Meat and bone meal, 50%	50.9	50.0	0.96	0.96
Meat meal, 55%	55.6	55.0	1.04	1.10
Peanut meal, solvent	49.0	47.0	1.46	1.00
Rapeseed meal, solvent	38.0	36.0	1.07	0.95
Rye, grain	12.0	12.6	0.24	0.27
Skim milk, dried	33.3	33.0	0.86	0.84
Soybean meal, solvent	44.0	44.0	1.12	1.10
Wheat bran	15.5	14.8	0.33	0.30
Whey, dried	13.3	12.0	0.17	0.20
Yeast, brewer's, dried	43.8	45.0	1.13	1.30

¹Nutrient requirements of swine, 1998.

²Feedstuffs, 2009.

³Distiller's dried grains with soluble, corn.

나. β -alanine(beta-alanine)

β -alanine은 비필수아미노산이고 오직 자연발생적으로 나타나는 β -아미노산이다. 일반적인 상대적인 것과는 다르게, α -alanine과 β -alanine은 키랄(chiral) 중심을 가지고 있지 않다. β -alanine은 어떤 주된 단백질이나 효소의 생합성에 사용되지 않는다. 이것은 uracil과 carnosine의 degradation에 의한 in vivo 에서 형성된다. 이것은 자연발생적으로 peptide carnosine과 anserine의 구성물이고 또한 panthothenic acid의 자체 coenzyme A의 구성성분이기도 하다. Histidine은 pK 6.1에서는 생리학적으로 근육 내의 비교적 약한 buffer이다. 그러나, 다른 아미노산과 결합할 때 이것은 거의 6.8~7.0까지 증가한다. 특별히, β -alanine이 결합되었을 때 pK 값은 6.8이고, 이것은 매우 효과적인 근육내의 buffer이다. β -alanine의 자연적으로 음식을 섭취한 것은 직접적으로 β -alanine을 섭취한 것보다 β -alanine을 포함한 dipeptides(carnosine, anserine, and balenine)의 양이 더 많다. 이 dipeptides는 닭, 소, 돼지, 생선과 같은 단백질이 풍부한 식품에서 발견된다. β -alanine은 carnosine의 합성의 rate-limiting step이다(Dunnett and Harris, 1999; Bakardijiev and Bauer, 1994; Bauer and Schulz, 1994). 많은 연구에서는 β -alanine을 공급하여 사람(Harris *et al.*, 2006)과 다른 동물들(Tomonaga *et al.*, 2005, 2006)에서 근육에서 carnosine의 농도가 증가하는 것을 발표했다. β -alanine은 골격근육 내에 carnosine 함량을 증가시키는 것에 관한 연구(특별히 백색 근섬유에서 높게 나옴) 이후로 이것은 β -alanine을 첨가하면 혐기적인 성능을 목적으로 할 수 있다는 가설을 세우게 되었다. 사실상, 많은 연구자들(Suzuki *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2007)은 β -alanine을 첨가에 따른 근육의 carnosine 함량과 고 강도의 운동능력 효과에 관해 연구하기도 하였다. 이것은 결과는 매우 긍정적이었다. 최근, 건강보조식품으로 다양하게 β -alanine이 건강을 위해 사용되어 지고 있다.

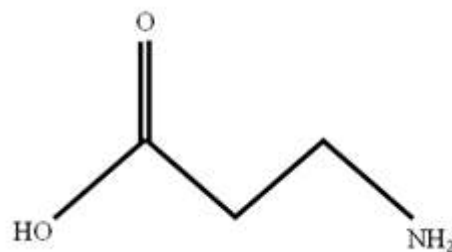


Figure B-2. Structure of β -alanine

3. Carnosine의 대사

carnosine은 신체 내에서 수용성 질소를 포함한 화합물의 중요한 부분을 구성하고 있다. Carnosine은 식물과 무척추동물에서는 존재하지 않는 반면 동물계에서 높은 양이 나타나고 있으며, 서로 다른 척추동물 간의 근육 안의 양은 다양한 양을 나타내지만 심장과 민무늬근(smooth muscle)에서는 존재하지 않는다. 골격근은 인체내

에서 carnosine을 위한 주된 저장과 생성을 하는 곳이며, 대부분 몸의 carnosine의 99%가 골격근에 존재하게 되는데, 근육계는 크기가 다른 조직에 비해 크기 때문에 carnosine의 농도를 다른 carnosine을 포함하는 뇌와 같은 조직에 비교시에 더 많이 함유하게 된다(근육계는 체중의 40~50%를 차지). Carnosine은 사람에 근육에서는 오직 histidine을 함유한 dipeptide(HCD; Histidine containing dipeptide)인 반면, 다른 동물/포유류에서는 또한 carnosine의 methylated 유사체, 이름하여 anserine과 balenin/ophidine을 포함하기도 한다. 전체 근육 내 HCD의 구성은 다르며, 인간의 경우 the middle에 있기도 한다. 지구력을 필요로 하는 운동을 하는 비둘기나 철새의 경우에는 HCD가 낮은 농도를 나타내는 반면, 급격하게 힘을 쓰는 단거리 달리기 하는 동물(닭, 그레이하운드, 서러브레드 말)의 경우는 현저하게 높게 나타나게 된다. Carnosine 대사 작용을 포함하는 주된 pathways는 합성과 가수분해이고, 각각 아미노산에서 아미노산으로 이어진다(Figure C-1). β -alanine과 histidine의 효소적 압축은 carnosine synthetase에 의해 촉진된다. Carnosine synthetase의 높은 활성은 골격근(Abe, 2000)과, 후각신경구(Horinishi *et al.*, 1978)와 같은 뇌의 특별한 부분에서 발견되어져왔다. β -alanine은 carnosine합성의 rate-limiting의 전구물질로 고려되어진다. β -alanine은 섭취된 육류나 생선으로부터 추출된 dipeptides의 가수분해를 통해 그리고 간에서 uracil과 thiamine의 degradation을 통해 얻을 수 있다. 합성된 carnosine은 가수분해되지 않은 형태의 intact한 형태로 장에서 흡수어간이나 신장에 도달하게 된다(Hama *et al.*, 1976). 순환되는 carnosine의 농도는 육류내에 포함된 HCD의 섭취량에 따라 때로는 평가되어지기도 한다(Gargner *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2005). 대부분의 dipeptide는 혈청 carnosine에서 몇분에서 몇시간 안에 가수분해되어지지만, carnosine degradation의 과정이나 축적시간에 대해서는 거의 알려진 것이 없다. Carnosine breakdown은 주로 조직 carnosinase(EC 3.4.13.3)에 기인하여 이루어지고, 이것은 다른 대상들(Jackson *et al.*, 1991) 또는 혈청 carnosinase(EC 3.4.13.20)간에 넓게 분포되고, 사람과 영장류의 뇌와 혈액의 혈장에서 존재하게 된다(Lenny, 1990). Carnosinase들은 anserine 또는 homocarnosine과 비교시에 carnosine에 대해 높은 활성을 나타냈다(Lenny *et al.*, 1982). 혈청 carnosinase는 사람에서 높은 활성을 가지고, carnosine의 수준이 혈액 내에서 골격근육보다 매우 낮은 이유이며, 이 효소는 반대로 존재하지 않으면(Gardner *et al.*, 1991), 설치류와 같은 다른 포유류의 경우 혈청 carnosinase가 결핍되면 혈액내의 carnosine의 상당량을 포함하게 된다. 조직 carnosinase은 인체의 carnosine의 degradation을 위한 것은 양적으로 거의 중요성을 가지지않는다. 소장에서는 carnosine을 위한 체계를 포함하고 있어서 장에서 혈류로 운반을 하게 된다. Carnosine은 intact dipeptide로서 혈장 막을 proton-coupled oligotransporters(POT; PEPT1, PEPT2, PHT1 and PHT2)로 통과하게 되고, POTs는 peptide-bound 아미노질소(amino nitrogen)의 흡수와 재흡수에 중요한 생리적 역할을 가지고 있다(Ferraris *et al.*, 1988). 소장을 통한(주된 곳은 공장, jejunum) carnosine 흡수는 섭

취하는 단백질의 수준에 따라 증가하고, 이것의 결과는 carnosine transporter의 증가에 기인하여 가능하게 된다(Ferraris et al., 1988). Carnosine 대사(synthesis, degradation, release)의 근육의 수축성의 활성과 운동에 따라 증가하는 증거를 볼 수 있다. Nagai et al.(2003)은 rats가 wheel을 달리고 난후 비장근(gastrocnemius muscle)에서 순환되는 carnosine synthetase 활성을 평가하여 조사하였다. 또한, 사람의 경우, carnosine의 농도는 골격 근에서 현저하게 증가하였다.

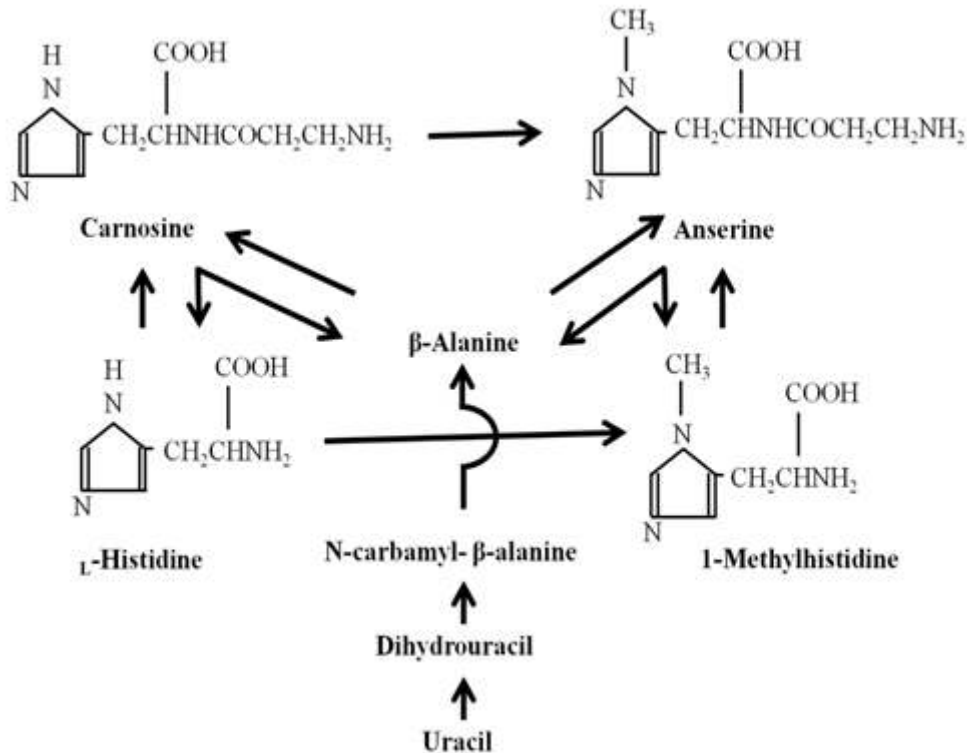


Figure C-1. The synthesis and degradation of carnosine and anserine

4. Carnosine의 생리학적 기능

Carnosine은 100여년 전에 발견되었으며 많은 논문에서 그 기능을 밝혀왔다. Carnosine의 보호 작용의 많은 경우가 있으며 별개의 독립체(oxygen free radicals, reactive nitrogen species, glycation agents, deleterious aldehydes, toxic metal ions)에 의한 다양한 손상에 대해 중재하는 작용 뿐만아니라, 노화와 연관되어 개선시키는 작용을 하기도 한다. Carnosine의 가능한 생화학적인 기능은 pH를 조절, 면역자극제, 상처 치료제, 항산화제, metal-ion chelator, carbonyl scavenger, 그리고 항 glycator로서 작용을 하는 것이다(Quinn et al., 1992).

가. Antioxidative Potential and Metal-Chelation

산소가 있는 환경에서 살아가기 위해 유기체들의 적응하는 과정에서 발전한 것은 산소와 ROS(Reactive oxygen species)에 의해 손상을 입는 것을 방어하기 위한 기작의 발전이다(Halliwell, M and Gutteridge, 1985). ROS는 암, 노화 그리고 몇몇 질병의 주된 요인으로 생각되어지기도 한다(Figure D-1). 이 ROS의 성분들은 DNA, RNA, 지질, 그리고 단백질에 작용을 한다(Saul et al., 1987). 자연 방어 기작은 하나의 종류에서 여래개의 종류로 다양하고 그것은 주로 비슷한 종류의 조직에서 일어나게 된다. 골격근육과 뇌는 2개의 조직에서 대부분 산화기작을 가지고 있으나, 항산화제 비타민 E와 비타민C의 농도로 인해 특별히 이 조직에서 높게 나오지는 않는다(Kornbrust and Mavis, 1979). Carnosine의 항산화제적 기작은 자유기의 scavenging과 metal-chelation에 기인한다고 할 수 있다(Decker et al., 1994; Baker and Kanofsky, 1991). 생물학적 조직은 일반적으로 자유기의 공격을 조건으로 그 다음에 산소 대사의 결합에 기인하여 산화적 손상을 입게 된다(Halliwell et al., 1995). 근육 조직은 산화반응에 특별히 민감하게 반응하는데, 지질막계(예. 미토콘드리아와 근소포체), 산화촉진제(예. 변환 금속과 heam 포함 단백질), 그리고 약간의 산소를 가지고 있는 경우의 고 농도의 물질을 포함하기 때문이다. 골격 근육에서의 산화 반응은 수용성 지방 산화 촉매와 불표화 지질막에서 일어난다. 근육의 산화 보호반응은 수용성물질(carnosine, anserine과 항산화 효소)과 지질 물질(α -tocopherol) 항산화 체계를 포함하게 된다. Carnosine과 anserine의 친수성 상태는 세포질 환경에서 보호물을 제공하게 되고, 많은 지방 산화 촉매제와 자유기를 발견할 수 있다. phosphatidylcholine의 산화 작용이 일어나는 체계에서는 2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride)(AAPH)에 의해 유도되어 지고, 수용성 자유기 initiator carnosine과 anserine은 53과 60%가 지질 산화에 대하여 보호되는 것으로 보여진다(Table D-1). Carnosine의 막을 보호하는 효과는 Boldyrev et al.(1987)에 의하여 처음으로 보고 되어졌고, 그들은 지질 과산화로 야기된 노년백내장에 걸린 개에게서 carnosine 효과를 발견했고 생체내외의 지질 과산화가 직접적으로 상호작용하는 carnosine의 능력에 대해 입증하였다. 이와 유사하게, Nagasawa et al.,(2001)은 carnosine의 항산화의 특성을 rat(hind limb)에서 조사하였다. 그들은 carnosine의 지질과 단백질의 산화를 억제하기 위한 최소한의 효과를 볼수 있는 농도를 2.5와 1mM로 각각 보고하였다. Carnosine과 anserine의 일중항산소의 상호작용은 직접적인 형광물질의 방법으로 조사하였다. Carnosine과 anserine은 2 에서 4×10^7 M/s의 범위의 반응속도 상수에서 효과적이게 일중항산소의 억제를 발견할 수 있다. 그 일중항산소의 억제는 주로 carnosine과 anserine의 아미다졸 그룹에 기인한다고 하였다(Egorov et al., 1992)(FigureA-1). Carnosine과 anserine은 deoxyribose degradation 과 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)의 불활성화를 방지하는 데, hydroxyl radical에 의해 시작되고 carnosine은 철과 과산화수소 또

는 과산화수소와 UV-irradiation에 의해 발생된 hydroxyl radical를 불활성화된다 (Rubtsov et al., 1991). Carnosine의 항산화능력을 위한 다른 기작은 carnosine-metal chelation으로 나타낼 수 있다(Figure D-2 and Figure D-3). Carnosine은 chelating metals의 능력을 가지지만, 그것의 chelating 활성은 metal ion의 형태에 따라 다양하다(Decker et al., 1992; Rubtsov et al., 1991; Yoshikawa et al., 1991). Carnosine과 anserine은 구리(Cu^{2+})와 함께 chelate제제로서 효과적으로 보인다. 생체분자의 산화와 carnosine의 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectra 의 관한 연구는 carnosine chelate copper는 철보다 더욱 잘 되는 것을 나타냈고(Decker et al., 1992) Wu et al.(2003)은 carnosine chelate-Cu 능력이 62%인 것을 나타냈다(Table D-2). Kohen et al.(1988)은 deoxyguanosine의 산화적 손상은 구리와 비타민C에 의해 야기되는 것을 보고했다. Decker와 co-workers(1992)는 구리에 의한 촉매작용으로서 carnosine(1.0~10mM)은 비타민C산화를 감소 시킬 수 있음을 보고하였다. Carnosine의 구리-촉매적 산화 작용을 억제하기 위한 능력은 carnosine이 구리와 복합체를 형성하는 구리의 반응도를 감소시키는 방법에서 나타난다. 대부분의 진핵생물체에서 SOD(superoxide dismutase; 과산화물제거효소)는 두가지의 형태로 존재하게 되는데, 하나는 세포질에서 발견되고 다른 하나는 미토콘드리아에서 발견된다(Fridovich, 1974). 세포질의 SOD의 활성부분은 구리와 아연이 포함되어 있는 반면, 미토콘드리아의 SOD는 마그네슘을 포함하고 있다. 일반적으로, carnosine과 anserine은 hypoxanthine과 xanthine oxidase에 의해 발생한 과산화물음이온을 scavenging의 능력을 가지지는 않지만, carnosine의 구리 chelates는 PMA(phorbol myristate acetate) 또는 xanthine oxidase 체계로 처리된 호중구가 방출됨에 따른 과산화물음이온에 대항하는 SOD능력을 가진다. 하지만 구리와 anserine의 chelate는 SOD활성을 가지지 않는다(Kohen et al., 1991). Anserine이 포함된 methyl 그룹은 구리의 결합을 방해하기 때문에, 따라서 SOD 활성을 방지한다. 골격 근육은 신체 내 전체 1/3에 해당하는 구리가 포함되어 있으며, 따라서 골격근육안의 carnosine의 농도는 매우 높고, 그래서 Cu^{2+} 의 chelation 은 생물학적으로 중요하다고 할 수 있다. Carnosine은 약한 iron chelator인 반면, 이것은 철-촉매 작용을 하는 지질 산화를 방해하는 능력은 여전히 가지고 있으며, 또한 이것은 carnosine은 자유기의 scavenging할 수 있다고 할 수 있다고 하였다(Decker et al., 1992). Zinc-carnosine chelate 화합물은 opsonized zymosan에 의해 자극되어진 다핵백혈구로부터 유래된 과산화물이온 radical을 scavenging 할 수 있는 능력을 발견할 수 있다.(Yoshikawa et al., 1991, 1992). Zinc-carnosine chelate 화합물은 또한 Fenton 작용으로부터 유래된 수산화 radicals을 억제할 수 있는 능력을 가졌다 (Yoshikawa., 1991).

Table D-1. Antioxidant activity of carnosine and carnosine-related amino acids in the AAPH¹-induced lipid oxidation system.

Compound (10 mM)	Oxidation rate, μM/min	Inhibition, %
No addition	3.6	0
L-Alanine	3.6	0
β-Alanine	3.6	0
Histidine	2.1	42
Carnosine	1.7	53
Anserine nitrate	1.3	60

¹ 2,2'-azobis (2-amidinopropane dihydrochloride). Kohen *et al.*, 1988.

Table D-2. Chelating effect (%) of dipeptides and amino acids on Cu²⁺.

Amino acids/Dipeptides	Concentration (mM)					
	0.5	2.5	5.0	10	20	40
Carnosine	17.4±6.2	27.1±3.2	32.7±2.9	52.7±1.5	61.2±1.3	62.5±2.3
Anserine	18.8±2.7	25.5±3.7	26.9±3.7	28.2±3.6	29.3±3.3	31.3±3.6
Histidine	15.5±1.4	27.0±3.3	37.1±3.4	59.4±1.8	66.1±0.6	66.1±0.2
Glycine	11.3±3.5	25.8±2.4	27.3±3.1	29.5±3.2	30.7±3.6	33.2±3.1
Alanine	12.9±1.5	25.5±3.3	28.9±2.8	30.0±3.0	30.8±3.7	32.4±2.7
β-alanine	4.2±0.6	20.0±3.8	35.7±4.5	41.7±3.7	42.3±3.6	44.5±4.4
Car ¹ .+Ans ² .	7.9±0.2	38.8±0.4	40.8±0.6	43.6±0.7	48.2±0.4	57.6±0.2
Car. + Histidine	6.1±0.6	32.9±1.3	41.8±0.5	47.7±0.2	58.5±0.1	71.5±0.1
Car. + Ans.+Histidine	7.8±1.1	38.4±0.8	40.8±0.8	45.4±0.6	52.1±0.2	67.0±0.5
β-alanine + Histidine	5.0±1.5	26.3±4.3	39.2±4.0	41.1±4.7	46.2±5.6	64.2±1.8

¹Carnosine.

Wu *et al.*, 2003.

²Anserine.

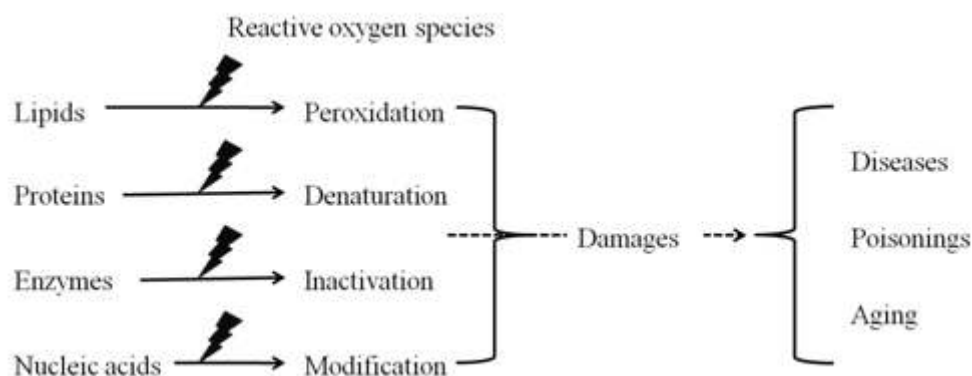


Figure D-1. Damage of biomolecules due to reactive oxygen species

나. Anti-Aging and Antiglycation Effect

사람의 근육 carnosine 수준은 10세에서 70세에 이르게 되면 63%가 감소된다 (Figure D-4). 이것은 근육내 carnosine 농도의 현저한 감소는 노화와 관련된 근육량, 근육의 강도, 그리고 근육의 기능의 감소의 원인이라고 할 수 있다(Stuerenburg and Kunze, 1999). 노화(aging)는 세포단백질의 손상과 연관되어 있으며, 분자 내부와 외부에서의 교차결합에 의한 결과이다. Carnosine은 적어도 2가지 방법의 대사적 손상으로부터 세포의 단백질을 보호한다. 첫째로, 산화제로서 carnosine은 산화된 당, 또는 glycosyl radicals, 또한 AGEs(advanced glycosylation end products)라 불리는 물질의 형성을 방지한다(Hipkiss et al., 1998). 둘째로, carnosine은 세포막에서 단백질과 함께 결합하거나 공격하고, 또한 세포막을 중성화시키는 잠재적으로 위험한 carbonyl groups과 결합을 한다. 이 과정들은 노화방지 치료를 위한 중요한 시행과정이고, carnosine은 교차결합의 주요 형성되는 것을 제거하여 손상을 주는 교차결합의 형성을 방지하고, 일반적인 막의 기능을 가지도록 회복시켜준다(Hipkiss et al., 2000). Glycation(또는 non-enzymic glycosylation)은 환원당과 단백질 아미노그룹이 반응하는 과정으로 brown products복합체를 많이 발생하며, 인체에게 계속적으로 그들의 중요한 역할을 하는 것을 효과적으로 실행할 수 없게 할 수 있다(Suji and Sivakami, 2004). 화학적으로 복잡한 많은 양의 교차결합된 AGE 구조물은 세포에게 종종 유해한데, 그들은 적절한 수용체를 가지고 있어서 hyperoxic 반응을 유발할 수 있기 때문이다(Thornalley, 1998). Glycation, 또는 glycosylation으로서 알려진 것은 글루코스와 단백질 분자가 결합하여, 결과적으로 단백질의 구조가 변하고, 그것의 생물학적 활성을 감소시키거나, 또는 완전히 파괴하는 것을 말한다. 이것은 몇몇의 노화와 연관된 질병과 현상, 예를 들어 동맥경화, 백내장, 신경활성의 감소와 같은 것을 이끈다. 또한 갈변화(Maillard reaction)는 노화의 주된 원인이고 이것은 암을 유발하는 물질로 믿어지고 있다. Carnosine의 구조는 단백질 안의 선취된 glycation 위치와 밀접하게 비슷하고, 그것은 타겟 아미노 그룹과 함께 근위의 아미다졸과 carboxyl그룹 이다. 폴리펩타이드에 반응하거나 수정하는 것을 방지하는 능력 때문에 많은 잠재적인 glycation 작용물질과 함께 작용할 수 있다. 다양한 항-glycating 활성(glucose, fructose, ribose, deoxyribose, dihydroxyacetone, glyceraldehydes, malondialdehyde and methylglyoxal)은 최근 다른 연구자들에 의해 확립되었다(Kuleva et al., 1997; Lee et al., 1999; Swearingin et al., 1999). Carnosine은 세포(배양된 사람 섬유아세포와 림프구, 배양된 rat의 뇌 내피세포 그리고 Chinese hamster의 난소세포)를 보호하기 위해 acetaldehydes의 유해한 효과에 대응하는 것을 볼수 있다(Hipkiss et al., 1995; Hipkiss et al., 1997; Hipkiss et al., 1998). 게다가, dipeptide는 또한 라이신과 deoxyribose에서 생성되는 저 분자량의 AGE의 독성을 개선하고(Hipkiss et al., 1998) acetaldehyde와 formaldehyde에 의해 유도된 DNA-단백질 교차연결을 억제한다(Hipkiss et al., 1998)

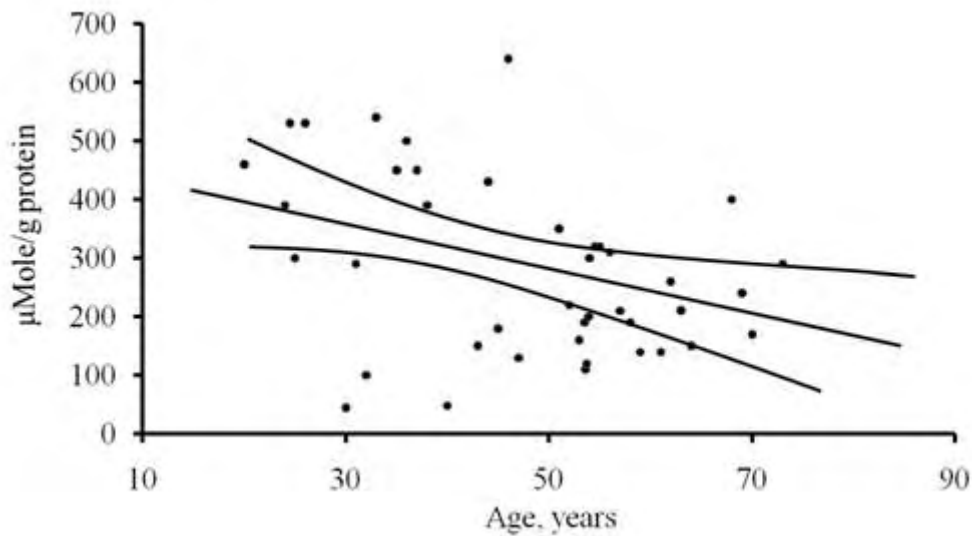


FIGURE D-4. Carnosine content in human muscle decline with age (Stuerenburg and Kunze, 1999).

다. Therapeutic Effect

노화가 진행되는 동안, 단백질은 산화되고 교차연결 된다. 이 변화는 glucose, fructose 그리고 peroxidation 생산물 malondialdehyde와 같은 유해한 aldehydes에 의해 야기된다. Methylglyoxal은 또한 단백질의 변성을 촉진하게 되고, 특별히 2차적인 문제로 당뇨병과 연관되어 진다. Carnosine은 많은 유해한 aldehydes와 쉽게 반응하고, 아마 이것은 타겟 아미노산 그룹과 근위의 아미다졸과 carboxyl 그룹을 가지고 있기 때문일 것이다. Carnosine은 lysine-methylglyoxal-AGEs로 인해 야기된 단백질 변성을 막을 수 있다. 이것은 잠재적으로 carnosine의 당뇨병의 가능한 무독성 조절인자로서 강조되는 점이다(Hipkiss and Chana, 1998). 별개의 경구투여(enteral)의 식이요법에 따른 상처회복의 효과에 관한 연구에서 보면, carnosine을 섭취 시 완벽한 경구투여의 포물러의 한 방법으로서의 투약하였을 때 상처회복을 개선시키는 것을 perspective randomized 방법으로 연구하였다. 이것은 몇몇의 경구투여 포물러들이 현재 carnosine을 포함하고 있다는 점에서 임상학적으로 타당성이 있다고 할 수 있을 것이다(Roberts et al., 1998). 이것의 항-glycating과 항산화 활성을 통해, 신경세포와 내피세포의 손상으로 야기되는 알츠하이머의 경우, 그러므로 carnosine은 유용한 치료 제제로 사용될 것이다(Preston et al., 1998). 러시아에서는, 5%의 carnosine의 안정된 점안액을 보건부(the Ministry of Health)에서 의료용으로 가발하고 허용하고 있다. 109명의 임상학적으로 환자를 대상으로 실험하였을 때, carnosine 점안액으로 실험하였을 때 각막미란, 영양 각막염 그리고 수포성 각막증에서 치료적으로 좋은 효과를 보였다(Maichuk et al., 1997). Rat의 경우, carnosine의 intraperitoneal 투여는 실험적으로 야기된 위와 십이지장의 침식작

용을 방지하고 또한 점막 결함의 치유를 통해 개선시킨다(Truistina et al., 1997). Carnosine은 보호기능 외에도 추가적으로 항산화와 자유기의 scavenging역할을 할 것이다. 이것은 사람의 섬유아세포의 수명을 연장하고, 형질전환세포를 죽이고, aldehydes와 amyloid peptide 단편에 대해 세포를 보호하고, in vitro, 단백질 glycation(carbonyl그룹과 advanced glycosylation end-products의 교차연결 성)과 DNA-단백질 교차연결을 억제한다(Hipkiss, 1998). 치료용으로서의 넓은 범위의 carnosine의 사용은 figureD-5에서 보여주고 있다.

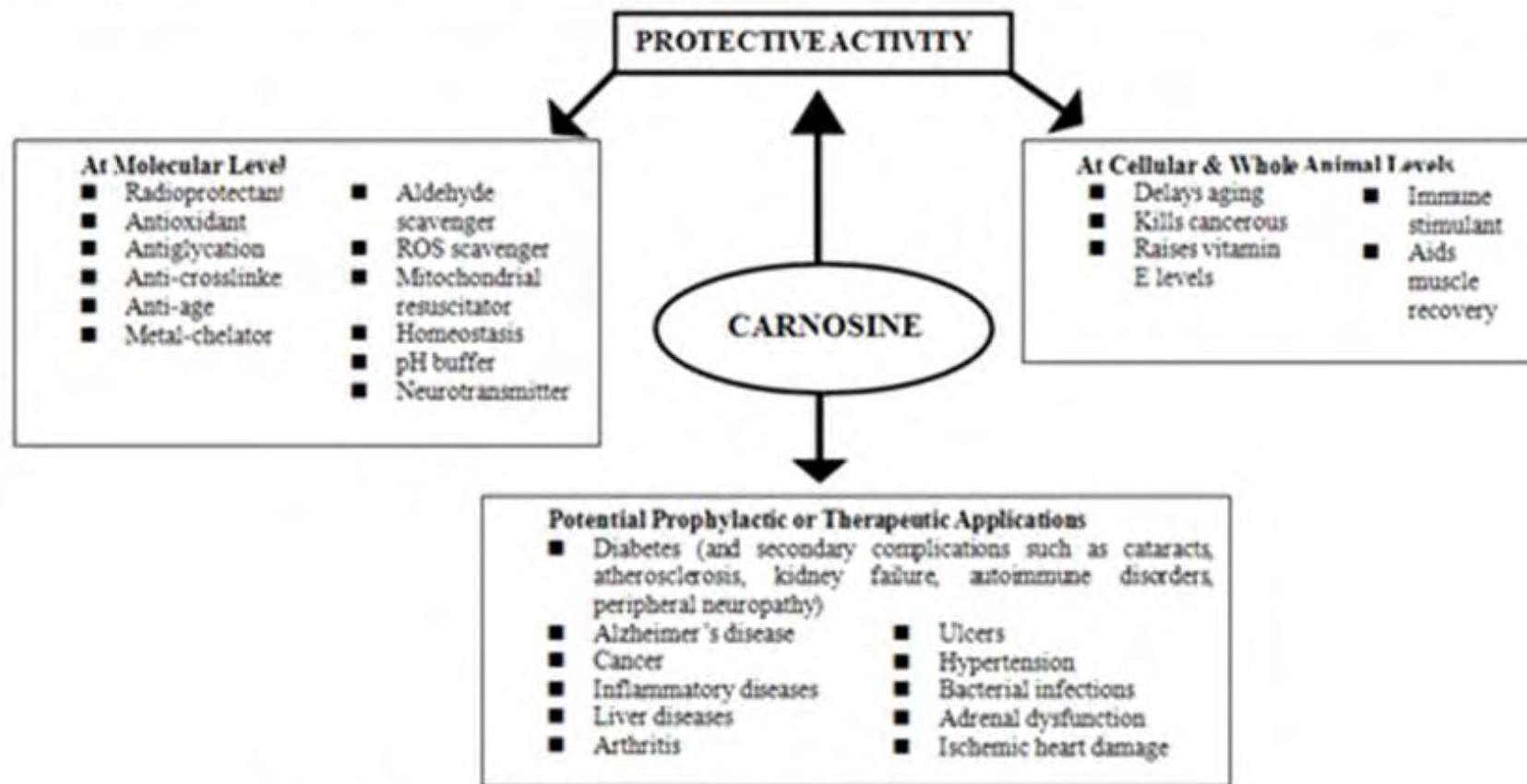


FIGURE D-5. Mechanism of action and potential therapeutic uses of carnosine (Hipkiss *et al*, 1998)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 혈분의 급여가 육계 계육의 carnosine과 anserine 함량에 미치는 영향

1. 1차 육계 시험

가. 서론

Carnosine (β -alanyl-L-histidine)과 anserine (β -alanyl-methyl-histidine)은 포유 동물과 가금류에서 발견되는 L-histidine (His) 함유 dipeptide이다 (Tamaki 등, 1976; Boldyrev 등, 1990). 이중 carnosine은 항산화 기능 (Kohen 등, 1987 ; Maikhunthod 등, 2005), 세포 노화의 예방 및 치료 (Gariballa 등, 2000, Boldyrev 등, 1990), glycation에 의하여 발생하는 유리기의 세포공격 방어 (Wang 등, 1999 ; Hipkiss, 2005), 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 뇌 질환의 예방 및 치료 (Hipkiss 등, 1997 ; Preston 등 1998 ; Hobart 등, 2004)등의 다양한 생리적 기능들을 가지고 있는 물질로서 그 생리·화학적 특성 (Moneysmith, 2004)이 상당히 밝혀져 있다. Anserine은 carnosine의 methylation에 의하여 생성되는 물질로 가금의 근육에서 많이 존재하는 항산화 물질이며 (Boldyrev 등 1990) carnosine의 체내 함량에 있어서 밀접한 관계를 맺고 있을 것이라 예상되고 있다.

Carnosine관련 연구는 주로 이것의 항산화 능력 및 앞서 소개한 다양한 생리적 작용들의 효과검증과 신생효과에 대한 고찰이 주를 이루고 있다. 반면 동물의 근육에서 자연 합성되는 carnosine의 강화를 위한 영양학적 접근에 의한 연구는 상대적으로 미미한 상태이다. 점차로 이러한 dipeptide의 중요성이 증가되는 시점에서 계육 내 carnosine 강화 축산물 생산을 위한 연구는 다양한 관점에서 중요성을 가진다. Carnosine 강화 기능성 계육을 생산할 수 있는 가능성을 마련함으로써 수입축산물에 대항한 시장 경쟁성 고양 및 상품의 다양화를 유도할 수 있으며 carnosine과 관련된 산업적 목적의 파생연구들, 예를 들면, 식품 첨가물 산업에 적용, 추출 carnosine의 tablet 제조와 같은 연구 분야의 적용을 유도함으로써 새로운 시장을 개척 할 수 있다.

따라서, 본 연구는 가금류의 골격근육 내에 자연적으로 발생하는 carnosine의 함량을 영양학적인 방법을 이용하여 증강시키고자 하는데 목적을 두었으며 동시에 이것의 methylation에 의하여 생성되는 anserine을 관찰하여 이 둘의 상관관계를 살펴보고자 하였다. Carnosine은 β -alanine (Ala)의 체내 이용성에 따라 그 합성양이 영향을 받는다는 보고가 있었으며 (Harris 등, 2006; Hill 등, 2007) 사료 내에 Ala를

혼합하여 급여 하였을 경우 근육과 뇌에서 carnosine이 증가되었다는 보고 등 (Tomonaga 등, 2005, 2006)을 고려하여 볼 때 carnosine의 체내 합성을 위해서는 그 구성 물질 중 하나인 Ala이 공급 되었을 때 가장 효과적일 것으로 사료된다. 하지만 Ala은 단백질을 구성하는 주요 20종의 아미노산이 아니므로 곡물이나 기타 사료원료가 Ala의 공급원이 될 수가 없는 것이 현실이다. 이러한 이유로 또 다른 carnosine 구성 물질인 His을 강화하여 줌으로써 carnosine 강화 효과를 검토해 보고자 하였다. His은 carnosine의 두 가지 구성 물질 중 하나로서 Amend 등 (1979)의 보고에 의하면 His이 포함되지 않은 사료를 8주 동안 공급한 후 연이어 His을 권장 요구량의 2배로 하여 4주 동안 공급하였을 때 가슴근육과 다리근육 내의 carnosine 강화 효과를 확인하였다고 보고하였다. 이것은 다시 말하면 근육 내의 carnosine 함량이 His의 유무에 따라 변할 수 있다는 것을 나타낸다. 이에 따라 His의 공급원으로 이용될 수 있는 혈분 (BM)을 사료 내에 첨가 하였을 때 carnosine이 강화될 것 이라는 가설을 설정하였다. 혈분은 고도의 단백질원으로서 높은 질소 함량으로 인해 비료로 이용되고 있으며 단백질원이 부족한 지역의 가축에게는 비교적 양호한 단백질원으로 공급되는 원료이다 (Hassan 등, 1974; Kats 등, 1994; Wahlstrom 등, 1977; Khawaja 등, 2007). 아미노산의 구성도 다양하며 lysine 및 leucine의 함량이 높고 동물성 사료 부산물의 맹점인 prion 감염이 거의 없다는 이점이 있다.

본 시험을 통하여 혈분의 carnosine 강화 효과를 검증하고자 하였으며 carnosine의 methylation에 의하여 생성되는 anserine과의 상관관계를 관찰하고자 하였다. 또한 carnosine강화에 적합한 혈분의 적정 수준을 밝힘으로서 차후 발전된 시험을 위한 기초를 다지고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 구성 및 분석항목

갓 부화한 1000수 (암. 수 각 500수)의 broiler (Ross종[®])를 사양시험에 이용하였다. 시험 구성은 4처리구, 5반복 즉, 대조구 (T1), 대조구 + 혈분 2%, 4%, 6% 처리구를 각각 T2, T3, T4로 구분하였으며 각각의 처리구마다 5개의 반복을 두고 반복당 50수 (암. 수 각 25수)씩 floor area (2 x 2.4m)에 임의 배치하였으며 물과 사료를 자유 채식 시켰고 전체 시험기간 동안 하루 24시간 점등하였다. 시험개시 후, 매 1주마다 사료 섭취량과 증체량을 기록하였으며 근육 내의 carnosine과 anserine 함량을 분석하기 위하여 실험 종료 후에만 1회 채취하여 암. 수 각각 1수씩 도계하여 가슴근육과 다리근육을 채취하였다. 육계의 생산성을 위해 사료 섭취량, 증체량, 및 사료 이용을 시험을 실시하였다.

(2) 생산성

중체량은 시험 개시시, 2주차, 4주차(종료시)에 각각 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정시 사료급여량에 잔량을 제하여 산출하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 중체량으로 나누어 산출하였다.

(3) 재료의 전처리

수거된 각각의 가슴근육과 다리근육 5~10 g 을 동결시킨 후 진공건조기를 이용하여 48시간 동안 수분을 제거하는 과정을 거쳤다. 충분히 건조된 샘플을 믹서로 곱게 분쇄한 후 원심 분리용 튜브 (Nalgine) 에 1 g 씩 담고 24 ml 의 증류수와 혼합하였다. 혼합된 샘플을 상온에서 20분간 4분 간격으로 흔들여 근육 내의 수용성 dipeptide인 carnosine과 anserine이 용출되도록 하였다. 그 후 20 분간 10,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 샘플을 원심분리 하였다. 원심분리가 종료된 후 그 상층액을 core size 0.45 μ m의 membrane filter (ADVATEC MFS, Inc. Japan)로 여과한 후 에펜들프 튜브에 여과된 상층액 0.3 ml 과 MeOH 0.9 ml을 혼합하여 냉동실에 30분간 반응시켜 단백질이 엉기도록 하였다. 그 후 3 분간 12,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 다시 샘플을 원심분리 하여 그 상층액을 분리한 뒤 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)의 분석에 이용하였다.

(4) 분석 시약

HPLC standard solution으로 이용하기 위한 *L*-carnosine과 *L*-anserine (SIGMA). HPLC 용매를 구성하는데 사용되는 acetonitrile (ACN), Tetrahydrofuran (THF), acetic acid 와 sample 전처리를 위한 methanol (MeOH) (J.T Baker, HPLC grade). HPLC 분석용 반응용액제조를 위한 O-phthaldialdehyde (OPA), 2-Mercaptoethanol (SIGMA).

(5) HPLC 분석

Carnosine과 anserine의 분석은 HPLC를 이용하여 하였다. OPA- pre-column reaction 방식을 이용하여 샘플을 2분간 OPA solution과 반응시킨 후 이용 하였다. HPLC는 pump 2개 (GILSON Model 305, France), fluorescence detector (GILSON Model 121, France) 등으로 구성 하였다. Column은 amino acid 분석용 (Higgins, CS-2548-C185 / CLIPEUS C18)을 이용하였다. 분석에 이용된 용매 A의 조성은 50 mM acetic acid, pH 4.37의 조건을 가지며 용매 B는 ACN (70 %) : MeOH (25 %) : THF (5 %) 의 비율로 혼합하여 제조하였다. 용매의 유속은 1 ml/min 이며, 1 cycle 은 40분으로 설정하였다. 용매간의 농도 기울기는, 용매 B 18 % (0 ~ 25 min), 100 % (26 ~ 31 min), 18 % (32 ~ 40 min)의 조건으로 하였다.

(6) 통계 분석

시험결과는 General Linear Model (SAS, 1995)을 이용하여 분석하였다. 유의성은 Duncan의 다중범위 검정을 이용하여 $p < 0.05$ 범위에서 측정하였다.

다. 결 과

(1) 생산성

Table 1-1-1에서 섭취량에 있어서 대조구와 전체 처리구간에 유의적인 차이가 없었지만 혈분을 6%첨가한 처리구가 다른 처리구들보다 높은 경향치를 보였다. 반면 증체량에 있어서는 혈분의 함량이 증가함에 따라 증체량도 증가되었다. 사료 이용율의 경우 0주에서 2주차에 대조구가 높은 유의성을 보였으며, 시험 종료시에는 전 처리구에서 유의적 차이를 보이지 않았다.

(2) 계육 내 carnosine, anserine 함량

Table 1-1-2을 보면 가슴 근육의 경우 carnosine은 유의적 차이는 보이지 않았지만 혈분을 2%첨가한 처리구가 다른 처리구에 비해 높은 경향치를 보였으며, anserine의 경우 각 처리구보다 대조구가 높은 유의성을 보였다. 다리 근육에서는 가슴 근육과 마찬가지로 carnosine의 경우 유의적 차이는 보이지 않았다. anserine의 경우 혈분을 6%첨가한 처리구가 유의적으로 가장 낮게 나타났다.

라. 고 찰

본 시험은 수준별로 혈분을 사료에 첨가하였을 때 계육내 carnosine과 anserine의 함량이 성장 단계별로 어떻게 변화하는지 또한 혈분 첨가시 육계의 사료섭취량, 증체량, 사료이용률을 측정하여 생산성에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 관찰하였다. 시험기간 동안 사료섭취량에서 유의적 차이는 없었지만 혈분 6%를 첨가한 처리구가 다른 처리구에 비해 높은 경향치를 보였다. 반면 증체량에서는 혈분의 함량이 증가함에 따라 증체량도 증가되었다. 사료섭취량이 증가할수록 증체량도 늘어나는 결과를 Table 1-1-1을 통해 이해할수 있다. carnosine의 경우 대조구와 처리구 간에 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 혈분의 함량이 수준별로 간격을 낮은 페센트로 차이를 둔 것이 결과에 영향을 미친 것으로 보인다. 차후의 실험에서 혈분의 첨가 수준을 처리구간에 percentage 간격을 더 두어 시험해야할것으로 사료된다..

Table 1-1-1. Feed intake, weight gain, and feed conversion ratio (FCR).

Items	Treatment ¹					SEM
	Wks	T1	T2	T3	T4	
Feed intake (g/bird)	0~2	480.8	509.6	487.0	489.6	5.00
	2~4	1038.0	1035.0	1041.0	1055.4	6.79
	0~4	1518.8	1544.6	1528.0	1545.0	6.94
Weight gain (g/bird)	0~2	338.2 ^b	364.6 ^a	356.2 ^{ab}	358.0 ^{ab}	4.08
	2~4	879.2 ^b	902.2 ^{ab}	918.6 ^a	931.4 ^a	6.59
	0~4	1217.4 ^b	1266.8 ^a	1274.8 ^a	1289.4 ^a	9.11
FCR	0~2	1.42 ^a	1.40 ^{ab}	1.37 ^b	1.38 ^b	0.009
	2~4	1.18	1.15	1.13	1.13	0.012
	0~4	1.25	1.22	1.20	1.20	0.010

¹T1=control diet, T2=BM 2%, T3=BM 4%, T4=BM 6%

^{a-c} Means with no common superscript differ significantly (P<0.05).

Table 1-1-2. Carnosine and anserine content of broiler breast and leg muscle(mg/g, DM)

Breast muscle					
Items	Treatment¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Anserine	25.05 ^a	23.55 ^{ab}	20.90 ^{bc}	18.73 ^c	0.76
Carnosine	13.91	15.43	14.73	13.37	0.79

Leg muscle					
Items	Treatment¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Anserine	10.32 ^a	10.59 ^a	10.47 ^a	9.22 ^b	0.29
Carnosine	5.97	5.47	5.72	5.88	0.32

¹T1=control diet, T2=BM 2%, T3=BM 4%, T4=BM 6%

^{a-c} Means with no common superscript differ significantly(P<0.05).

2. 2차 육계 시험

가. 서론

앞서 실시한 1차 육계 시험을 통해 혈분의 수준별 유의적 차이가 확인하지 않아 2차 시험에서는 혈분의 수준을 5%, 10%로 구성하여 수행하였다. 본 시험을 통하여 혈분의 carnosine 강화 효과를 검증하고자 하였으며 carnosine의 methylation에 의하여 생성되는 anserine과의 상관관계를 관찰하고자 하였다. 또한 carnosine강화에 적합한 혈분의 적정 수준을 밝힘으로서 차후 발전된 시험을 위한 기초를 다지고자 하였다. 본 시험에 이용한 혈분의 아미노산 및 일반성분 조성은 Table 1-2-2에 나타내었다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 구성 및 분석항목

시험은 갓 부화한 384수 (암. 수 각 192수)의 broiler (Ross종[®])를 사양시험에 이용하였다. 시험 구성은 3 처리구, 8 반복 즉, 대조구 (T1), 대조구 + 혈분 5 %, 10 % 처리구를 각각 T2, T3로 구분하였으며 (Table 2-1) 각각의 처리구마다 8개의 반복을 두고 반복 당 16수 (암. 수 각 8수)씩 stainless cage (76 cm x 57 cm x 76 cm)에 임의 배치하였으며 물과 사료를 자유 채식 시켰고 전체 시험기간 동안 하루 24시간 점등하였다. 시험개시 후, 매 1주마다 사료 섭취량과 증체량을 기록하였으며 근육 내의 carnosine과 anserine 함량을 분석하기 위하여 cage마다 암. 수 각각 1수씩 도계하여 흉근을 채취하였다. 육계의 생산성을 위해사료 섭취량, 증체량, 사료 이용률 및 폐사율을 측정하였다.

시험 사료의 배합은 시판용 육계 일반사료 (Crumble)와 분쇄 옥수수, 대두박, 아미노산 제제 등을 이용하였으며 대사 에너지와 조단백질 함량을 동일하게 맞추어 제조하였다.

(2) 생산성

증체량은 시험 개시시부터 종료시까지 매주 각각 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정시 사료급여량에 잔량을 제하여 산출하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다. 폐사율은 폐사수수를 생존수수로 나누어 산출하였다.

(3) 재료의 전처리

수거된 각각의 흉근 5~10 g 을 동결시킨 후 진공건조기를 이용하여 48시간 동안

수분을 제거하는 과정을 거쳤다. 충분히 건조된 샘플을 믹서로 곱게 분쇄한 후 원심 분리용 튜브 (Nalgine) 에 1 g 씩 담고 24 ml 의 증류수와 혼합하였다. 혼합된 샘플을 상온에서 20분간 4분 간격으로 흔들어 근육 내의 수용성 dipeptide인 carnosine과 anserine이 용출되도록 하였다. 그 후 20 분간 10,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 샘플을 원심분리 하였다. 원심분리가 종료된 후 그 상층액을 core size 0.45 µm의 membrane filter (ADVATEC MFS, Inc. Japan)로 여과한 후 에펜들프 튜브에 여과된 상층액 0.3 ml 과 MeOH 0.9 ml을 혼합하여 냉동실에 30분간 반응시켜 단백질이 엉기도록 하였다. 그 후 3 분간 12,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 다시 샘플을 원심분리 하여 그 상층액을 분리한 뒤 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)의 분석에 이용하였다.

(4) 분석 시약

HPLC standard solution으로 이용하기 위한 *L*-carnosine과 *L*-anserine (SIGMA). HPLC 용매를 구성하는데 사용되는 acetonitrile (ACN), Tetrahydrofuran (THF), acetic acid 와 sample 전처리를 위한 methanol (MeOH) (J.T Baker, HPLC grade). HPLC 분석용 반응용액제조를 위한 O-phthaldialdehyde (OPA), 2-Mercaptoethanol (SIGMA).

(5) HPLC 분석

Carnosine과 anserine의 분석은 HPLC를 이용하여 하였다. OPA- pre-column reaction 방식을 이용하여 샘플을 2분간 OPA solution과 반응시킨 후 이용 하였다. HPLC는 pump 2개 (GILSON Model 305, France), fluorescence detector (GILSON Model 121, France) 등으로 구성 하였다. Column은 amino acid 분석용 (Higgins, CS-2548-C185 / CLIPEUS C18)을 이용하였다. 분석에 이용된 용매 A의 조성은 50 mM acetic acid, pH 4.37의 조건을 가지며 용매 B는 ACN (70 %) : MeOH (25 %) : THF (5 %) 의 비율로 혼합하여 제조하였다. 용매의 유속은 1 ml/min 이며, 1 cycle 은 40분으로 설정하였다. 용매간의 농도 기울기는, 용매 B 18 % (0 ~ 25 min), 100 % (26 ~ 31 min), 18 % (32 ~ 40 min)의 조건으로 하였다.

(6) 통계 분석

시험결과는 General Linear Model (SAS, 1995)을 이용하여 분석하였다. 유의성은 Duncan의 다중범위 검정을 이용하여 $p < 0.05$ 범위에서 측정하였다.

다. 결 과

(1) 생산성

시험기간 동안의 사료 섭취량, 증체량, 사료 이용률 및 폐사율에 대한 결과는 Table 1-2-4 에 나타내었다. 사료 섭취량에 있어서는 0-1주를 제외한 모든 주에서 유의적인 차이가 있었으며 이중 4-5주를 제외한 모든 주에서 T1 처리구가 유의적으로 가장 높은 사료섭취량을 보였다 ($P<0.05$). 전체 시험기간 의 평균을 볼 때 (Table 1-2-4에서 '0-5'로 표기) T2 처리구는 T1과 비교하여 평균 144g정도의 사료를 적게 섭취하였으며 T3는 573g정도를 적게 섭취하였다. 증체량에 있어서는 모든 주의 T1 처리구에서 유의적으로 가장 높은 수준을 보였다 ($P<0.05$). T2는 T1 처리구와 비교할 때 평균 234g 정도의 증체가 부족했으며 T3 처리구는 814g 정도의 증체가 이루어 지지 않았다. 결과적으로 혈분침가 처리구들은 T1과 비교하여 각각 5.5 %, 26 % 정도 사료를 적게 섭취한 반면 14 %, 74 % 정도 증체가 이루어 지지 않았다.

단위당 증체에 요구되는 사료량으로 표기되는 사료 이용율 (Feed/gain, FCR)에 있어서는 T3 처리구가 모든 주에 있어서 유의적으로 가장 높은 수준을 보임으로서 ($P<0.05$) T3 개체들이 사료의 증체이용에 있어서 효율이 가장 좋지 않다는 결과를 보였으며 T1 개체들이 증체를 함에 있어서 유의적으로 사료의 이용성이 좋았다는 결과를 얻을 수 있었다 ($P<0.05$).

폐사는 오직 T3 처리구에서만 발견 되었으나 다른 처리구들과 비교하여 유의적 차이를 보이지 않았다.

(2) 계육내 carnosine, anserine 함량

계육 내 carnosine 과 anserine 함량에 관한 결과는 Table 1-2-3 와 Figure 1-2-1, 1-2-2 에 나타내었다. 매 주마다 분석한 결과를 보면 모든 주령의 T2 처리구에서 유의적으로 가장 높은 수준의 carnosine 함량을 얻을 수 있었다 ($P<0.05$). 특히 같은 주령대의 처리구들을 비교하였을 시에 carnosine 함량이 가장 높은 처리구가 가장 낮은 처리구보다 43 % 에서 361 % 까지 다양한 범위에서 차이를 보였다. Carnosine 함량이 가장 낮은 처리구는 T3 로 10%의 혈분을 첨가하였지만 T1이나 T2 처리구보다 유의적으로 낮은 수준을 보였다 ($P<0.05$). 5주의 carnosine 함량은 모든 처리구에서 4주의 carnosine 함량보다 낮은 수치를 보였다.

Anserine 함량의 경우는 T3 처리구가 1주령을 제외한 모든 주령에서 T1, T2 처리구와 비교하여 유의적으로 가장 높은 수준을 보였으나 ($P<0.05$) 최대, 최소 처리구간의 함량차이는 11 %에서 27 % 수준으로 carnosine의 경향과 비교하여 그 차이가 비교적 좁았다. 계육 내에 존재하는 His 함유 dipeptide의 함량을 예상해 볼 수 있는 carnosine과 anserine의 함에 있어서는 1주령을 제외한 모든 주령에서 유의적인 차이를 볼 수는 없었으나 각 주령마다 측정된 최대, 최소 처리구간의 함량차이는 2 %에서 9 %의 수치상 차이를 보였다.

라. 고 찰

본 시험은 수준별 혈분첨가에 따른 계육 내 carnosine, anserine 함량이 성장단계 별로 어떻게 변하는지 또한 가장 효율적인 carnosine 강화 조건이 무엇인지를 확인 하기 위하여 매 주 마다 carnosine, anserine의 함량을 측정하여 그 경향을 관찰하였으 며 동시에 사료섭취량, 증체량, 사료 이용률, 폐사율을 측정하여 경제성 및 혈 분의 개별 수준에 따른 육계의 performance를 관찰하였다.

각 주별 시험기간 동안 T2에서 유의적으로 가장 높은 수준의 carnosine 함량을 얻을 수 있었으며 그 결과는 Figure 1-2-1(a), Table 1-2-3 에서 쉽게 이해될 수 있을 것이다. 한편 carnosine의 함량이 4주까지는 거의 모든 처리구에서 양의 증가 를 보였는데 5주령의 계육을 측정된 결과 4주령과 비교하여 모든 처리구에서 음의 증가를 보였다 (Table 1-2-3). 본 시험만을 고려한다면 혈분 급여에 따른 carnosine의 함량은 4주령 육계에서 가장 두드러지는 것으로 예상 해 볼 수 있다. 하지만 4주령 육계의 T1 처리구도 T2와 마찬가지로 유의적으로 같은 수준의 carnosine 함량을 보였으므로 4주령의 육계만 놓고 본다면 혈분에 의한 carnosine 강화 효과를 입증할 수는 없었다. 그러나 4주를 제외한 모든 주에서 T2 처리구가 유의적으로 T1이나 T3 처리구보다 높은 carnosine 함량을 보이고 있으므로 혈분에 의한 carnosine 강화 효과가 있다고 여겨진다. T3 처리구는 T1, T2 처리구와 비교 하여도 상당한 수준의 carnosine이 미합성 되었거나 혹은 손실된 것으로 사료된다. 이는 기호성이 좋지 않은 혈분을 사료의 10 % 수준으로 혼합함으로써 발생하는 사료 섭취량 문제나 혹은 미처 고려되지 못한 영양적 불균형 문제와도 연관이 있는 것으로 여겨진다. Fisher 등 (1977)의 보고에 의하면 스트레스를 받게 한 쥐의 anserine 농도가 그렇지 않은 쥐에 비하여 약 25% 정도 낮았으며 carnosine 농도 역시 낮았다고 하였다. 본 시험에서 각 처리구별로 제조한 시험사료들은 크럼블과 분쇄 옥수수의 함량에 따라 사료의 입자 크기가 확연히 달랐는데, 닭의 경우 미세 한 입자의 사료를 급여할 경우 기호성이 떨어진다고 하였으며 크럼블의 형태가 가 장 이상적인 닭의 사료형태라 하였다 (한국 사양표준 <가금>, 2007). 이것으로 볼 때 T3 처리구의 저조한 carnosine 함량은 사료 섭취 및 영양적 불균형에서 오는 스 트레스의 원인으로도 생각할 수 있다. 하지만 carnosine합성의 부진에도 불구하고 anserine의 함량은 오히려 T3 처리구에서 유의적으로 높은 수준을 보여주었다 (Fig. 1-2-1(b), Table 1-2-3). 이는 carnosine이 methylation을 거쳐 anserine 혹은 ophidine (β -alanyl-3- methyl-histidine)으로 된다는 Bolyrev 등 (1990)의 보고를 고려하였을 때 이미 생성된 carnosine이 일련의 작용에 의해 anserine으로 전환된 것으로 사료되며 이럴 경우 T1, T2 처리구는 상대적으로 methylation을 억제하는 일련의 과정이 T3 처리구보다 강력했던 것으로 생각할 수 있다. Ala 급여에 따른 육계의 뇌와 근육 내 carnosine과 anserine의 함량변화를 연구한 Tomonaga 등 (2005)의 보고에 의하면 Ala 급여에 의한 근육 내 carnosine의 함량은 증가하였지만 anserine의 함량은 오히려 감소하였다고 하였다. 또한 이렇게 carnosine의 증가에

반하여 anserine의 감소가 일어난 상황을 ‘총 dipeptide (carnosine + anserine)합의 부동(不動)’으로 묘사하였다. 본 시험에서도 carnosine이 높은 T2의 경우 anserine의 함량이 낮은 경향을 보였는데 이는 Tomanaga 등 (2005)이 보고한 현상과 일치하는 경향이였다. 또한 carnosine이 높을 때 anserine이 낮거나 혹은 그 반대의 상황에 놓인 처리구에서, 이 둘의 합은 유의적인 차이가 없었기 때문에 (Table 1-2-3, Figure 1-2-2) 결국 계육 내에 존재하는 dipeptide의 양에 있어서는 큰 변화가 없었다고 여겨진다. Anserine은 carnosine의 methylation에 의한 과정뿐만 아니라 carnosine으로부터 유리된 β -alanyl基가 1-methylhistidine基에 결합하여 anserine으로 합성된다는 보고도 있으므로 (Mcmanus, 1961) 체내에 존재하는 anserine이 carnosine의 전환으로만 생성되었다고는 볼 수 없다. 그럼에도 불구하고 위의 과정 역시 anserine 합성에 carnosine의 β -alanyl基를 필요로 하는 만큼 carnosine과 anserine의 생성관계가 무관하다고는 할 수 없다. 이것을 다시 생각해 보면 사양조건이 열악한 상태에서는 carnosine의 합성이 잘 이루어 지지 않거나 이루어지더라도 상당부분이 anserine과 같은 관련 dipeptide로 전환될 수 있다는 사실을 유추해 볼 수 있다. 따라서 높은 carnosine 함량을 유지하기 위한 사양조건을 정립하기 위해서는 다양한 방면에서의 시험이 추가적으로 이루어 져야 할 것으로 사료된다. Anserine도 carnosine과 마찬가지로 항산화 능력이 있기 때문에 총 dipeptide의 합에 있어서 유의적 차이가 없다는 사실은 항산화 능력에 있어서 큰 차이가 없다는 것으로도 생각될 수 있다. 하지만 carnosine의 다양한 효과들을 고려할 때 anserine으로 전환되는 carnosine의 양을 최소한으로 유지시키는 것이 가장 중요하다고 사료된다.

Khawaja 등 (2007)의 보고에 따르면 혈분을 단백질 공급원으로 이용한 시험에서 혈분 3 % 수준이 사료섭취량, 증체량, 사료 이용률에 있어서 가장 좋은 성적을 보였으며 6 %의 혈분을 첨가하였을 때에는 사료 섭취량이 사양기간의 후반부에 유의적으로 높은 수준을 보였지만 오히려 증체량은 유의적으로 최저 수준을 보였다고 하였다 ($P < 0.01$). 이러한 사실을 고려하였을 때 본 시험의 10 % 혈분 처리구에서 보여지는 성장결과는 어느 정도 예상된 결과로 보인다.

결론적으로 carnosine의 강화를 위해서는 혈분 5 % 수준이 바람직 하지만 증체량과 같은 사양성적을 고려한다면 혈분 3 %에서 5 % 이내에서 이용되는 것이 경제적 손실을 최소화 시키는 방법이라고 사료된다.

Table 1-2-1. Specification of Experimental diets

Ingredients(%)	Treatments ¹		
	T1	T2	T3
soybean cake	5.48	7.10	9.61
wheat	-	6.97	0.59
cone	10.25	27.27	60.50
vitamins-minerals additives	0.02	0.06	0.10
limestone	1.01	1.00	0.56
salt	0.20	0.20	0.20
beef tallow	-	2.86	-
calcium hydrogen phosphate	-	0.67	2.23
crumble ²	82.97	48.33	15.48
Blood meal	-	5.00	10.00
Methionine 99 %	0.07	0.28	0.49
MgCl ₂	0.24	0.24	0.24
Calculated composition			
ME	3,100.00	3,100.00	3,100.00
Moisture (%)	10.32	10.60	11.62
CP (%)	22.00	22.00	22.00
C.fat (%)	3.27	5.60	2.48
C.fiber (%)	2.98	3.00	2.23
C.ash (%)	6.75	5.93	5.25
Ca (%)	1.02	1.00	1.10
Lysine	1.17	1.32	1.46
L-histidine	0.33	0.55	0.77

¹T1=control diet, T2=control + BM 5%, T3=control + BM 10%

²Crumble stands for the commercial diet which was used for adjusting nutritional values like CP and ME in this experiment.

Table 1-2-2. Specification of blood meal

Amino acid	(g/100g)		
Aspartic acid	10.47	Methionine	0.22
Threonine	3.45	Isoleucine	0.79
Serine	4.57	Leucine	11.43
Glutamine	9.10	Threonine	2.49
Proline	3.52	Phenylalanine	6.11
Glycine	4.26	Histidine	5.76
Alanine	7.33	Lysine	7.83
Cystine	0.56	Arginine	3.78
Valine	6.86		
General components	(%)		
Water	6.92	C. fat	0.09
Dry matter	93.08	C. fiber	0.06
CP	91.85	C. ash	1.06
ME (Kcal/kg)	3,000.0	Na	1.11

These results obtained from Fine Inc. in Korea

Table 1-2-3. Pectoral muscle carnosine, anserine and sum of these content of chickens fed different level of BM for 5 weeks (DM, mg⁻¹/g)

Items	Treatments ¹				SEM
	wks	T1	T2	T3	
Car ²	1wk	4.94 ^b	8.17 ^a	1.77 ^c	0.08
	2wk	11.98 ^{ab}	12.95 ^a	9.04 ^b	0.10
	3wk	13.78 ^b	22.11 ^a	12.53 ^b	0.18
	4wk	24.67 ^a	21.73 ^a	13.53 ^b	0.14
	5wk	15.64 ^b	21.23 ^a	10.54 ^c	0.11
Ans ³	1wk	32.68 ^a	31.32 ^a	19.50 ^b	0.20
	2wk	48.36 ^a	45.76 ^a	50.71 ^a	0.25
	3wk	42.98 ^{ab}	39.74 ^b	49.56 ^a	0.18
	4wk	47.46 ^a	51.15 ^a	54.37 ^a	0.20
	5wk	48.58 ^b	47.00 ^b	59.81 ^a	0.20
Car + Ans	1wk	37.62 ^a	39.49 ^a	21.27 ^b	0.23
	2wk	60.35 ^a	58.71 ^a	59.75 ^a	0.22
	3wk	56.76 ^a	61.85 ^a	62.09 ^a	0.15
	4wk	72.13 ^a	72.87 ^a	67.63 ^a	0.23
	5wk	64.22 ^a	68.23 ^a	70.03 ^a	0.19

¹T1=control diet, T2=control + BM 5%, T3=control + BM 10%, ²Car=carnosine,

³Ans=anserine.

^{a-c} Values with superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

Table 1-2-4. Feed intake, weight gain and feed conversion ratio (Feed/gain) of broiler fed experimental diets from 0 to 5 weeks

Items	Treatment ¹				SEM
	wks	T1	T2	T3	
Feed intake (g/bird)	0-1	125.21 ^a	135.73 ^a	135.94 ^a	3.94
	1-2	390.95 ^a	375.72 ^a	315.36 ^b	3.00
	2-3	652.36 ^a	603.06 ^b	407.64 ^c	6.00
	3-4	919.67 ^a	875.67 ^a	569.17 ^b	9.21
	4-5	654.38 ^{ab}	608.75 ^b	741.57 ^a	15.71
	0-5	2742.56 ^a	2598.92 ^b	2169.67 ^c	17.05
Weight gain (g/bird)	0-1	138.23 ^a	125.63 ^a	84.90 ^b	2.10
	1-2	413.45 ^a	399.40 ^b	323.33 ^c	1.78
	2-3	313.06 ^a	272.36 ^a	77.08 ^b	8.29
	3-4	532.83 ^a	495.67 ^b	288.17 ^c	4.43
	4-5	508.34 ^a	379.17 ^{ab}	318.82 ^b	28.07
	0-5	1905.90 ^a	1672.22 ^b	1092.29 ^c	27.12
FCR (g/g)	0-1	0.91 ^b	1.08 ^b	1.61 ^a	0.06
	1-2	0.95 ^a	0.94 ^a	0.98 ^a	0.01
	2-3	2.08 ^b	2.23 ^b	5.92 ^a	0.48
	3-4	1.73 ^b	1.77 ^b	1.98 ^a	0.01
	4-5	1.29 ^a	1.82 ^a	2.34 ^a	0.18
	0-5	1.39 ^b	1.57 ^b	2.56 ^a	0.12
Mortality (%)	0-4	-	-	-	-
	4-5	-	-	1.33	0.29

¹T1=control diet, T2=control + BM 5%, T3=control + BM 10%

^{a-c} Values with superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

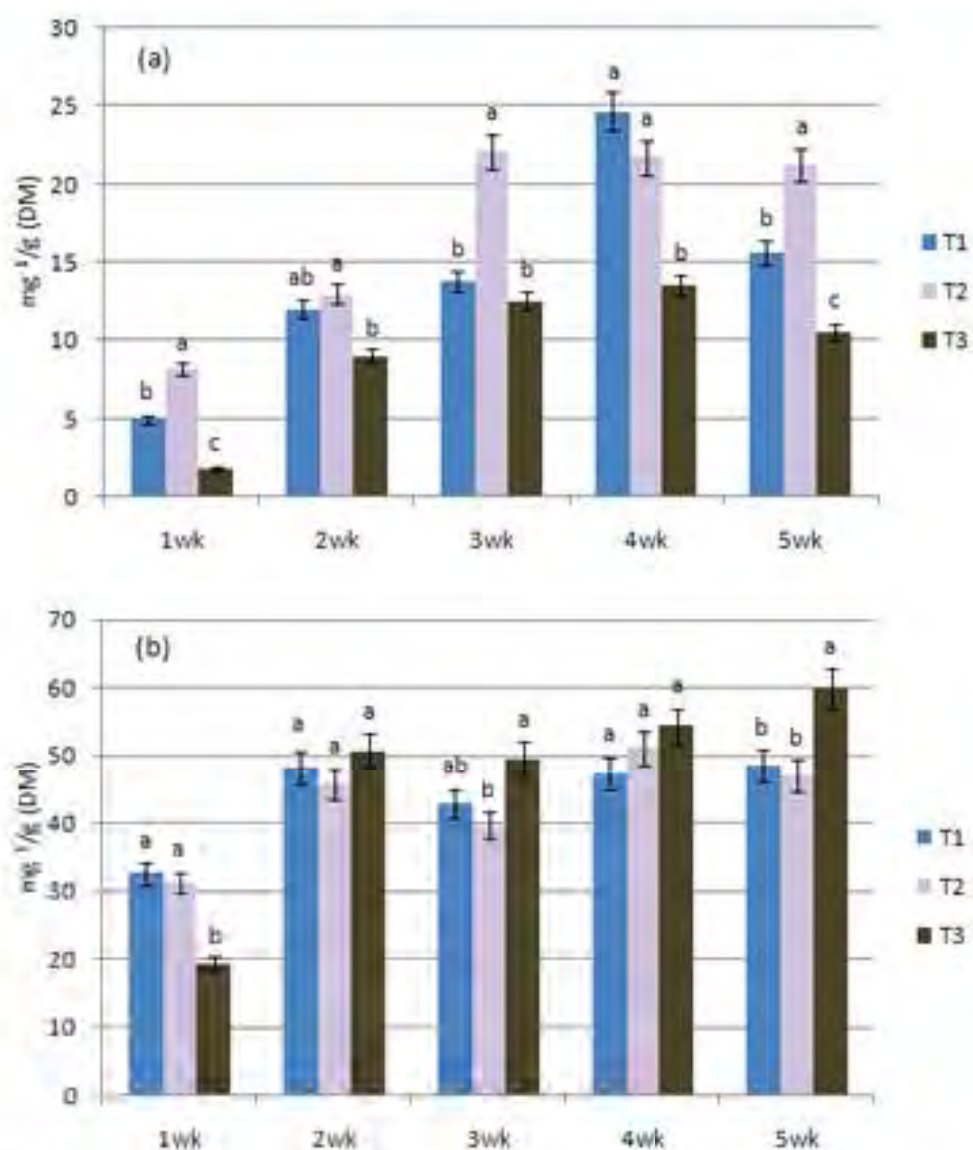


Figure 1-2-1. Content of Car, and Ans, in chicken pectoral muscle

Figs 1(a) and 1(b) are showing carnosine and anserine content, respectively.

T1=control diet, T2=control + BM 5%, T3=control + BM 10%

^{a,b,c} Superscripts above the bars mean significantly different (P<0.05) and any given superscript is applicable only within the given week.

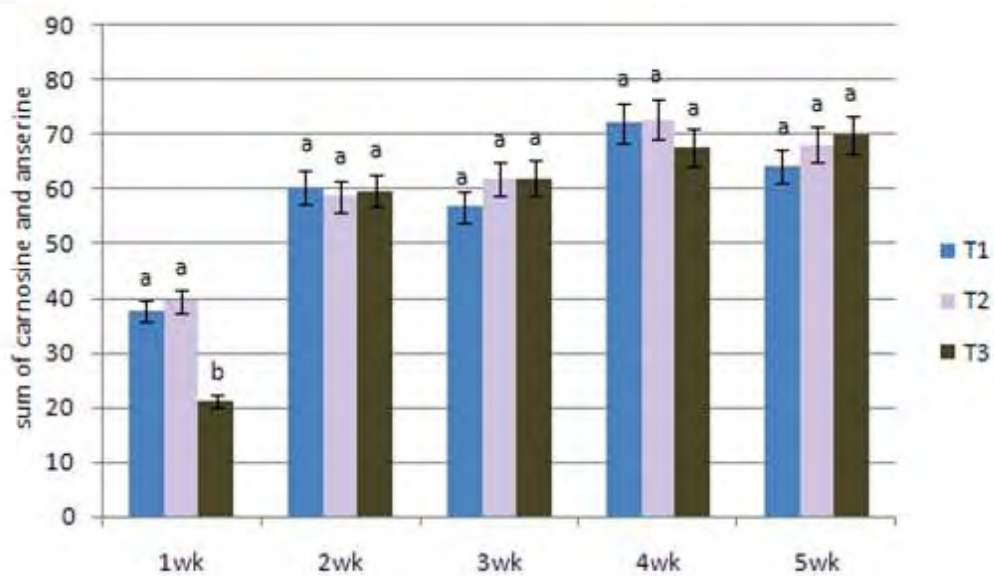


Figure 1-2-2. Sum of carnosine and anserine content

T1=control diet, T2=control + BM 5%, T3=control + BM 10%

^{a,b,c} Superscripts above the bars mean significantly different ($P < 0.05$) and any given superscript is applicable only within the given week.

3. 3차 육계 시험

가. 서 론

앞서 선행되었던 1차 육계시험과 2차 육계시험에서 혈분의 단순첨가 및 isoprotein, isonitrogen의 사료배합에 있어서 혈분첨가 수준이 5% 첨가가 증체와 섭취량에 있어서 가장 좋은 효과를 보였고, 특히 2차 육계시험에서는 carnosine 강화를 위해서는 혈분수준이 5%가 적당하다는 것을 결론지을 수 있었다. 본 시험은 carnosine 구성물질인 β -alanine과 효과적인 carnosine 합성 촉매 역할을 하는 Mg source, Histidine을 첨가하여 carnosine과 anserine합성효과에 대해 알아보기 위한 시험을 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 구성 및 분석항목

갓 부화한 210수 (암. 수 각 105수)의 broiler (Ross종[®])를 사양시험에 이용하였다. 시험 구성은 7 처리구, 3 반복 즉, 대조구(T1), 대조구 +Histidine (2.9g/kg feed), 대조구 + β -Alanine (3.1g/kg feed), 대조구 + Histidine + β -Alanine, 대조구 + Histidine + β -Alanine + MgO (3g/kg feed), 대조구 + blood meal 5%; T6, 대조구 + blood meal 5% + MgO 처리구를 각각 T2, T3, T4, T5, T6, T7로 구분하였다. 각각의 처리구마다 3개의 반복을 두고 반복 당 10수 (암. 수 각 5수)씩 stainless cage (76 cm x 57 cm x 76 cm)에 임의 배치하였으며 물과 사료를 자유 채식 시켰고 전체 시험기간 동안 하루 24시간 점등하였다. 시험개시 후, 매 1주마다 사료 섭취량과 증체량을 기록하였으며 근육 내의 carnosine과 anserine 함량을 분석하기 위하여 cage마다 암. 수 각각 1수씩 도계하여 흉근을 채취하였다. 사료 섭취량, 증체량, 사료 이용률 및 폐사율 검사를 실시하였다. 시험에 사용한 시험 사료의 경우 원료와 아미노산 구성을 Table 1-3-1.과 Table 1-3-2에 공시하였다.

(2) 생산성

증체량은 시험 개시시, 2주차, 4주차(시험종료)에 각각 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정시 사료급여량에 잔량을 제하여 산출하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다. 폐사율은 폐사수수를 생존수수로 나누어 산출하였다.

(3) 재료의 전처리

수거된 각각의 가슴근육 10 g 을 동결시킨 후 진공건조기를 이용하여 72시간 동

안 수분을 제거하는 과정을 거쳤다. 충분히 건조된 샘플을 믹서로 곱게 분쇄한 후 원심 분리용 튜브 (Nalgine) 에 1 g 씩 담고 24 ml 의 증류수와 혼합하였다. 혼합된 샘플을 상온에서 2시간을 방치시키고, 20분간 4분 간격으로 흔들어 근육 내의 수용성 dipeptide인 carnosine과 anserine이 용출되도록 하였다. 그 후 20 분간 11,000×g, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 샘플을 원심분리 하였다. 원심분리가 종료된 후 그 상층액을 core size 0.45 μm의 membrane filter (ADVATEC MFS, Inc. Japan)로 여과한 후 에펜들프 튜브에 여과된 상층액 0.3 ml 과 MeOH 0.9 ml을 혼합하여 냉동실에 12시간 반응시켜 단백질이 영기도록 하였다. 그 후 3 분간 16,000×g, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 다시 샘플을 원심분리 하여 그 상층액을 분리한 뒤 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)의 분석에 이용하였다.

(4) 분석 시약

HPLC standard solution으로 이용하기 위한 *L*-carnosine과 *L*-anserine (SIGMA). HPLC 용매를 구성하는데 사용되는 acetonitrile (ACN), Tetrahydrofuran (THF), acetic acid 와 sample 전처리를 위한 methanol (MeOH) (J.T Baker, HPLC grade), water(J.T Baker, HPLC grade)를 이용하였다.

(5) HPLC 분석

Carnosine과 anserine의 분석은 HPLC를 이용하여 하였다. UV-detector와 automatic injector로 구성된 Varian 920-LC (Varian®,USA)를 사용하였다. Column은 210nm에서 detection할수 있는 ZORBAX Eclipse Plus C-18 column (250 mm × 4.5 mm, 5 μm, Agilent®,USA)를 사용하였다.

분석에 이용된 용매 A의 조성은 5mM sodium 1-heptane-sulfonate, 85% phosphoric acid를 이용하여 pH 2.3의 조건을 가지며 용매 B는 HPLC Water (80%) : MeOH(20%)의 비율로 혼합하여 제조하였다. Column의 온도는 30°C로 고정하고 용매의 유속은 1 ml/min 이며, 1 cycle 은 13분으로 설정하였다.

(6) 통계 분석

시험결과는 General Linear Model (SAS, 1995)을 이용하여 분석하였다. 유의성은 Duncan의 다중범위 검정을 이용하여 $p < 0.05$ 범위에서 측정하였다.

다. 결 과

(1) 생산성

증체량, 사료섭취량, 사료요구율 및 폐사율은 Table 1-3-3에 요약하였다. 증체량의 경우 전 처리구에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 β-Alanine이 들어간 T3,

T4, T5처리구에서 22일령 이후부터 감소하는 경향치를 보였다. 그리고 혈분과 Histidine이 첨가된 T2, T6, T7처리구가 대조구와 다른 처리구에 비해 증가하는 경향치를 보였다. 사료섭취량의 경우 증체량과 매우 비슷한 경향을 보였다. T2의 경우 다른처리구들에 비해 월등히 높은 유의성을 보였다. β -Alanine를 첨가한 처리구들(T3, T4, T5)은 22일령 이후에 사료섭취량이 다른 처리들에 비해 유의적으로 감소하였다. 사료요구율과 폐사율의 경우 대조구와 처리구간에 유의성이 나타나지 않았다. 폐사율의 경우 T2, T3, T4, T6처리가 다른 처리구에 비해 높은 수치를 나타냈지만, 반복당 10수의 개체중 실험시작시부터 5주차(종료시)까지 6수의 개체를 매주 1수씩 carnosine과 anserine분석을 위해 도계를 하고 시작시 반복당 개체수가 적어서 1수가 폐사를 하면 폐사율이 높게 나타났다.

(2) 계육내 carnosine, anserine 함량

가슴근육내 carnosine과 anserine함량을 Table 1-3-4.에 요약하였다. carnosine함량은 전 처리구들 사이에서 유의적으로 차이가 보였다. 모든 처리구의 carnosine함량은 시간이 지나에 따라 증가하였다. 특히 T4처리구의 carnosine함량은 측정시마다 다른 처리구에 비해 높은 함량을 보였다. Histidine과 β -Alanine의 첨가에 따라 carnosine함량에 차이를 보였다. Histidine과 β -Alanine을 첨가한 carnosine함량 증가에 대한 결과는 histidine과 β -Alanine을 각각 첨가한 T2, T3처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였고 histidine을 첨가한 T2처리구가 β -Alanine을 첨가한 T3처리구에 비해 유의적으로 높은 carnosine함량을 보였다. 또한 MgO를 첨가하여 carnosine함량 증가에 대한 비교를 해본 결과, T4처리구에 비해 T5처리구가 1.5% 증가하였고, T6처리구에 비해 T7처리구가 3.1% 증가하였다. 가슴근육에서 3주차 이후의 anserine함량은 유의적으로 처리구들간에 차이가 없었다. 하지만 carnosine함량에 비해 anserine함량이 3배정도 많은 것을 알수 있었다.

라. 고 찰

증체량의 경우 전 처리구에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 β -Alanine이 들어간 T3, T4, T5처리구에서 22일령 이후부터 감소하는 경향치를 보였다. 그리고 혈분과 Histidine이 첨가된 T2, T6, T7처리구가 대조구와 다른 처리구에 비해 증가하는 경향치를 보였다. 사료섭취량의 경우 증체량과 매우 비슷한 경향을 보였다. T2의 경우 다른처리구들에 비해 월등히 높은 유의성을 보였다. β -Alanine를 첨가한 처리구들(T3, T4, T5)은 22일령 이후에 사료섭취량이 다른 처리들에 비해 유의적으로 감소하였다. Tomonaga 등(2005)의 β -Alanine 공급에 따라 증체량과 사료요구율이 감소한다고 보고되었다. β -Alanine의 첨가가 개체의 스트레스에도 관여하여 스트레스성의 대사를 줄이고 양계에서 사료효율을 향상시킨다는 보고되었다(Tomanaga 등, 2004). 특히 histidine은 어린아이와 새끼rat에게 필수적인 아미노산이다(Snyderman 등, 1963). 육계

의 생산성에서 histidine의 공급에 관한 연구(Kelly 등, 1977)는 histidine을 0.4% 사료에 첨가했을 경우 4.8%의 증체량이 개선된다고 하였다. 하지만 Haug 등(2008)은 0.3%의 histidine 첨가가 사료섭취량과 증체량을 각각 10%와 15% 줄인다고 하였다. 혈분은 조단백질함량과 아미노산함량이 높다. 특히 histidine의 함량이 높지만(Breck 등, 2003; Dahmer 등, 1972) 기호성이 떨어지는 문제가 있다(Tyus 등, 2008). 그리고 양계와 육계사료에서 아미노산 이용율이 떨어지는 문제가 있다. Hassan 등(1974)의 보고에 의하면 6%의 혈분첨가가 육계의 성장에 사용된다고 하였다. carnosine함량은 전 처리구들 사이에서 유의적으로 차이가 보였다. 모든 처리구의 carnosine함량은 시간이 지나에 따라 증가하였다. 특히 T4처리구의 carnosine함량은 측정시마다 다른 처리구에 비해 높은 함량을 보였다. Histidine과 β -Alanine의 첨가에 따라 carnosine함량에 차이를 보였다. Histidine과 β -Alanine을 첨가한 carnosine함량 증가에 대한 결과는 histidine과 β -Alanine을 각각 첨가한 T2, T3처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였고 histidine을 첨가한 T2처리구가 β -Alanine을 첨가한 T3처리구에 비해 유의적으로 높은 carnosine함량을 보였다. 사료에 kg당 1g의 histidine을 첨가하면 carnosine은 64%가 증가하고, anserine은 10%가 증가한다는 보고가 있었다(Amend 등, 1979). β -Alanine을 첨가하였을 때 근육내에서 carnosine과 anserine이 증가하는 보고가 있었다(Tomonags 등, 2005). 육계의 가슴근육내 carnosine함량이 증가하는 반면 사료에 β -Alanine을 kg당 0.38% 첨가시 anserine의 함량은 감소하는 경향치를 보였다. 또한 MgO를 첨가하여 carnosine함량 증가에 대한 비교를 해본 결과, T4처리구에 비해 T5처리구가 1.5% 증가하였고, T6처리구에 비해 T7처리구가 3.1% 증가하였다. 가슴근육에서 3주차 이후의 anserine함량은 유의적으로 처리구들간에 차이가 없었다. 하지만 carnosine함량에 비해 anserine함량이 3배정도 많은 것을 알수 있었다.

Table 1-3-1. Formula and composition of experimental broiler diets.

Ingredients, %	Treatments ¹						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Corn	23.40	23.40	23.40	23.40	23.40	22.23	22.23
Wheat	38.87	38.84	38.83	38.80	38.80	36.93	36.92
Soybean meal	27.10	27.10	27.10	27.10	27.10	25.75	25.75
Blood meal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00
Animal fat	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.11	4.11
Rape seed meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	2.85	2.85
Dicalcium phosphate	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
Calcium carbonate	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61
Lysine 78%	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25
Sodium chloride	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25
Threonine 10%	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24
Sodium hydrogen carbonate	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19
Broiler premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09
Anticoccidial drug	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
NSP enzyme	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
Phytase	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
MgO	-	-	-	-	+	-	+
Histidine	-	+	-	+	+	-	-
β-alanine	-	-	+	+	+	-	-
Total				- 100	-		

Calculated composition							
ME, kcal/kg	3,110	3,110	3,110	3,110	3,110	3,106	3,106
Crude protein	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	22.61	22.61
Calcium	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.86	0.86
Methionine + Cystine	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	1.47	1.47

Assay composition

Moisture	8.33	8.33	8.33	8.33	8.33	10.55	10.55
Crude protein	19.23	19.23	19.23	19.23	19.23	23.13	23.13
Crude fat	8.39	8.39	8.39	8.39	8.39	5.90	5.90
Crude fiber	3.07	3.07	3.07	3.07	3.07	3.30	3.30
Crude ash	6.06	6.06	6.06	6.06	6.06	5.60	5.60

¹T1; control diet, T2; control diet + histidine, T3; control diet + β -alanine, T4; control diet + histidine + β -alanine, T5; control diet + histidine + β -alanine + MgO, T6; control diet (95%) + blood meal (5%), T7; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

²Provides per kg of diet: vitamin A, 9,000IU; vitamin D₃, 2,500IU; vitamin E, 20IU, vitamin K₃, 1.2mg; thiamin, 1.2mg; riboflavin, 4mg; niacin, 20mg; pyridoxine, 8mg; choline, 1,200mg; biotin, 0.5mg; folic acid, 0.5mg; Cu, 10mg; Mn, 105mg; Se, 0.25mg; Zn, 75mg; I, 1mg; Fe, 50mg; Co, 0.1mg.

Table 1-3-2. Amino acids composition¹of experimental broiler diets and bloodmeal.

Amino acids	Treatments ²							Blood meal
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	% (percentage of total amino acids)							
Aspartic acid	8.83	8.67	8.93	8.87	8.60	9.28	8.75	9.60
Threonine	4.35	4.00	4.00	3.50	3.44	4.05	3.47	4.33
Serine/Glutamin	19.50	18.88	18.72	19.54	19.35	19.41	20.95	12.77
Proline	1.04	1.02	0.95	1.03	1.06	1.05	0.92	1.74
Glycine	11.86	14.80	13.11	13.74	13.17	12.21	13.97	8.84
Alanine	8.24	8.90	10.11	9.11	9.54	8.66	8.83	7.73
Cysteine	4.43	4.32	4.41	4.26	4.26	5.48	4.71	6.20
Valine	3.13	2.97	2.80	2.93	2.89	2.84	2.39	2.39
Methionine	3.21	2.98	3.22	2.97	2.91	2.63	2.32	2.32
Isoleucine	10.2	9.74	10.1	9.62	9.65	10.90	10.20	10.50
Leucine	2.77	2.70	2.76	2.71	2.68	2.67	2.45	4.10
Tyrosine	3.36	3.29	3.36	3.31	3.32	3.74	3.40	7.84
Phenylalanine	2.69	4.38	3.70	4.07	3.87	3.80	3.26	5.67
Histidine	4.85	5.17	4.28	5.13	5.72	6.10	5.94	6.33
Lysine	2.12	2.29	1.95	1.94	1.78	1.66	1.63	1.48
Arginine	2.24	2.10	2.22	2.08	2.04	2.04	1.72	3.73

¹Analyzed value

²T1; control diet, T2; control diet + histidine, T3; control diet + β -alanine, T4; control diet + histidine + β -alanine, T5; control diet + histidine + β -alanine + MgO, T6; control diet (95%) + blood meal (5%), T7; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

Table 1-3-3. Weight gain, feed intake, feed conversion rate, and mortality in broilers fed experimental diets.

Parameters	Treatments ¹							<i>P</i> -value	SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
Weight gain, g/bird									
1 - 21d	890.3	896.4	901.6	906.3	850.3	822.6	869.6	0.6349	36.24
22 - 32d	825.9	981.6	771.4	825.4	723.2	986.0	861.6	0.8327	148.09
1 - 32d	1716.2	1878.0	1673.0	1731.5	1573.5	1808.7	1731.2	0.7905	135.20
Feed intake, g/bird									
1 - 21d	1146.3 ^a	1186.1 ^a	1158.2 ^a	1160.3 ^a	1080.6 ^b	1083.9 ^b	1087.1 ^b	0.0046	18.96
22 - 32d	1406.7 ^{abc}	1615.0 ^a	1098.9 ^d	1158.5 ^{cd}	1198.0 ^{bcd}	1482.5 ^a	1447.9 ^{ab}	0.0041	82.13
1 - 32d	2553.0 ^{ab}	2801.1 ^a	2257.1 ^b	2318.9 ^b	2278.5 ^b	2566.4 ^{ab}	2535.0 ^{ab}	0.0098	93.46
Feed/Gain, g/g									
1 - 21d	1.29	1.35	1.29	1.28	1.27	1.32	1.25	0.9308	0.060
22 - 32d	1.72	1.77	1.47	1.54	1.66	1.57	1.69	0.9094	0.188
1 - 32d	1.49	1.50	1.36	1.37	1.45	1.43	1.47	0.6723	0.081
Mortality, %	0.00	6.67	3.33	3.33	0.00	3.33	0.00	0.4628	2.520

¹T1; control diet, T2; control diet + histidine, T3; control diet + β -alanine, T4; control diet + histidine + β -alanine, T5; control diet + histidine + β -alanine + MgO, T6; control diet (95%) + blood meal (5%), T7; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

^{a-d} Values in the same row with no common superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1-3-4. Content of carnosine and anserine in broiler breast muscles.

Age, d	Treatments ¹							<i>p</i> -value	SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
Carnosine (mg/g, DM)									
7	5.72 ^c	6.65 ^c	5.78 ^c	10.64 ^a	10.07 ^{ab}	7.73 ^{bc}	5.83 ^c	0.0002	0.84
14	8.42 ^c	10.37 ^{bc}	9.96 ^{bc}	13.18 ^a	13.02 ^a	10.45 ^{bc}	11.12 ^{ab}	0.0002	0.69
21*	12.26 ^{de}	13.38 ^{cd}	11.62 ^e	16.86 ^a	15.15 ^b	14.36 ^{bc}	14.10 ^{bc}	<0.0001	0.56
28*	12.46 ^{bc}	13.01 ^{bc}	13.28 ^{bc}	17.16 ^a	13.96 ^{bc}	11.89 ^c	14.34 ^b	0.0005	0.75
32	13.86 ^c	17.48 ^{abc}	14.78 ^{bc}	18.72 ^a	19.01 ^a	16.93 ^{abc}	17.46 ^{ab}	0.0396	1.11
Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001		
Anserine (mg/g, DM)									
7	18.78 ^{ab}	20.29 ^{ab}	18.00 ^a	21.37 ^a	21.20 ^a	14.50 ^c	17.64 ^b	0.0001	0.94
14	25.94 ^{ab}	27.34 ^a	25.62 ^{ab}	26.28 ^{ab}	24.59 ^{bc}	24.77 ^{bc}	22.68 ^c	0.0058	0.77
21	26.40 ^{bc}	28.19 ^{ab}	25.66 ^c	25.34 ^c	30.34 ^a	24.65 ^c	25.82 ^{bc}	0.0002	0.79
28	26.86	26.32	25.68	27.98	26.88	28.14	25.40	0.3606	1.01
32	36.10	35.53	37.94	37.58	37.74	30.25	33.40	0.2746	2.45
Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		
Carnosine + Anserine (mg/g, DM)									
7	24.49 ^{bc}	24.65 ^{bc}	26.06 ^b	32.02 ^a	31.26 ^a	22.24 ^c	23.48 ^{bc}	<0.0001	1.03
14	34.36 ^{cd}	35.98 ^{bcd}	37.29 ^{abc}	39.46 ^a	37.61 ^{ab}	35.20 ^{bcd}	33.80 ^d	0.0018	0.94
21	38.66 ^c	39.03 ^c	39.80 ^{bc}	42.20 ^b	45.49 ^a	39.01 ^c	39.93 ^{bc}	<0.0001	0.92
28	41.05	40.60	41.43	43.51	42.80	42.12	41.57	0.4530	1.02
32	49.96 ^{ab}	53.01 ^{ab}	52.72 ^{ab}	56.30 ^a	56.75 ^a	47.18 ^b	51.16 ^{ab}	0.0464	2.11
Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		

¹T1; control diet, T2; control diet + histidine, T3; control diet + β-alanine, T4; control diet + histidine + β-alanine, T5; control diet + histidine + β-alanine + MgO, T6; control diet (95%) + blood meal (5%), T7; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

^{a-e}Values in the same row with no common superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

*Contrast : T4 vs T5 (21d, *p* = 0.04; 28d, *p* = 0.02); T6 vs T7 (28d, *p* = 0.04).

제 2 절 혈분의 급여가 산란 노계의 생산성과 난품질, carnosine 함량에 미치는 영향

가. 서론

본 연구는 혈분과 마그네슘의 수주별 첨가에 따른 산란 노계의 가슴근육내 carnosine 증가효과를 검증하며 동시에 산란계의 생산성 및 난품질에 미치는 영향을 확인하기 위해서 수행되었다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 구성 및 분석항목

95주령의 산란계(Hy-Line[®] Brown) 480수를 2단 2열 A형 cage(30×40×30 cm)에 서 사양시험에 이용하였다. 시험 구성은 6처리 5반복, 반복당 16수씩 완전 임의 배치하였으며 각 처리당 대조구 (T1), 약 100% 시판사료 + 3g/kg(feed) MgO (T2), 97.5% 시판사료 + 2.5% 혈분 (T3), 95% 시판사료 + 5% 혈분(T4) 97.5% 시판사료 + 2.5% 혈분 + 3g/kg(feed) MgO (T5), 95% 시판사료 + 5% 혈분 + 3g/kg(feed) MgO (T6)로 조성된 사료를 준비하였다. Mg의 함량은 NRC(1994)요구량의 3배인 1,800mg를 MgO형태로 첨가하였다. 시험기간은 총 5주이며 사료와 물은 자유채식 하에 하였으며 점등시간은 산란계 점등관리 프로그램에 맞추어 16시간 점등하였다. 혈분의 아미노산 성분은 Table 2-1에 요약하였다. 시험사료의 구성서분은 Table 3-2에 요약하였다.

(2) 산란율, 난중, 연 파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율

산란율(Hen-day production, Hen-house production), 평균 난중 (Egg weight), 연 파란율(Soft & broken egg production)은 매일 오후 4시에 측정하여 주별 평균을 계산하였고 사료 섭취량(Feed intake)는 주 1회 조사하여 사료 요구율(Feed conversion rate)을 산출하였다.

(3) 난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit

주 1회씩 총 6회(0, 1, 2, 3, 4, 5week)에 걸쳐 임의적으로 반복당 10개씩 처리당 50개 총 200개의 계란으로 난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit 등의 품질검사를 실시하였다. 난각강도와 난각두께는 Texture Analyser(Stable micro system., UK)와 Dial Pop Guage(Model 7360, Mitutoyo Co, Kwasaki 213, Japan)을

이용해 측정하였다. 난각색은(CR-400, Minolta Co. LTD., Japan)을 이용하여 측정하였다. 난황색은 Color fan(egg yolk; Roche Co, Switzerland)을 이용해 측정하였다. Haugh unit는 HU formula(Eisen et al., 1962)에 기초해 측정한 난백고를 계산하여 측정하였다.

(4) 재료의 전처리

수거된 각각의 가슴근육과 다리근육 5~10 g 을 동결시킨 후 진공건조기를 이용하여 48시간 동안 수분을 제거하는 과정을 거쳤다. 충분히 건조된 샘플을 믹서로 곱게 분쇄한 후 원심 분리용 튜브 (Nalgine) 에 1 g 씩 담고 24 ml 의 증류수와 혼합하였다. 혼합된 샘플을 상온에서 20분간 4분 간격으로 흔들여 근육 내의 수용성 dipeptide인 carnosine과 anserine이 용출되도록 하였다. 그 후 20 분간 10,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 샘플을 원심분리 하였다. 원심분리가 종료된 후 그 상층액을 core size 0.45 µm의 membrane filter (ADVATEC MFS, Inc. Japan)로 여과한 후 에펜들프 튜브에 여과된 상층액 0.3 ml 과 MeOH 0.9 ml을 혼합하여 냉동실에 30분간 반응시켜 단백질이 엉기도록 하였다. 그 후 3 분간 12,000 rpm, 지름 99 mm, 4 °C의 조건으로 다시 샘플을 원심분리 하여 그 상층액을 분리한 뒤 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)의 분석에 이용하였다.

(5) 분석 시약

HPLC standard solution으로 이용하기 위한 *L*-carnosine과 *L*-anserine (SIGMA). HPLC 용매를 구성하는데 사용되는 acetonitrile (ACN), Tetrahydrofuran (THF), acetic acid 와 sample 전처리를 위한 methanol (MeOH) (J.T Baker, HPLC grade). HPLC 분석용 반응용액제조를 위한 O-phthaldialdehyde (OPA), 2-Mercaptoethanol (SIGMA).

(6) HPLC 분석

Carnosine과 anserine의 분석은 HPLC를 이용하여 하였다. OPA- pre-column reaction 방식을 이용하여 샘플을 2분간 OPA solution과 반응시킨 후 이용 하였다. HPLC는 pump 2개 (GILSON Model 305, France), fluorescence detector (GILSON Model 121, France) 등으로 구성 하였다. Column은 amino acid 분석용 (Higgins, CS-2548-C185 / CLIPEUS C18)을 이용하였다. 분석에 이용된 용매 A의 조성은 50 mM acetic acid, pH 4.37의 조건을 가지며 용매 B는 ACN (70 %) : MeOH (25 %) : THF (5 %) 의 비율로 혼합하여 제조하였다. 용매의 유속은 1 ml/min 이며, 1 cycle 은 40분으로 설정하였다. 용매간의 농도 기울기는, 용매 B 18 % (0 ~ 25 min), 100 % (26 ~ 31 min), 18 % (32 ~ 40 min)의 조건으로 하였다.

(7) 통계 분석

시험결과는 General Linear Model (SAS, 1995)을 이용하여 분석하였다. 유의성은 Duncan의 다중범위 검정을 이용하여 $p < 0.05$ 범위에서 측정하였다.

다. 결 과

(1) 산란율, 난중, 연 파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율

산란율, 난중, 연 파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율은 Table 2-3에 요약하였다. 산란율의 경우 대조구와 처리구들간에 유의적 차이가 없었다. 난중의 경우 대조구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높았다. 사료섭취량과 사료효율, 폐사율은 유의적 차이가 없었으며, 연파란율의 경우 T4와 T6이 낮게 나타났다.

(2) 난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit

난각강도, 난각색, 난각두께, 난황색, Haugh unit는 Table 2-3에 요약하였다. 난각강도의 경우 MgO를 첨가한 T2, T5, T6처리구가 MgO를 첨가하지 않은 다른 처리구에 비해 높은 수치를 보였다. 난각색과 난각두께의 경우 모든 처리구에서 유의적 차이가 없었다. 난황색의 경우 대조구와 MgO를 첨가한 T2처리구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높았으며 Haugh unit의 경우 대조구와 모든 처리구에 유의적 차이는 없었다.

(3) 계육 내 carnosine, anserine 함량

노계의 가슴 근육내 carnosine 함량은 Table 2-4에 요약하였다. 전기간 모든 처리구에서 carnosine 함량은 유의적 차이가 없었다. contrast analysis 결과 T6처리구는 1주, 2주, 4주차의 T5처리구보다 carnosine 함량이 높았으며, 2주차의 T4처리구와 1주차의 T1보다 높은 carnosine 함량을 보였다.

라. 고 찰

본 연구는 혈분과 마그네슘의 수준별 첨가에 따른 산란 노계의 흉근내 carnosine 증가효과를 검증하며 동시에 산란계 생산성 및 난품질에 미치는 영향을 확인하기 위해서 수행되었다. 결과를 보면 carnosine 함량에 있어서는 시험 전 기간에 걸쳐서 모든 처리구간에 유의적인 함량의 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 T5 처리구를 제외한 나머지 동일한 처리구를 개별로 볼 때는 기간이 1주에서 5주로 증가할수록 carnosine 함량도 고도로 유의한 ($P < 0.01$ 또는 $P < 0.05$) 직선적 감소를 보였다. 이것은 carnosine 함량이 산란계의 노화가 심화될수록 감소한다는 것을 보여주는 것이다. 산란 성적 중 난중은 T1처리구가 유의적으로 ($P < 0.01$) 무거웠으며 연파란율은 T6처리구가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다. 이 밖에 사료섭취량, 사료전환율, 헨데이, 헨하우스 산란율, 폐사율 항목에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 난품질 항목에 있어서는 마그네슘이 첨가

된 T2, T5, T6 처리구에서 난각강도가 고도로 유의하게 ($P<0.01$) 강화되었다. 난황색은 T1 처리구와 T2 처리구가 유의적으로 ($P<0.05$) 좀더 진한 색을 나타내었다. 난각색과 난각두께 및 호우유닛은 혈분과 마그네슘 첨가에 따른 어떠한 영향도 받지 않았다. 결론적으로 혈분과 마그네슘은 산란노계의 근육내 carnosine 함량을 변화시키지는 않았으며 performance 및 난품질에 있어서도 혈분에 기인한 유의적 특성을 확인 할 수 없었다. 하지만 본 시험에서는 노화가 진행되는 동안 carnosine 함량이 감소한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 마그네슘의 첨가가 난각을 강화시키는데 우수한 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 2-1. General and amino acid compositions of blood meal* (BM).

Compositions			
amino acids composition (g/100 CP)			
Aspartic acid	10.47	Methionine	0.22
Threonine	3.45	Isoleucine	0.79
Serine	4.57	Leucine	11.43
Glutamine	9.10	Tyreonine	2.49
Proline	3.52	Phenylalanine	6.11
Glycine	4.26	Histidine	5.76
Alanine	7.33	Lysine	7.83
Cystine	0.56	Arginine	3.78
Valine	6.86	Total	88.53
General compositions			
Moisture, %	6.92	C.fat, %	0.09
DM, %	93.08	C.fiber, %	0.06
CP, %	91.85	C.ash, %	1.06
ME, kcal/kg	3,000	Na, %	1.11

*The data was obtained from the BM supplier (Fine Inc. Ansong-si, Kyounggi-do, RepublicofKorea).

Table 2-2. Ingredients and composition of experimental diets with different treatment.

	Treatment ¹					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Ingredients (%)						
Corn (USA,No3)	54.80	54.80	53.43	52.06	53.43	52.06
Soybean meal (local)	11.00	11.00	10.73	10.45	10.72	10.45
Soybean meal (import)	11.43	11.43	11.14	10.86	11.14	10.86
Corn gluten, local (61%)	1.12	1.12	1.09	1.07	1.09	1.07
Corn gluten, import (61%)	1.40	1.40	1.37	1.33	1.36	1.33
Animal fat	2.50	2.50	2.44	2.38	2.44	2.37
Soy-unextract	5.00	5.00	4.88	4.75	4.87	4.75
DCP	1.72	1.72	1.68	1.64	1.68	1.64
Limestone	9.68	9.67	9.43	9.19	9.43	9.19
Salt	0.25	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24
Cholin-Cl-50 %	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Methionine-99%	0.95	0.95	0.93	0.90	0.93	0.90
Mineral premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09
Blood meal (90% C.P)	0.00	0.00	2.50	5.00	2.50	5.00
MgO	-	+	-	-	+	+
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Composition³						
ME (kcal/kg)	2,800	2,800	2,805	2,810	2,805	2,810
C.P (%)	18.00	18.00	19.85	21.69	19.85	21.69
Ca (%)	4.00	4.00	3.90	3.80	3.90	3.80
P. available (%)	0.40	0.40	0.40	0.39	0.40	0.39

¹T1 = 100 % basal diet; T2 = 100% basal diet + MgO; T3 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM; T4 = 95 % basal diet + 5 % BM; T5 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM + MgO; T6 = 95 % basal diet + 5 % BM + MgO.

²Contains per kg : vit A, 12,000,000IU; vit D₃, 2,500,000IU ; vit E, 20,000IU; vit K₃, 1,800mg; vit B₁, 2,000mg; vit B₂, 6,000mg; vit B₆, 3,000mg; vit B₁₂, 20,000mg; Ca-pantothenicacid, 10,000mg; Folicacid, 1,000mg; Oxyzero, 6,000mg; Niacin, 25,000mg; Biotin, 50mg; I, 1,000mg; Fe, 50,000mg; Mn, 65,000mg; Zn, 65,000mg; Cu, 5,000mg; Co, 250mg; Se, 150mg.

³Calculated composition.

Table 2-3. Layer performance and overall egg quality

Parameter	Treatments ¹						SEM (n=5)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
----- Layer performance -----							
Hen-day egg production, % ²	66.74	64.74	62.63	64.29	61.50	64.28	2.787
Hen-House egg production, % ³	66.72	64.74	62.63	64.29	60.47	64.22	2.777
Egg weight	71.45 ^A	69.02 ^C	70.69 ^{AB}	70.13 ^{ABC}	69.69 ^{BC}	71.00 ^{AB}	0.494
Feed intake, g/day	117.84	116.24	115.88	113.20	116.33	114.66	1.795
Feed Conversion, g/100g egg mass	2.47	2.57	2.65	2.56	2.73	2.60	0.120
Soft and broken egg, %	0.85 ^{ab}	1.43 ^a	1.09 ^a	0.46 ^b	1.37 ^a	0.33 ^b	0.206
Mortality, %	1.25	-	-	-	1.25	2.50	0.955
----- Overall egg quality -----							
Eggshell strength, kg/cm ³	1.83 ^B	2.16 ^A	1.94 ^{AB}	1.80 ^B	2.17 ^A	2.18 ^A	0.097
Eggshell color	10.26	10.20	10.09	10.15	10.37	10.19	0.126
Eggshell Thickness, mm	0.40	0.39	0.39	0.39	0.39	0.40	0.002
Egg yolk color	9.87 ^a	9.85 ^a	9.68 ^{ab}	9.59 ^{ab}	9.56 ^{ab}	9.47 ^b	0.106
Haugh unit ⁴	76.21	77.47	76.39	78.58	76.41	78.44	1.048

^{a-c} Within a row, means without a common superscript differ at $P < 0.05$; ^{A-C} Within a row, means without a common superscript differ at $P < 0.01$.

¹ T1 = 100 % basal diet; T2 = 100% basal diet + MgO; T3 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM; T4 = 95 % basal diet + 5 % BM; T5 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM + MgO; T6 = 95 % basal diet + 5 % BM + MgO.

² Total number of eggs / number of live layers x 100

³ Total number of eggs / number of layers housed x 100

⁴ Haugh unit = $100 \log [H - (1.7 \times W^{0.37} + 7.57)]$, where H refers to albumen height (mm) and W refers to measurement of egg weight (g).

*Contrast : No MgO treatments (T1, T3, and T4) vs. MgO treatments (T2, T5, and T6), $P = 0.0001$.

Table 2-4. The effect of blood meal (BM) and MgO on the carnosine content in chicken breast muscle of spent laying hens (CBM) (mg/g, DM).

Wk	Treatments ¹						SEM (n=5)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
*1	32.23	31.44	32.64	35.16	28.06	35.11	2.305
*2	25.33	27.61	27.67	24.15	24.55	30.23	1.650
3	24.36	27.72	24.92	25.34	24.03	26.12	1.963
*4	23.55	24.89	22.81	24.40	21.59	25.60	1.263
*5	21.80	24.36	26.05	20.57	24.84	22.71	1.930
Mean	21.21	22.67	22.35	20.22	20.83	23.28	0.926
Linear	<.001	0.021	0.006	<.0001	NS	<.0001	
Quadratic	NS	NS	0.023	0.013	NS	NS	

¹ T1 = 100 % basal diet; T2 = 100% basal diet + MgO; T3 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM; T4 = 95 % basal diet + 5 % BM; T5 = 97.5 % basal diet + 2.5 % BM + MgO; T6 = 95 % basal diet + 5 % BM + MgO.

NS : Not significant

*Contrast : 1stwk;T5vs.T6,P=0.044

2ndwk;T5vs.T6,P=0.03, T4 vs. T6, P=0.027, T1 vs. T6, P=0.018.

4thwk;T5vs.T6,P=0.050

(contrasted list : 3 vs. 4, 5 vs. 6; 3 vs. 5, 4 vs. 6, 1 vs. 2; 1 vs. 3, 1 vs. 4; 1 vs. 5, 1 vs. 6)

제 3 절 혈분의 급여가 돈육내 carnosine과 anserine 함량에 미치는 영향

가. 서론

인체 건강에대하 끝없는 관심으로 전 세계적으로 이미 다양한 종류의 건강보조식품이 출시되고 있는 상황에서 유러이나 일본 등지에서 십 수년 전부터 각광받고 있는 carnosine을 축산에 접목시킴으로써 새로운 브랜드육을 생산하기 위해 앞서 양계 시험을 실시하였다. 앞서 선행되었던 육계 시험에서와 동일한 수준의 histidine, β -alanine, 혈분을 양돈에서도 육계와 동일한 혈분과 MgO의 효과를 얻을수 있을지 검증하기 위한 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 구성 및 분석항목

시험동물은 121일령(개시체중 $61\pm 8\text{kg}$)인 3원교잡종(Landrace \times Yorkshire \times Duroc) 육성돈 40두를 공시하여 8주간 사양시험을 실시하였다. 시험 구성은 5 처리구, 8 반복 즉, 대조구(T1), 평균체중 83kg일 때 control diet에서 control diet + BM 5%로 교체한 처리구(T2), 평균체중 83kg일 때 control diet에서 control diet + BM 5% + MgO로 교체한 처리구(T3), control diet + BM 5%(T4), control diet + BM 5% + MgO(T5)로 구분하였다. Mg의 함량은 NRC(1988)의 4배인 3,020mg/kg을 MgO형태로 공급하였다. 사료의 구성은 Table3-1에 요약하였으며 시험사료와 혈분, MgO의 아미노산 구성은 Table 3-2에 요약하였다. 물과 사료는 자유채식하게 하였다.

(2) 돈육품질(pH, 색도, 경도, 수분손실율)

도축장에서 도축후 *Longissimus dorsi* muscle(LD, From 9thto10thrib)과 *vastus intermedius*(VI) muscle을 샘플링하여 carnosine과 anserine의 함량을 분석한다. pH의 경우 도축후 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 102시간에 pH meter(Phi501 Beckman Coulter, USA)를 이용하여 측정하였다. 샘플의 표면에 칼집을 내어 pH측정과 마찬가지로 38시간부터 102시간까지 8시간 간격으로 colorimeter (Model No; CM508I Minolta, Japan. Lense; 21171016, d/8 \varnothing 8mm, Japan, SCI/SCE)를 이용하여 측정하였다. 4°C에 저장된 LD muscles을 이용하여 경도측정(Model T2100C, Food Technology Corp., Rockville, MD, USA)을 하였다. 경도측정시 Texture analyzer condition은 Table 3-3에 요약하였다. 수분손실율의 경우 Honikel

method(1998)를 사용하였다. 샘플을 50~100g 측정하고 4~6℃에서 폴리에틸렌으로 씌워 38시간 후에 샘플 무게를 측정해 손실율을 알아보았다.

(3) 재료의 전처리

수거된 각각의 LD muscle과 VI muscle을 10 g씩 동결시킨 후 진공건조기를 이용하여 72시간 동안 수분을 제거하는 과정을 거쳤다. 충분히 건조된 샘플을 믹서로 곱게 분쇄한 후 원심 분리용 튜브 (Nalgine) 에 1 g 씩 담고 24 ml 의 증류수와 혼합하였다. 혼합된 샘플을 상온에서 2시간을 방치시키고, 20분간 4분 간격으로 흔들어서 근육 내의 수용성 dipeptide인 carnosine과 anserine이 용출되도록 하였다. 그 후 20 분간 11,000×g, 지름 99 mm, 4 ℃의 조건으로 샘플을 원심분리 하였다. 원심분리가 종료된 후 그 상층액을 core size 0.45 μm의 membrane filter (ADVATEC MFS, Inc. Japan)로 여과한 후 에펜돌프 튜브에 여과된 상층액 0.3 ml 과 MeOH 0.9 ml을 혼합하여 냉동실에 12시간 반응시켜 단백질이 엉기도록 하였다. 그 후 3 분간 16,000×g, 지름 99 mm, 4 ℃의 조건으로 다시 샘플을 원심분리 하여 그 상층액을 분리한 뒤 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)의 분석에 이용하였다.

(4) 분석 시약

HPLC standard solution으로 이용하기 위한 *L*-carnosine과 *L*-anserine (SIGMA). HPLC 용매를 구성하는데 사용되는 acetonitrile (ACN), Tetrahydrofuran (THF), acetic acid 와 sample 전처리를 위한 methanol (MeOH) (J.T Baker, HPLC grade), water(J.T Baker, HPLC grade)를 이용하였다.

(5) HPLC 분석

Carnosine과 anserine의 분석은 HPLC를 이용하여 하였다. UV-detector와 automatic injector로 구성된 Varian 920-LC (Varian®,USA)를 사용하였다. Column은 210nm에서 detection할수 있는 ZORBAX Eclipse Plus C-18 column (250 mm × 4.5 mm, 5 μm, Agilent®,USA)를 사용하였다.

분석에 이용된 용매 A의 조성은 5mM sodium 1-heptane-sulfonate, 85% phosphoric acid를 이용하여 pH 2.3의 조건을 가지며 용매 B는 HPLC Water (80%) : MeOH(20%)의 비율로 혼합하여 제조하였다. Column의 온도는 30℃로 고정하고 용매의 유속은 1 ml/min 이며, 1 cycle 은 13분으로 설정하였다.

(6) 통계 분석

시험결과는 General Linear Model (SAS, 1995)을 이용하여 분석하였다. 유의성은 Duncan의 다중범위 검정을 이용하여 p<0.05 범위에서 측정하였다.

다. 결 과

평균 일당 증체량, 평균 일당 사료 섭취율, 사료 효율은 Table 3-4에 요약하였다. 증체량과 사료섭취량 그리고 사료효율은 phase 1(63kg시작시부터 83kg도달시)에서 모든 처리구들에서 유의적인 차이가 없었다. 그러다 phase 2(83kg시작시부터 105kg도달시)에서는 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보였다. phase 2에서 증체량의 경우 MgO를 급여한 처리구(T3, T5)들이 급여를 안한 처리구들(T2, T4)에 비교해 유의적으로 떨어지는 수치를 보였다. phase 1의 기간 동안에 혈분과 MgO를 공급하였을 때 평균 일당 증체량의 경우 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 phase 2기간 동안 혈분을 첨가한 처리구는 평균 일당 증체량이 유의적으로 증가하였다. 그러나 MgO의 효과는 보이지 않았다. LD muscle의 수분 손실율과 pH측정값은 Table 3-6에 요약하였다. 수분 손실율과 pH값의 경우 모든 처리구에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 수분 손실율의 경우 대조구가 다른 처리구보다 높은 경향을 보였다. LD muscle의 pH값의 경우 처리구들간의 유의적 차이는 없었다. 그러나 T2, T3, T4처리구들은 시간이 지남에 따라 조금씩 감소하는 경향치를 보여주었다. 수분손실율과 pH값의 측정은 PSE(pale, soft, exudative)육 또는 RSE(red, soft, exudative)육을 알아보기 위해 실시되었다. 이번 시험에 사용된 사료를 먹은 육성돈 샘플은 PSE 또는 RSE육이 아닌 것을 알 수 있었다. LD muscle 경도의 경우 Table 3-7, LD muscle색도의 경우 Table 3-8에 요약하였다. 경도의 경우 대조구와 처리구들간에 유의적 차이가 없었다. 색도의 경우 CIE L*의 경우 T2 처리구에서 가장 낮게 나타났다. 또한 MgO를 첨가한 처리구들이 그렇지 않은 처리구에 비해 높은 수치를 나타냈다. CIE a*의 경우 T5처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. CIE b*의 경우 T5가 전기간 동안 높았으며 MgO의 첨가 효과를 보여주었다.

Carnosine과 anserine의 함량은 Table 3-9에 요약하였다. LD muscle의 carnosine과 anserine함량은 모든 처리구들 사이에서 유의적으로 차이가 없었다. 그러나 대조구에 비해 처리구들이 높은 경향치를 보였다. 특히 LD muscle의 carnosine함량이 T4, T5처리구가 높은 경향치를 보였다. carnosine함량의 경우 VI muscle보다 LD muscle이 높은 것으로 보였다. 그러나 anserine의 경우 반대의 성향을 보였다. 결과적으로 돼지의 LD muscle과 VI muscle에서의 carnosine함량은 혈분 또는 혈분과 MgO를 함께 첨가한 처리구에서 LD muscle안에 carnosine이 linear하게 증가했다는 것을 알 수 있었고 anserine의 경우 MgO의 고급효과가 VI muscle에 영향을 주었다는 것을 알 수 있었다.

라. 고 찰

앞서 선행된 육계시험의 결과를 토대로 양돈에서도 육계와 동일한 혈분과 MgO의 효과를 가져올 수 있는지에 대한 검증을 육성돈을 이용해 사양시험하였다. 카노신

과 안세린 함량은 LD muscle을 제외하고는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 LD muscle은 T5에서 높게 나타났다. 육즙손실, pH 그리고 돈육의 물리적인 특성은 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 육즙손실의 경우 T5에서 개선되는 경향을 보였으며 육색은 CIE L*를 제외한 CIE a*와 CIE b*에서 혈분 및 MgO첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 개선되는 결과를 나타내었다. 결론적으로 카노신 전구물질의 하나인 histidine을 다량함유하고 있는 혈분과 체내 카노신 합성을 촉진시킬수 있는 MgO는 육계의 경우 사양성적에 커다란 영향을 주지 않으며 닭가슴살 내 카노신의 함량을 유의적으로 증가시키며 양돈의 경우 육계와는 다르게 카노신 함량면에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 전체적인 육질부분에서는 일정부분 개선되는 효과를 가져올 수 있다.

Table 3-1. Formula and composition¹ of experimental pig diets.

Ingredients, %	Treatments ²				
	T1	T2	T3	T4	T5
Corn	37.70	35.72	35.72	35.72	35.72
Wheat	17.00	16.15	16.15	16.15	16.15
Dehulled soybean meal	11.10	10.55	10.55	10.55	10.55
DDGS ³	10.00	9.50	9.50	9.50	9.50
Rupin kernel	7.00	6.65	6.65	6.65	6.65
Blood meal	0.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Tallow	4.00	3.80	3.80	3.80	3.80
Tapioca	3.15	2.99	2.99	2.99	2.99
Molasses	2.50	2.38	2.38	2.38	2.38
Rapeseed meal	2.00	1.90	1.90	1.90	1.90
Limestone	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
Palm kernel	1.00	0.95	0.95	0.95	0.95
Rice bran	0.85	0.81	0.81	0.81	0.81
Corn gluten	0.81	0.77	0.77	0.77	0.77
Salt	0.40	0.38	0.38	0.38	0.38
Wheat (domestic) bran	0.30	0.29	0.29	0.29	0.29
Lysine HCL (78%)	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
SB ⁴	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
MIN B ⁵	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Saccharin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Threonine (97%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Phytase	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
NSP enzyme	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
MgO	-	-	+	-	+
Total			- 100 -		
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,350	3,331	3,331	3,331	3,331
Crude protein	16.50	20.26	20.26	20.26	20.26
Lysine	0.94	1.28	1.28	1.28	1.28
Methionine + Cystine	0.55	0.63	0.63	0.63	0.63
Threonine	0.65	0.81	0.81	0.81	0.81
Tryptophan	0.15	0.22	0.22	0.22	0.22
Assay composition					
Moisture	12.75	13.06	12.21	13.06	12.21
Crude protein	15.97	20.23	21.29	20.23	21.29
Crude fat	7.39	7.67	7.26	7.67	7.26
Crude fiber	3.68	3.62	3.20	3.62	3.20
Crude ash	5.96	6.02	6.11	6.02	6.11

¹Analyzed value²T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.³Distiller's dried grains with soluble, corn⁴Provides per kg diet: vitamin A, 9,000IU; vitamin D₃, 1,800IU; vitamin E, 25IU, vitamin K₃, 2mg; vitamin B₁₂, 20mg; thiamin, 2mg; riboflavin, 4mg; niacin, 27mg; biotin, 0.1mg; folic acid, 0.5mg; CaPantothenate, 15mg; pyridoxine, 2mg; Ethoxquine, 6.6mg.⁵Provides per kg diet: Cu, 66.67mg; Mn, 34.4mg; Se, 0.12mg; Zn, 36.67mg; I, 0.7mg; Fe, 66.67mg; Co, 0.33mg.

Table 3-2. Amino acids composition¹ and MgO concentration of experimental diets² and blood meal.

	T	BM	BM + MgO	Blood meal
	%			
Asparagine	8.09	8.61	8.88	9.60
Threonine	3.23	3.46	3.52	4.33
Serine/Glutamin	22.96	20.29	19.99	12.77
Proline	1.14	1.08	1.08	1.74
Glycine	15.50	13.38	14.56	8.84
Alanine	9.03	9.77	9.68	7.73
Cysteine	3.98	5.13	5.06	6.20
Valine	1.50	1.50	1.42	2.39
Methionine	2.73	2.24	2.33	2.32
Isoleucine	9.85	11.50	11.00	10.50
Leucine	2.67	2.51	2.50	4.10
Tyrosine	3.10	3.48	3.38	7.84
Phenylalanine	2.68	3.68	3.58	5.67
Histidine	4.37	5.92	5.54	6.33
Lysine	1.76	1.50	1.31	1.48
Arginine	2.06	1.68	1.78	3.73
MgO (ppm)	1656.50	1649.50	2805.50	

¹Analyzed value

²C; control diet, BM; control diet (95%) + blood meal (5%), BM + MgO; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

Table 3-3. Conditions of Rheometer for texture analysis of pig

***Longissimus dorsi* muscle**

Parameters	Conditions
Pre-test speed	3mm/sec
Test speed	1 mm/sec
Post-test speed	1 mm/sec
Distance	10 mm/sec
Time	5 sec
Trigger force	5 G

Table 3-4. Growth performance of experimental diets fed pigs.

Parameters	Treatments ¹					P-value	SEM
	T1	T2	T3	T4	T5		
Phase I. (61 to 83kg)							
ADG, g	783.16	882.14	870.54	776.79	794.64	0.3100	45.415
ADFI, g	2254.5	2415.2	2558.0	2125.0	2397.3	0.3318	112.160
Feed/Gain, g/g	2.88	2.74	2.94	2.74	3.02	0.7719	0.182
Phase II. (83 to 105kg)							
ADG*,g	729.59 ^b	910.71 ^a	852.86 ^{ab}	833.39 ^{ab}	720.98 ^b	0.0424	53.396
ADFI, g	2517.9 ^b	2754.3 ^{ab}	2955.4 ^a	2509.1 ^b	2593.8 ^b	0.0297	71.470
Feed/Gain**,g/g	3.45 ^{ab}	3.02 ^b	3.47 ^{ab}	3.01 ^b	3.60 ^a	0.0398	0.288
Overall (61 to 105kg)							
ADG*,g	756.38 ^b	896.43 ^a	861.61 ^{ab}	805.09 ^{ab}	757.81 ^b	0.0453	39.008
ADFI, g	2386.2 ^b	2584.7 ^{ab}	2756.7 ^a	2317.1 ^b	2495.5 ^{ab}	0.0417	69.270
Feed/Gain**,g/g	3.15 ^{ab}	2.88 ^b	3.20 ^{ab}	2.88 ^b	3.29 ^a	0.0451	0.160

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

^{a-b}Values in the same row with no common superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

*Contrast: Phase II; BMF and BM vs BMF + MgO and BM + MgO, $p = 0.1541$. Overall; BMF and BM vs BMF + MgO and BM + MgO, $p = 0.2999$.

**Contrast: Phase II; BMF and BM vs BMF + MgO and BM + MgO, $p = 0.0157$. Overall; BMF and BM vs BMF + MgO and BM + MgO, $p < 0.001$.

TABLE 3-5. Pig muscle composition fed experimental diets.

Parameters	Treatments ¹				
	T1	T2	T3	T4	T5
<i>Longissimus dorsi</i> muscle (%)					
Dry matter	22.60	23.55	23.79	23.62	24.71
Moisture	77.40	76.45	76.21	76.38	75.29
Crude Ash	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Crude Fat	2.64	2.45	1.83	2.00	1.68
Crude Protein	23.69	23.65	23.89	23.84	23.82
<i>Vastus intermedius</i> muscle (%)					
Dry matter	20.94	23.59	22.97	22.66	23.43
Moisture	79.06	76.41	77.03	77.34	76.57
Crude Ash	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Crude Fat	1.96	1.88	1.91	1.99	1.87
Crude Protein	22.69	22.79	22.91	22.83	22.84

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

Table 3-6. Effect of supplementary blood meal and MgO on pH of pig *Longissimus dorsi* muscles.

Parameters	Phase (Time post-mortem, h)	Treatments ¹					<i>p</i> -value	SEM
		T1	T2	T3	T4	T5		
pH	0 phase (38)	5.74	5.76	5.84	5.82	5.71	0.1712	0.042
	1 phase (46)	5.74	5.81	5.81	5.80	5.75	0.1965	0.027
	2 phase (54)	5.77	5.77	5.78	5.79	5.77	0.9404	0.023
	3 phase (62)	5.74	5.75	5.76	5.78	5.76	0.7374	0.022
	4 phase (70)	5.74	5.76	5.74	5.77	5.78	0.3052	0.017
	5 phase (78)	5.78	5.73	5.78	5.76	5.75	0.3758	0.020
	6 phase (86)	5.74	5.72	5.75	5.74	5.75	0.6107	0.015
	7 phase (94)	5.74	5.73	5.74	5.74	5.72	0.8529	0.015
	8 phase (102)	5.72	5.70	5.71	5.70	5.70	0.8313	0.014
	Linear	0.4030	0.0030	0.0004	0.0011	0.2706		
Drip loss (%)	0 phase (38)	2.81	2.33	2.58	2.20	1.72	0.4318	0.416

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

Table 3-7. Effect of supplementary blood meal and MgO on texture properties of pig *longissimus dorsi* muscles.

Parameters	Treatments ¹					<i>P</i> -value	SEM
	T1	T2	T3	T4	T5		
Hardness (g/cm ²)	2609.90	1512.10	1973.20	1589.30	1487.40	0.2099	382.330
Cohesiveness (%)	40.40	42.62	45.04	41.26	43.55	0.3982	1.797
Gumminess (%)	1107.40	641.90	885.40	665.00	641.90	0.2545	172.440
Stringiness (%)	84.49	94.44	86.84	114.38	107.35	0.6492	16.449
Springiness (%)	44.06	46.63	44.70	42.98	47.05	0.1635	1.307
Chewiness	492.80	315.30	399.10	282.00	300.20	0.3501	81.910
Resilience	0.22	0.18	0.20	0.18	0.18	0.4437	0.018

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

Table 3-8. Effect of supplementary blood meal and MgO on pig *Longissimus dorsi* muscles color.

Parameters	Time	Treatments ¹					P-value	SEM
		T1	T2	T3	T4	T5		
L ²	0 phase	46.34	44.93	47.20	47.10	48.32	0.4442	1.958
	1 phase	49.67 ^{ab}	48.03 ^b	49.55 ^{ab}	49.20 ^{ab}	51.52 ^a	0.0409	1.1715
	2 phase	49.00 ^b	48.89 ^b	49.17 ^b	49.30 ^b	51.50 ^a	0.0355	1.462
	3 phase	49.73	49.01	49.79	49.48	49.34	0.9564	1.720
	4 phase	50.48	48.61	49.45	49.76	50.03	0.5824	1.815
	5 phase	50.51 ^a	48.14 ^b	50.63 ^a	49.87 ^{ab}	51.25 ^a	0.0537	1.681
	6 phase	50.15 ^{ab}	47.79 ^c	50.02 ^{ab}	48.69 ^{bc}	51.57 ^a	0.0054	1.617
	7 phase	51.16	49.74	49.84	49.13	50.86	0.2811	1.624
	8 phase	51.24	49.77	50.63	49.08	51.71	0.1065	1.687
Mean ⁵		49.81 ^{ab}	48.32 ^c	49.59 ^{ab}	49.07 ^{bc}	50.68 ^a	0.0037	0.407
Linear		<0.0001	0.0188	0.0065	0.2384	0.0148		
a ³	0 phase	6.01	5.87	5.86	5.59	5.17	0.7679	1.083
	1 phase	3.79 ^b	5.31 ^a	5.31 ^a	4.09 ^b	5.38 ^a	0.0008	0.742
	2 phase	3.82 ^b	4.46 ^b	5.68 ^a	4.02 ^b	4.80 ^{ab}	0.0014	0.742
	3 phase	4.06 ^c	5.10 ^{ab}	5.28 ^{ab}	4.64 ^{bc}	5.79 ^a	0.0081	0.753
	4 phase	4.93 ^b	5.64 ^{ab}	6.25 ^a	5.24 ^{ab}	6.45 ^a	0.0435	0.893
	5 phase	4.55 ^b	6.11 ^a	6.21 ^a	5.26 ^{ab}	5.64 ^{ab}	0.0333	0.902
	6 phase	4.87	5.68	6.33	5.53	6.05	0.1063	0.868
	7 phase	5.03 ^c	6.35 ^{ab}	6.69 ^a	5.51 ^{bc}	6.30 ^{ab}	0.0119	0.814
	8 phase	4.87 ^b	6.22 ^a	6.35 ^a	5.48 ^{ab}	6.27 ^a	0.0181	0.803
Meane ⁶		4.66 ^b	5.64 ^a	6.00 ^a	5.04 ^b	5.76 ^a	0.0001	0.201
Linear		0.4718	0.0074	0.0065	0.0037	0.0097		
b ⁴	0 phase	6.18	6.14	6.41	6.37	6.70	0.6047	0.587
	1 phase	6.42 ^b	7.05 ^a	7.05 ^a	6.38 ^b	7.54 ^a	0.0005	0.458
	2 phase	6.38 ^c	6.71 ^{bc}	7.21 ^{ab}	6.62 ^c	7.31 ^a	0.0017	0.406
	3 phase	6.68	6.89	7.19	6.88	7.20	0.3244	0.454
	4 phase	7.32	7.24	7.73	7.33	7.78	0.2765	0.490
	5 phase	7.18	7.38	7.88	7.32	7.71	0.1024	0.452
	6 phase	7.25 ^b	7.19 ^b	7.89 ^a	7.20 ^b	7.98 ^a	0.0167	0.490
	7 phase	7.40 ^{ab}	7.80 ^{ab}	7.89 ^{ab}	7.29 ^b	8.02 ^a	0.0777	0.475
	8 phase	7.40 ^b	7.70 ^{ab}	8.00 ^a	7.20 ^b	8.19 ^a	0.0007	0.396
Mean ⁷		6.91 ^b	7.12 ^{ab}	7.47 ^a	6.95 ^b	7.60 ^a	0.0120	0.162
Linear		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

²Lower numbers = more black, higher numbers = more white (0 = black, 100 = white).

³Lower numbers = more green (less red), higher numbers = more red (less green); measurement range = (-60) to 60.

⁴Lower numbers = more blue (less yellow), higher numbers = more yellow (less blue); measurement range = (-60) to 60.

⁵Contrast: C vs BMF $p < 0.0136$; BMF vs BMF + MgO $p < 0.0341$; BM vs BMF + MgO $p < 0.0079$

⁶Contrast: C vs BMF $p < 0.0013$; C vs BMF + MgO $p < 0.0001$; C vs BM + MgO $p < 0.0004$; BM vs BMF + MgO $p < 0.0150$

⁷Contrast: C vs BMF + MgO $p < 0.0187$; C vs BM + MgO $p < 0.0043$; BM vs BM + MgO $p < 0.0071$

^{a-c}means with different superscript in the same row are significantly differ at $p < 0.05$.

Table 3-9. Concentration of carnosine and anserine in pig muscles.

Parameters	Treatments ¹					<i>P</i> -value (Linear)	SEM
	T1	T2	T3	T4	T5		
<i>Longissimus dorsi</i> muscle (LD, mg/g, DM)							
Carnosine	3.13	3.18	3.41	3.44	3.47	0.0309	0.112
Anserine*	0.09	0.10	0.11	0.10	0.16	0.0688	0.023
<i>Vastus intermedius</i> muscle (VI, mg/g, DM)							
Carnosine	2.91	2.95	3.03	3.04	2.75	0.5518	0.127
Anserine*	0.16 ^{ab}	0.15 ^b	0.11 ^c	0.17 ^{ab}	0.19 ^a	0.0574	0.012
Carnosine + anserine (LD + VI muscles, mg/g, DM)							
	6.29	6.37	6.62	6.75	6.56	0.9969	0.334

¹T1; control diet, T2; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet at 83 kg of average body weight, T3; switched from control diet to blood meal (95% control diet + 5% blood meal) diet + MgO at 83 kg of average body weight, T4; control diet (95%) + blood meal (5%), T5; control diet (95%) + blood meal (5%) + MgO.

^{a-c}means with different superscript in the same row are significantly differ at $p < 0.05$.

*Contrast : LD; C vs BM + MgO, $p = 0.0462$; VI; BMF vs BMF + MgO, $p = 0.0014$; BMF + MgO vs BM + MgO, $p = 0.001$.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

- ① 효과적으로 carnosine 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 확립하고 least-cost formulation을 통한 경제적인 실용화 방안을 정립
- ② Carnosine 구성물질인 β -alanine의 수준별 사양시험을 통한 효과와 실용화 가능성 검증
- ③ 효과적인 carnosine 합성 촉매의 수준 및 종류의 검증
- ④ 다량의 sample 분석을 위한 효율적 carnosine, anserine 분석 기법 확립
- ⑤ 돈육내 효과적으로 carnosine 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 확립하고 least-cost formulation을 통한 경제적인 실용화 방안을 정립

2. 연차별 연구개발 목표와 내용 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2009	-Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용	-Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용을 위하여 사양 시험을 실시 시험1. 육계시험 3회 연구목적 : 육계 시험을 통한 돈육내 carnosine, anserine 분석 및 증체량, 사료섭취량의 통계처리를 통한 혈분의 효율성 입증과 β -alanine과 MgO의 효과 및 다양한 기능성을 비교하기 위한 처리구분의 육계 시험
2010		-Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용을 위하여 사양 시험을 실시 시험2. 산란노계시험 연구목적 : 혈분과 마그네슘의 수준별 첨가에 따른 산란노계의 가슴근육내 carnosine증가효과를 검증하며 동시에 생산성 및 난품질에 미치는 영향을 확인하기 위해서 사양 시험 실시

3. 연구 평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2009	Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용(양 계)	100 %	<ul style="list-style-type: none"> - carnosine과 anserine의 육샘플에서의 분석방법 개발 - Histidine 공급원으로 blood meal의 첨가효과 확인 - 육계와 노계육에서의 carnosine 및 anserine강화효과 검정
2차 연도	2010	Carnosine 강화 축산물 생산기술 개발 및 응용(양 돈)	100 %	<ul style="list-style-type: none"> - Blood meal의 첨가와 비교한 합성 histidine과 β-alanine의 첨가효과 검정 - Histidine, β-alanine, MgO(carnosine synthetase의 촉매)첨가가 도육내 carnosine과 anserine함량에 미치는 영향 검정
최종 평가		<p>실험에서 얻어진 결과는 국제학술지 Poultry Science “Effets of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat”와 Asian-Australasian Journal of Animal Sciences “Effects of supplementary blood meal on carnosine content in the breast meat and performance of old hens. Asian-Aust. J. Anim. Sci.”로 발표되었고 특허출원(출원번호 : 1020080090665)“계육 조직 내 카노신 함량의 증진방법“을 심사 후 의견서를 제출한 상태로 불원간 특허 등록 예정임.</p> <p>기능성 축산물 “카노신 강화 축산물, 특히 계육”개발이 성공적으로 완료되어 이용가능하게 되었다.</p>		

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발과제의 연구 성과

1-1. 학술지 논문 게재 실적.

Joonghyuk Auh, Nyun Namgung, KwangSuk Shin, SeWon Pakr and InKee Paik. 2010. Effets of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. J. Poult. Sci. 47:302-309.

Nyun Namgung, DongHun Shin, SeWon Park and InKee Paik. 2010. Effects of supplementary blood meal on carnosine content in the breast meat and performance of old hens. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23(7):946-951

1-2. 특허

출원번호 : 1020080090665

“계육 조직 내 카노신 함량의 증진방법“을 심의중

제 6 장 참고 문헌

- Abe, H. 2000. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Moscow)* 65(7):757-765.
- Aldini, G., R. F. Facino., G. Beretta, and M. Carini. 2005. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *BioFactors* 24:77-87.
- Alhamdani, M. S. S., A. H. A. M. Al-Kassir., F. K. H. Abbas., N. A. Jaleel, and M. F. Al-Tae. 2007. Antiglycation and antioxidant effect of carnosine against glucose degradation products in peritoneal mesothelial cells. *Nephron Clin. Pract.* 107:26-34.
- Amend, J. F., D. H. Strumeyer, and H. Fisher. 1979. Effects of dietary histidine on tissue concentrations of histidine-containing dipeptides in adult cockerels. *J. Nutr.* 109:1779-1786.
- Amy, B., and Y. Dale. 2009. *Ingredient Analysis Table*. Feedstuffs, September, 16.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Apple, J. K., C. V. Maxwell., B. deRodas., H. B. Watson, and Z. B. Johnson. 2000. Effect of magnesium mica on performance and carcass quality of growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 78:2135-2143.
- Apple, J. K., E. B. Kegley, C. V. Maxwell Jr., L. K. Rakes, D. Galloway, and T. J. Wistuba. 2005. Effects of dietary magnesium and short-duration transportation on stress response, post-mortem muscle metabolism, and meat quality of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 83:1633-1645.
- Apple, J. K., H. B. Watson., K. P. Coffey, and E. B. Kegley. 1999. Comparison of magnesium sources on carcass traits, muscle color, and tenderness of finishing lambs. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 1):51(Abstr.).
- Aristoy, M. C., and F. Toldra. 2004. Histidine diepeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci.* 67: 211-217.

- Aruoma, O. I., M. J. Laughton, and B. Halliwell. 1989. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo?. *Biochem. J.* 264(3):863-869.
- Auh, J. H., N. Namkung., K. S. Shin., S. W. Park, and I. K. Paik. 2010. Effect of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. *J. Poult. Sci.* 47:302-309.
- Baguet, A., H. Reyngoudt., A. Pottier., I. Everaert., S. Callens., E. Achten, and W. Derave. 2009. Carnosine loading and washout in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 106:837-842.
- Bakardijiev, A., and K. Bauer. 1994. Transport of beta-alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture. *Euro. J. Biochem.* 225:617-623.
- Bauer, K., and M. Schulz. 1994. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. *Euro. J. Biochem.* 219:43-47.
- Beecher, G. R., R. G. Cassens., W. G. Hoekstra, and E. J. Briskey. 1965. Red and white fiber content and associated post mortem properties of seven porcine muscles. *J. Food Sci.* 30:969-976.
- Biffo, S., M. Grillo, and F. L. Margolis. 1990. Cellular localization of carnosine like and anserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nerves system. *Neuroscience* 35:637-651.
- Bonfanti, L., P. Peretto, S. D. Marchis, and A. Fasolo. 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 59:333-353.
- Breck, O., E. Bjerkas., P. Campbell., P. Arnesen., P. Haldorsen, and R. Wagbo. 2003. Cataract preventative role of mammalian blood meal, histidine, iron and zinc in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of different strains. *Aqua. Nutr.* 9:341-350.
- Brown, C. E. 1988. Interactions among carnosine, anserine, ophidine and copper in biochemical adaptation. *J. Theor. Biol.* 88:245-256.
- Caine, W. R., A. L. Schaefer, J. L. Aalhus, and M. R. Dugan. 2000. Behavior, growth performance and pork quality of pigs differing in porcine stress syndrome genotype receiving dietary magnesium aspartate hydrochloride. *Can. J. Anim. Sci.* 80:175-182.
- Chan, K. M., E. A. Decker., J. B. Lee, and D. A. Butterfield. 1994. EPR

- spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging ability of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.* 42:1407-1410.
- Dahl, T. A., W. R. Midden, and P. E. Hartman. 1988. Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem. Photobiol.* 47(3):357-362.
- Dahmer, E. J., R. H. Grummer, and W. G. Hoekstra. 1972. Prevention of zinc deficiency in swine by feeding blood meal. *J. Anim. Sci.* 35:1176-1180.
- Davey, C. I. 1960. The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 89:303-308.
- Decker, E. A., A. D. Crum, and J. T. Calvert. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.* 40(5):756-759.
- Decker, E. A., and H. Faraji. 1990. Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *JAOCS.* 67(10):650-652.
- Derave, W., M. S. Ozdemir., R. C. Harris., A. Pottier., H. Reyngoudt., K. Koppo., J. A. Wise, and E. Achten. 2007. Beta-alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J. Appl. Physiol.* 103:1736-1743.
- D'Souza, D. N., R. D. Warner, F. R. Dunshea, and B. J. Leury. 1999. Comparison of different dietary magnesium supplements on pork quality. *Meat Sci.* 51:221-225.
- D'Souza, D. N., R. D. Warner, B. J. Leury, and F. R. Dunshea. 1998. The effect of dietary magnesium aspartate supplementation on pork quality. *J. Anim. Sci.* 76:104-109.
- D'Souza, D. N., R. D. Warner, B. J. Leury, and F. R. Dunshea. 2000. The influence of dietary magnesium supplement type, supplementation dose and duration, on pork quality and the incidence of PSE pork. *Aust. J. Agric. Res.* 51:185-189.
- Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple f-tests. *Biometrics* 11:1-42.
- Dunnett, M., and R. C. Harris. 1999. Influence of β -alanine and L-histidine supplementation on the carnosine content of the *gluteus medius*. *Equine Vet. J. Suppl.* 30:499-504.
- Egorov, S. Y., E. G. Kurella., A. A. Boldyrev, and A. A. Krasnovski. 1992.

- Quenching of singlet molecular oxygen by carnosine and anserine in aqueous solutions. *Bioorganicheskaya Khimiya (Russian Bioorg. Chem.)* 18:142-144.
- Ferraris, R. P., J. P. Diamond, and W. W. Kwan. 1988. Dietary regulation of intestinal transport of carnosine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 255:143-150.
- Frederick, B. R., E. van Heugten, and M. T. See. 2006. Effects of pig age at market weight and magnesium supplementation through drinking water on pork quality. *J. Anim. Sci.* 84:1512-1519.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 41:35-39.
- Friesen, K. G., J. I. Nelssen., J. A. Unruh., R. D. Goodband, and M. D. Tokach. 1994. Effects of the interrelationship between genotype, sex and dietary lysine on growth performance and carcass composition in finishing pigs fed to either 104 or 127 kilograms. *J. Anim. Sci.* 72:946-954.
- Gardner, M. L., K. M. Illingworth., J. Kelleher, and D. Wood. 1991. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J. Physiol.* 439:411-422.
- Gariballa, S. E., and A. J. Sinclair. 2000. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and ageing* 29:207-210.
- Gatnau, R., and D. R. Zimmerman. 1992. Determination of optimum levels of inclusion of spray-dried porcine plasma(SDPP) in diets for weaning pigs fed in practical conditions. *J. Anim. Sci.* 60 (Suppl. 1).
- Gu, Y., A. P. Schinckel, and T. G. Martin. 1992. Growth development and carcass composition in five genotypes of swine. *J. Anim. Sci.* 70:1719-1729.
- Guiotto, A., A. Calderan., P. Ruzza, and G. Borin. 2005. Carnosine and carnosine-related antioxidant. *Curr. Med. Chem.* 12(20):2293-2315.
- Gulewitsch, W. S., and S. Amiradzibi. 1990. Uber das carnosine, eine neue organishe Bases des Fleischextraktes. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 33:1902-1903.
- Halliwell, B., and J. M. C. gutteridge. 1985. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA.
- Hama, T., N. Tamaki., F. Miyamoto., M. Kita, and I. Tsunemori. 1976. Intestinal

- absorption of β -alanine, anserine and carnosine in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 22:147-157.
- Hamilton, D. N., M. Ellis, M. D. Hemann, F. K. McKeith, K. D. Miller, and K. W. Purser. 2002. The impact of longissimus glycolytic potential and short-term feeding of magnesium sulfate heptahydrate before slaughter on carcass characteristics and pork quality. *J. Anim. Sci.* 80:1586-1592.
- Hamilton, D. N., M. Ellis, F. K. McKeith, and J. M. Eggert. 2003. Effect of level, source, and time of feeding before slaughter of supplementary dietary magnesium on pork quality. *Meat Sci.* 65:853-857.
- Harris, R. C., D. J. Marlin., M. Dunnett., D. H. Snow, and E. Hultman. 1990. Muscle buffering capacity; dipeptide content in the thoroughbred horse, grey-hound dog and man. *Comp. Biochem. Physiol.* 97(2):249-251.
- Harris, R. C., M. J. Tallon., M. Dunnet., L. Boobis., J. Coakley., H. J. Kim., J. L. Fallowfield., C. A. Hill, and J. A. Wise. 2006. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effects on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids* 30:279-289.
- Halliiwell, B., M. A Murcia., S, and A. I Okezie. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35(1/2):7-20.
- Hamilton, D. N., M. Ellis., M. D. Hemann., F. K. McKeith., K. D. Miller, and K. W. Purser. 2002. The impact of longissimus glycolytic potential and short-term feeding of magnesium sulfate heptahydrate prior to slaughter on carcass characteristics and pork quality. *J. Anim. Sci.* 80:1586-1592.
- Hamilton, D. N., M. Ellis., F. K. McKeith, and J. M. Eggert. 2003. Effect of level, source, and time of feeding prior to slaughter of supplementary dietary magnesium on pork quality. *Meat Sci.* 65:853-857.
- Hassan, O. E. M., A. M. S. Mukhtar, and M. E. A. Nasir. 1974. The use of blood meal in tropical broiler diets. *Trop. Anim. Health Prod.* 6:179-182.
- Haug, A., R. Rodbotton., L. T. Mydland, and O. A Christophersen. 2008. Increased broiler muscle carnosine and anserine following histidine supplementation of commercial broiler feed concentrate. *Acta. Agric. Scand. A. Anim. Sci.* 58:71-77.
- Hill, C. A., R. C. Harris., H. J. Kim., B. D. Harris., C. Sale., L. H. Boobis., C. K.

- Kim, and J. A. Wise. 2007. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids* 32:225-233.
- Hipkiss, A. R. 1998. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide?. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:863-868.
- Hipkiss, A. R., and H. Chana. 1998. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:28-32.
- Hipkiss, A. R., J. Michaelis., P. Syrris, and M. Dreimanis. 1995. Strategies for the extension of human life span. *Perspect. Hum. Bio.* 1:59-70.
- Hipkiss, A. R., J. E. Preston., D. T. M. Himsworth., V. C. Worthington, and N. J. Abbot. 1997. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 238:135-138.
- Hipkiss, A. R., J. E. Preston., D. T. M. Himsworth., V. C. Worthington., M. Keown, and J. Michaelis. 1998. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally-occurring dipeptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854:37-53.
- Hipkiss, A. R., and C. A. Brownson. 2000. A possible new role for the anti-aging peptide carnosine. *Cell Mol. Life Sci.* 57(5):747-753.
- Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci.* 49:447 - 457.
- Horinishi, H., M. Grillo, and F. L. Margolis. 1978. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J. Neurochem.* 31(4):909-919.
- Huff-Lonergan, E., and S. M. Lonergan. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71:194-204.
- Hu, J. M., J. Y. Rho., M. Suzuki., M. Nishihara, and M. Takahashi. 2000. Effect of taurine in rat milk on the growth of offspring. *J. Vet. Med. Sci.* 62:693-698.
- Jackson, M. C., C. M. Kucera, and J. F. Lenny. 1991. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta.* 196:193-206.
- Kang, J. H., K. S. Kim., S. Y. Choi., H. Y. Kwon., M. H. Won, and T. C. Kang.

2002. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxy radical-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase modification. *Biochimica. Biophysica. Acta.* 1570:89-96.
- Kanner, j., S. Harel, and R. Jaffe. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J. Agric. Food Chem.* 39(6):1017-1021.
- Kelly. R. R., H. B. David, and W, N. Horace. 1977. Histidine status in the chick as measured by growth rate, plasma free histidine and breast muscle carnosine. *J. Nutr.* 107:2055-2061.
- Kietzmann, M., and H. Jablonski. 1985. Blocking of stress in swine with magnesium aspartate hydrochloride. *Park. Tierz.* 661:331-335.
- Kohen. R., Y. Yamamoto., K. C. Cundy, and B. N. Ames. 1988. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(9):3175-3179.
- Kornbrust, d. J., and R. D. Mavis. 1979. Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids* 15:315-322.
- Krimberg. R 1906. Zur Kenntniss der Extraktivstoffe der muskeln. IV. Mutterlung. Uberdas vorkommen des carnosins, carnitins und methylguanidins im fleisch. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 48:412-418.
- Kuhn, G., A. Nowak., E. Otto., V. Albrecht., B. Gassmann., E. Sandner., H. Przybilski, and L. Zahn. 1981. Studies on the control of meat quality by special treatment of swine. 1. Effects of stress and preventative magnesium feeding on selected parameters of carcass value and blood serum. *Arch. Tierz.* 24:217-225.
- Kuleva, N. V., and Z. S. Kovalenko. 1997. Change in the functional properties of actin by its glycation in vitro. *Biochemistry (Moscow)* 62:1119-1123.
- Lee, B. J., and D. G. Hendricks. 1997. Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. *J. Food Sci.* 62:931-933.
- Lee, B. J., G. H. Deloy, and P. C. Daren. 1999. A comparison of carnosine and ascorbic acid on colour and lipid stability in a ground beef pattie model system. *Meat Sci.* 51:245-253.
- Lee, B. J., K. S. Kang., S. Y. Nam., J. H. Park., Y. S. Lee, and Y. W. Yun. 1999. Effects of carnosine and related compounds on monosaccharide

- autoxidation and H₂O₂ formation. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 3:251-261.
- Lenny, J. F. 1990. Separation and characterization of two carnosine splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosine and non-specific dipeptidase). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371(5):433-440.
- Lenny, J. F., R. P. George., A. M. Weiss., C. M. Kucera., P. W. H. Chan, and G. S. Rinzler. 1982. Human serum carnosinase: Characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin. Chim. Acta* 123:221-231.
- Matthews, M. M., and T. W. Traut. 1987. Regulation of N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase, the terminal enzyme in pyrimidine catabolism, by ligand-induced change in polymerization. *J. Biol. Chem.* 262(15):7232-7237.
- Mason, L. M., S. A. Hogan., A. Lynch., K. O'Sullivan., P. G. Lawlor, and J. P. Kerry. 2005. Effect of restricted feeding and antioxidant supplementation on pig performance and quality characteristics of longissimus dorsi muscle from Landrace and Duroc pigs. *Meat Sci.* 70:307-317.
- Mei, L., G. L. Cromwell., A. D. Crum, and E. A. Decker. 1998. Influence of dietary β -alanine and histidine on the oxidative stability of pork. *Meat Sci.* 49(1):55-64.
- Miller, E. R., M. J. Parsons., D. R. Romos, and D. E. Ullrey. 1976. Use of ring process dried swine blood in swine starter, grower and finisher rations. *J. Anim. Sci.* 42:1356 (Abstr.).
- Mozdzan, M., J. Szemraj., J. Rysz, and D. Nowak. 2005. Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96(5):352-360.
- Nagasawa, T., T. Yonekura., N. Nishizawa, and D. Kitts. 2001. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Mol. Cell Biochem.* 225:29-34.
- Nishimura. T., M. R. Rhue., A. Okitani, and H. Kato. 1988. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric. Biol. Chem.* 52:2323-2330.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washongton, DC.
- O'Dowd. J. J., D. J. Robins, and D. J. Miller.1988. Detection, characterization and quantification of carnosine and other histidyl derivatives in cardiac and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 967:241-249.
- Offer, G., and P. Knight. 1988. The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. *Developments in Meat Science* 4:63-171.
- O'Neill, L. M., K. Galvin., P. A. Morrissey, and D. J. Buckley. 1998. Inhibition of lipid oxidation in chicken by carnosine and dietary α -tocopherol supplementation and its determination by derivative spectrophotometry. *Meat Sci.* 50:479-488.
- O'Neill, L. M., K. Galvin., P. A. Morrissey, and D. J. Buckley. 1999. Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Sci.* 52:89-94.
- Otten, W., A. Berrer., S. Hartman., T. Bergerhoff, and H. M. Eichinger. 1992. Effects of magnesium fumarate supplementation on meat quality in pigs. *Proc. 38th int. Congr. Meat Sci. Technol., Clermont-Ferrand, France,* 117-120.
- Park. Y. J., S. L. Volpe, and E. A. Decker. 2005. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J. Agric. Food Chem.* 53(12):4736-4739.
- Pavlov, A. R., A. A. Revina., A. M. Dupin., A. A. Boldyrev., P. J Quinn, and V. E. Formazuyk. 1992. Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.* 13:379-444.
- Plowman, J. E., and E. A. Close. 1988. An evaluation of a method to differentiate the species of origin of meats on the basis of the contents of anserine, balenine and carnosine in skeletal muscle. *J. Sci. Food and Agri.* 45:69-73.
- Richard, C. W., and W. L. George. 1977. Dried blood meal as a protein source in diets for growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 44(5):778-783.
- Roberts, P. R., K. W. Black, and J. T. Santamauro. 1998. Dietary peptides improve wound healing following surgery. *Nutrition* 14:266-269.

- Rubtsov, A. M., M. Schara., M. Sentiurc, and A. A Boldyrev. 1991. Hydroxyl radical-scavenging activity of carnosine: a spin trapping study. *Acta. Pharm. Jugost.* 41:401-407.
- SAS Institute. 2000. SAS system for window V 8.01. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Saul, R. L., P. Gee, and B. N. Ames. 1987. Free radicals, DNA damage and aging, in: H. R. Warner et al (Eds.), *Modern Biological Theories of Aging.* Raven, New York. 113-129.
- Schaefer, A. L., A. C. Murray., A. K. W. Tong., S. D. M. Jones, and A. P. Sather. 1993. The effect of ante mortem electrolyte therapy on animal physiology and meat quality in pigs segregating at the halothane gene. *Can. J. Anim. Sci.* 73:231-240.
- Stuerenburg, H. J., and K. Kunze. 1999. Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle and rat muscle. *Arch. Gerontol. Geriat.* 29:107-113.
- Snyderman. S. E., A. Boyer., E. Roitman., L. E. Holt, and P. H. Prose. 1963. The histidine requirement of the infant. *Pediatrics* 31:786-807.
- Suzuki, A., and R. G. Cassens. 1980. A histochemical study of myofiber types in muscles of the growing pig. *J. Anim. Sci.* 51:1449-1461.
- Suzuki, T., T. Hirano, and T. Shirai. 1990. Distribution of extractive nitrogenous constituents in white and dark muscles of fresh water fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B:107-111.
- Suzuki, Y., O. Ito., N. Mukai., H. Takahashi, and K. Takamatsu. 2002. High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *Jpn. J. Physiol.* 52:199-205.
- Swearingin, T. A., C. Fitzgerald, and N. W. Seidler. 1999. Carnosine prevents glyceraldehydes 3-phosphate-mediated inhibition of aspartate aminotransferase. *Mol. Toxicol.* 73:307-309.
- Swigert, K. S., F. K. McKeith, T. C. Carr, M. S. Brewer, and M. Culbertson. 2004. Effects of vitamin D3, vitamin E, and magnesium supplementation on pork quality. *Meat Sci.* 67:81-86.
- Tamaki. N., H. Iizumi., N. Masumitu., A. Kubota, and T. Hama. 1976. Species

- specificity on the content of anserine and carnosine. *Yakugafu Zasshi*. 96:1481-1486.
- Tamaki, N., F. Tsunemori., M. Wakabayashi, and T. Hama. 1977. Effect of histidine-free and excess diets on anserine and carnosine contents in rat gastrocnemius muscle. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 23:331-340.
- Thornalley, P. J. 1998. Cell activation by glycated proteins: classification of AGEs. *Cell Mol. Biol.* 44:1013-1023.
- Tomonaga, S., Y. Kaji., T. Tachibana., D. D. Michael, and M. Furuse. 2005. Oral administration of β -alanine modifies carnosine concentrations in the muscles and brains of chicken. *J. Anim. Sci.* 76:249-254.
- Tomonaga, S., K. Kaneko., Y. Kaji., Y. Kido., D. M. Denbow, and M. Furuse. 2006. Dietary β -alanine enhances brain, but not muscle, carnosine and anserine concentrations in broilers. *Jpn. Soc. Anim. Sci.* 77:79-86.
- Trombley, P. Q., M. S. Horning, and L. J. Blakemore. 2000. Interactions between carnosine and zinc and copper: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Biochemistry (Moscow)* 65(7):807-816.
- Truitsina, I. E., M. E. Shabanova, and B. Z. Chikunova. 1997. Characterization of anti-ulcer effectiveness of carnosine. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 4:17-20.
- Tyus II, J., S. N. Nahashon., N. Adefope, and D. Wright. 2008. Growth performance of single comb white leghon chicks fed diets containing blood meal supplemented with isoleucine. *J. Poult. Sci.* 45:31-38.
- Van Heugten, E., and B. R. Frederick. 2004. Magnesium supplementation and pork quality. *Pig News Info.* 25:101-109.
- Warner, R. D., R. G. Kauffman, and M. L. Greaser. 1997. Muscle protein changes postmortem in relation to pork quality traits. *Meat Sci.* 45:339-352.
- Warner, R. D., R. G. Kauffman, and R. L. Russell. 1993. Quality attributes of major porcine muscle: A comparison with *longissimus lumborum*. *Meat Sci.* 33:359-372.
- Wu, H. C., C. Y. Shiau., H. M. Chen, and T. K. Chiou. 2003. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. Food and Drug Anal.* 11(2):148-153.
- Wu, F. S., T. T. Gibbs, and D. H. Farb. 1993. Dual activation of GABA and

- glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Euro. J. Pharmacol.* 246:239-246.
- Yoshikawa, T., Y. Naito., T. Tanigawa., T. Yoneta, and M. Kondo. 1991. The antioxidant properties of a novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopropionyl)-L-histidine zinc. *Biochim. Biophys. Acta.* 1115:15-22.
- Yoshikawa, T., Y. Naito., T. Tanigawa., T. Yoneta, M. Yasuda., S. Ueda., H. oyamada, and M. Kondo. 1991. Effect of zinc-carnosine chelate compound (Z-103), a novel antioxidant, on acute gastric mucosal injury induced by ischemiareperfusion in rats. *Free Radic. Res. Commun.* 14:289-296.
- Zhu, L. G., and M. S. Brewer. 1998. Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions. *J. Food Sci.* 63:763-767.

제2세부과제

Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물의
소재화 기술 개발

Development of carnosine containing peptide
mixture as functional ingredients

연구기관
중앙대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물의 소재화 기술 개발을 위한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010년 12월 19일

주관연구기관명 : 중앙 대학교

세부연구책임자 : 어 중 혁

연 구 원 : 박 윤 종

연 구 원 : 김 유 미

연 구 원 : 김 승 기

연 구 원 : 허 수 진

요 약 문

I. 제 목

Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 추출, 정제법 확립과 생리활성 비교 및 소재화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

다양한 천연 기능성 식품 소재 중에서 소 돼지, 닭 등 척추동물의 골격근, 중추신경계, 심장 등에 존재하는 carnosine은 해외에서 활발하게 연구되고 있는 물질로서, 특히 의약품 제조분야에서 크게 관심을 모으고 있다. Carnosine은 다양한 생리활성 기능을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 항글라이케이션, 항산화, 자유라디칼 및 금속이온 제거 및 분자 내 imidazole ring에 의한 환충작용이 보고된 바 있으며, 또한 다른 항산화제와는 달리 질병 및 노화와 관련된 반응에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 carnosine의 다양한 생리활성에도 불구하고 기능성 식품소재로서 활용도는 비교적 낮은 편으로 이에 대한 연구는 제한적으로만 수행되고 있는 실정이며, carnosine의 생리활성에 대해서 그 가능성만 제시하는 수준에서 그치고 있어서 이와 관련하여 더 많은 연구의 필요성이 요구되고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도(2009)에는 노계육과 carnosine 강화 계육에서 추출조건을 달리하여 carnosine, anserine의 효율적인 추출 및 정제법을 확립하고, 추출 및 정제조건에 따른 carnosine, anserine의 생리활성 측정법을 확립하고 비교한 뒤, 계육으로부터 carnosine과 anserine의 최적 추출조건에 따른 생리활성 비교 및 최적 생리활성을 측정하였다. 그리고 2차년도(2010)에는 carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출 및 정제법을 확립하고, 최적 조건에 따른 생리활성을 측정한 뒤 계육과 비교하였다. 또한 건강기능성 식품 소재화를 위한 연구로 carnosine의 안정화 조건을 확보하였고, 종합적인 실험 결과를 바탕으로 천연 기능성 식품 소재로서 carnosine의 향후 활용 방안을 제시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

가. 1차년도(2009)

90주령 노계육이 20주령 계육에 비해 carnosine과 anserine 함량이 낮게 측정되었다. 계육에서 추출시 상온 추출물이 50℃ 추출물에 비해 carnosine과 anserine의 함량이 더 높게 측정되어, 노화와 추출 온도에 따라 유의적인 변화를 나타내었다. 부위별로는 가슴 부위 근육에서 가장 높은 함량의 추출물을 얻을 수 있었다.

Carnosine 추출물의 생리 활성은 Anti-glycation과 Anti-oxidation 활성을 기준으로 비교하였다. 이들 활성은 추출 조건에 따라 변화를 보였고, 추출물 내의 carnosine가 anserine 함량이 증가함에 따라 높은 활성을 나타내었다. 또한 추출시간과 추출용매의 EtOH에 따라 추출물의 생리 활성에도 유의적인 차이가 측정되었다. 반응표면분석법을 이용하여 계육으로부터 최적의 carnosine 함유 기능성 펩타이드 혼합물의 추출 조건을 확립하였다. 일반적으로 상온, 낮은 EtOH 농도의 추출 용매로 약 1-2시간의 추출시에 가장 높은 활성의 추출물을 얻을 수 있었다. 정립된 최적 추출 조건에서 준비된 추출물은 원료 계육으로부터 약 2087~4096 mg/kg의 carnosine과 anserine을 함유하고 있었고, 42.5~51.2 %의 antiglycation 활성, 45.8~53.6 % DPPH radical 소거능, 그리고 51.2~64.8 %의 지방과산화 억제활성을 나타내었다.

나. 2차년도(2010)

돈육 등심 부위가 다리 부위에 비해 높은 carnosine의 함량을 보였고, 또한 상온에서 carnosine을 추출하는 것이 50℃보다 높은 추출 효율을 나타내었다. 부위와 추출 온도에 따라 추출물의 생리활성에는 유의적인 변화가 측정되었고, 이들의 생리활성을 Anti-glycation과 Anti-oxidation 활성을 기준으로 비교하였다. 최적의 추출 조건에서 준비된 추출물은 약 835.7~1021.7 mg/kg의 carnosine을 함유하고 있었으며, 약 51.4~57.4 %의 antiglycation 활성과 44.4~53.1 %의 DPPH radical 제거능을 나타내었다. 이들의 활성은 1차년의 계육에 비해 상대적으로 매우 높은 활성으로 측정되었다.

기능성 소재로의 이용을 위해 기초적인 특성을 분석하였다. 기초물성학적 특성을 조사한 결과, carnosine 함유 추출 혼합물의 물성은 carnosine 자체와는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나, 기존의 순수 carnosine을 산업적인 소재화에 있어 차이점이 없는 것으로 조사되었다. 또한 carnosine의 안정화 조건 확립을 위해 다양한 온도 조건에서의 열처리를 통해 활성 변화를 측정한 결과, IC50 값이 50℃에서는 약 3시간, 60℃에서는 약 2.5시간, 70℃에서는 약 2.2시간, 그리고 80℃에서는 약 1.5

시간으로 측정되어, Carnosine 자체로도 일반적인 펩타이드들에 비해 매우 안정한 특성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 펩타이드의 안정화를 위해 trehalose를 첨가하고 동일한 조건에서 내열성을 측정한 결과, 80℃에서 3시간 처리 후에도 초기 활성의 50% 이상을 유지하고 있음을 보여 carnosine의 활성 안정화에 최적의 조건임을 보여 주었다.

돈육의 경우, 계육에 비해 상대적으로 높은 carnosine 함량으로 인해 계육보다 높은 생리활성을 나타냄을 확인할 수 있었고, carnosine 추출물의 생리활성은 여러 형태의 carnosine 대사물질들 중 carnosine의 상대적 비율이 높게 나타날수록 높은 생리활성으로 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 carnosine은 펩타이드 자체로 상대적으로 안정한 구조를 가지고 있었고, 추가 안정화 소재들에 의해 소재화에 매우 용이한 생리활성 소재임을 확인할 수 있었다.

이상의 연구를 통해 천연물인 축산식품소재로부터 효율적인 생리활성 펩타이드 혼합물의 소재화를 위한 기반 기술을 확립할 수 있었다.

2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

최근 다양하게 개발되고 있는 기능성 소재들 중, 펩타이드 관련 시장은 가장 빠르게 성장하고 있는 분야의 하나이다. 본 연구 결과는 이러한 기능성 펩타이드 소재들의 제품화에 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 대표적인 동물성 생리활성 펩타이드인 carnosine의 기능성 소재화 가능성을 제시함으로써 기능성 축산물의 개발을 통한 농가의 수익 증대 및 관련 육가공 / 식품 산업에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Development of carnosine containing peptide mixture as functional ingredients

II. Objectives

Carnosine is a histidine containing dipeptide which is widely found in mammalian muscles including cow, chicken and pork. It also has been known to exert some physiological activities such as anti-glycation, anti-oxidation, free radical scavenging activity and anti-aging activity. Despite its unique activities, the application of carnosine as a functional ingredient in food and biotechnology area is still restricted. Therefore, this study was aimed to establish a basement for application of carnosine as functional ingredient in functional food as well as biotechnology field.

III. Contents and Scopes of Studies

Extensive study was performed for 2 years through stepwise approach. First, efficient extracting conditions of carnosine containing peptide mixture from chicken and pork were established. In addition analyzing platforms for evaluating the physiological activities were developed. Second, basic researches were carried out for the developemt of carnosine containing peptide mixtures as functional ingredient. Overall, natural peptide mixture containing carnosine can be applied as natural-functional materials.

IV. Results and Recommendation

1. Result of the 2nd Sub Research Project

A. The first years (2009)

Muscles from 90 wks and 20 wks laying hens were used for optimizing the extracting conditions of carnosine containing peptide mixtures. Peptide extracts were prepared with various conditions as EtOH, temperature and time as independent variables and their physiological activities were also evaluated. Best results were determined when the extraction was performed with lower concentration EtOH solution for 1-2 hrs at room temperature. Approximately 2087 ~4096 mg/kg of carnosine containing peptides were extracted and the extract exhibited 2.5~51.2 % of antiglycation, 45.8~53.6 % of DPPH radical scavenging activity and 51.2~64.8 % inhibition lipid peroxidation.

B. The second years (2010)

Carnosine extracts was prepared from pork muscle for the relative comparison with chicken. The efficiency of extraction followed the same trend indicated with chicken muscle. The extract prepared under optimized conditions contained 835.7 ~1021.7 mg/kg of carnosine and anserine and they exhibited 51.4~57.4 % of antiglycation and 44.4~53.1 % of DPPH radical scavenging activities, which were significantly higher than those of chicken's.

In addition, basic physicochemical properties of carnosine extract were evaluated and its stabilizing conditions were determined. Carnosine can lose its anti-glycation activity by heat treatment, however, it could prevented by adding trehalose as a stabilizing agent. IC50 value of carnosine at 80°C were 3 hrs, while the activity was not reduced below 50% with trehalose. Thus, these results could indicate the possible development of carnosine extract as functional ingredient with trehalose as stabilizing agent.

2. Application of result and suggestion

Functional peptide is one of the fastest growing materials among physiologically active ingredients. Results can be used as a useful basement for the development of carnosine containing peptide mixture as functional materials.

CONTENT

Chapter 1 Introduction

Part 1. Purposes and scopes of research -----	106
1. Necessity of research -----	106
Part 2. Purposes and contents of research -----	107
1. The First year (2009) -----	107
2. The Second year (2010) -----	107

Chapter 2 Current situation of technology development related to the project

Part 1. Levels of the internal and external technologies -----	109
1. Levels of the internal and external technologies -----	109
Part 2. Analysis of the patents -----	109
1. Analysis of the internal and external patents -----	109
2. Analysis of the effective patents & relevance -----	109
Part 3. Analysis of the papers -----	109
1. Analysis of the internal and external papers -----	109
2. Analysis of the effective papers & relevance -----	109
Part 4. Analysis of the products & markets -----	110
1. The domestic products & internal market conditions -----	110
2. The imported products & external market conditions -----	110

Chapter 3 Result of research

Part 1. Establishment of the effective extract method with carnosine and anserine from the carnosine enriched chicken -----	111
1. Performances of the research and development -----	111
A. Establishment of the effective extract method with carnosine and anserine from the laying hen and carnosine enriched chicken -----	111
B. Extraction of the carnosine and anserine in extract conditions -----	111
C. Establishment of the optimum extract condition by RSM -----	112
2. Results of the research and development -----	113
Part 2. Determination of the carnosine's physiological activities in extract conditions -----	119
1. Performances of the research and development -----	119
A. Establishment of the carnosine's physiological activities method in extract conditions -----	119
B. Determination of the Anti-glycation activity (%) -----	119
C. Determination of the Anti-oxidation activity (%) -----	120
D. Establishment of the optimum extract condition by RSM -----	121

2. Results of the research and development -----	122
Part 3. Investigation on physiological activity of carnosine containing peptide mixture and statistical optimization of extract conditions -	129
1. Performances of the research and development -----	129
A. Effect of the extract conditions on physiological activity -----	129
B. Determination of physiological activity on optimal extract condition -----	129
2. Results of the research and development -----	130
Part 4. Establishment of the effective extract method with carnosine and anserine from the carnosine enriched pork -----	133
1. Performances of the research and development -----	133
A. Determination of the carnosine concentration -----	133
B. Determination of physiological activity of carnosine extracts -----	133
C. Effect of the extract conditions on physiological activity -----	134
D. Optimization of extract condition by RSM and determination of the physiological activity in optimized extract condition -----	135
2. Results of the research and development -----	136
Part 5. Characterization of carnosine extracts for development of food additives and functional food resource -----	148
1. Performances of the research and development -----	148
A. Comparing of the physiological activity on concentration of carnosine -----	148
B. Physiological analysis of carnosine extracts -----	148
2. Results of the research and development -----	149
Part 6. Development of carnosine extracts as functional ingredients -----	158
1. Performances of the research and development -----	158
A. Determination of the stability of carnosine extracts for developing the products -----	158
B. Determination of the stability of carnosine extracts adding carnosine enriched materials -----	158
2. Results of the research and development -----	159

Chapter 4 Achievements of aims and contribution to related areas

Part 1. Aims, scope and evaluation point of research -----	173
1. Aims of research-----	173
2. Aims and scope of research-----	174
3. The point of research's evaluation -----	175

Chapter 5 Application of result

Part 1. Result of research and development -----	176
1. Results of the publishing papers in the scientific journal -----	176
2. Results of the conference -----	176
Part 2. Application of the result of research and development -----	177

1. Industrialization -----	177
2. Expected effect of the industrialization -----	177
Chapter 6 References -----	178

목 차

제1장 서론

제1절 연구개발의 목적과 범위 -----	106
1. 연구개발의 목적과 필요성 -----	106
제2절 연구개발의 목표 및 내용 -----	107
1. 제1차년도 (2009) -----	107
2. 제2차년도 (2010) -----	107

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 기술 수준 비교 -----	109
1. 국내외 기술 수준 비교 -----	109
제2절 특허 분석 -----	109
1. 국내외 특허 조사 -----	109
2. 유효 특허 조사 및 관련성 비교 -----	109
제3절 논문 분석 -----	109
1. 국내외 논문 조사 -----	109
2. 유효 논문 조사 및 관련성 비교 -----	109
제4절 제품 및 시장 분석 -----	110
1. 국내 제품생산 및 시장 현황 -----	110
2. 국외 제품생산 및 시장 현황 -----	110

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 Carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine의 추출, 정제법 확립 -----	111
1. 연구개발 수행 내용 -----	111
가. 노계육과 carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine, anserine의 추출, 정제법 확립 -----	111
나. 추출조건(추출용매, 추출시간, 추출온도)에 따른 carnosine, anserine의 추출 -----	111
다. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립 -----	112
2. 연구개발 수행 결과 -----	113
제2절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성 비교 -----	119
1. 연구개발 수행 내용 -----	119
가. 추출조건에 따른 carnosine과 anserine의 생리활성 측정법 확립 및 비교 -----	119

나. Anti-glycation activity (AGE inhibition %) 측정 -----	119
다. Anti-oxidation activity (DPPH radical effect, %, Inhibition of lipid peroxidation, %) 측정 -----	120
라. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립 -----	121
2. 연구개발 수행 결과 -----	122
제3절 Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구 -----	129
1. 연구개발 수행 내용 -----	129
가. 추출조건에 따른 생리활성 변화 측정 -----	129
나. 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정 -----	129
2. 연구개발 수행 결과 -----	130
제4절 Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구 -----	133
1. 연구개발 수행 내용 -----	133
가. Carnosine 강화 돈육의 근육 내 carnosine의 추출 및 함량 측정 -----	133
나. Carnosine 강화 돈육에서 추출한 carnosine의 생리활성 측정 및 비교 -----	133
다. 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 변화 측정 -----	134
라. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립과 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정 -----	135
2. 연구개발 수행 결과 -----	136
제5절 식품첨가물 및 건강기능식품 소재화를 위한 특성 연구 -----	148
1. 연구개발 수행 내용 -----	148
가. 추출물의 Carnosine 함량에 따른 생리활성 비교 -----	148
나. Carnosine 추출물의 물리·화학적 특성 연구 -----	148
2. 연구개발 수행 결과 -----	149
제6절 Carnosine 추출물의 제품화 기반 기술 연구 -----	158
1. 연구개발 수행 내용 -----	158
가. 제품화를 위한 추출물의 안정화 조건 확보 -----	158
나. Carnosine 안정화 성분 참가에 따른 추출물의 안정화 조성 확보 -----	158
2. 연구개발 수행 결과 -----	159

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점 -----	173
1. 연구개발 목표 -----	173

2. 연차별 연구개발 목표와 내용, 범위 및 달성도 -----	174
3. 연구평가의 착안점-----	175

제5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획

제1절 연구개발 성과 -----	176
1. 학술지 논문 게재 실적 -----	176
2. 학술대회 발표 실적 -----	176
제2절 연구개발 성과 활용계획 -----	177
1. 산업화 방향 -----	177
2. 산업화를 통한 기대효과 -----	177

제6장 참고문헌 -----178

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적과 필요성

식생활 및 경제여건의 발달과 더불어 식품의 1차적 기능인 영양과 2차적 기능인 맛과 조직감 등과 같은 단순 기능을 넘어서 생체조절기능을 지니고 있는 기능성 식품에 대한 소비자들의 관심이 집중되고 있다. 현재 개발되고 있는 다양한 기능성 소재들은 탄수화물, 단백질, 펩타이드 등을 기반으로 하고 있으며, 펩타이드 유래의 기능성 소재들은 세계적으로 5조원 이상의 매우 큰 시장을 형성하고 있다. 그러나 현재 많은 기능성 소재들은 합성 기반의 생산 과정으로 시판되고 있어 많은 소비자들이 원하고 있는 천연 소재와는 거리가 있는 현실이다. 따라서 최근 식품에 대한 소비자들의 인식과 식품 산업의 트렌드인 천연 식품 개발로 다양한 천연 기능성 식품 소재의 탐색이 모색되어지고 있다.

다양한 천연 기능성 식품 소재 중에서 소, 돼지, 닭 등 척추동물의 골격근, 중추신경계, 심장 등에 존재하는 carnosine은 해외에서 다양하게 연구되고 있는 물질로서, 특히 의약품 제조분야에서 크게 관심을 받고 있는 천연 기능성 소재이다. Carnosine과 이의 대사물질들은 다양한 기능성이 보고되고 있다. 예를 들어, 항글라이세이션, 항산화능, 자유라디칼 및 금속이온 제거능, 분자 내 imidazole ring에 의한 환충작용이 보고된 바 있으며, 또한 다른 항산화제와는 달리 질병 및 노화와 관련된 반응에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다. 그러나 carnosine 관련 연구는 소수의 선진국들에서만 한정적으로 진행되어 왔고, 다양한 생리활성을 보유하고 있음에도 기능성 식품소재로의 개발 및 활용은 비교적 낮은 편으로 제한적인 연구만 수행되고 있는 실정이다. 대부분의 연구가 단순한 생리활성에 대한 기능성의 제시에 그치고 있어 이의 소재화를 위해서는 적극적인 연구의 필요성이 제기되어 있다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

제 2 세부과제 : Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물의 소재화 기술 개발

1. 제 1 차년도 (2009)

가. 실험 1. Carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine, anserine의 추출, 정제법 확립

- 노계육과 carnosine 강화 계육에서 carnosine, anserine의 효율적인 추출, 정제법 확립
- 추출조건(추출용매, 추출시간, 추출용매)에 따른 carnosine, anserine의 추출
- RSM 통계 기법을 활용한 최적의 추출조건 확립

나. 실험 2. 추출 및 정제조건에 따른 carnosine의 생리활성 비교

- 추출조건에 따른 carnosine과 anserine의 생리활성 측정법 확립 및 비교
- Anti-glycation activity (AGE inhibition, %) 측정
- Anti-oxidation activity (DPPH radical scavenging effect, %, Inhibition of lipid peroxidation, %) 측정
- RSM 통계 기법을 활용한 최적의 추출조건 확립

다. 실험 3. Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 한 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구

- 추출조건에 따른 생리활성 변화 측정
- 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정

2. 제 2 차년도 (2010)

가. 실험 1. Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구

- Carnosine 강화 돈육의 근육 내 carnosine의 추출 및 함량 측정
- Carnosine 강화 돈육에서 추출한 carnosine의 생리활성 및 비교
- 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 변화 측정
- RSM 분석 기법을 통한 최적 추출조건의 확립과 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정

나. 실험 2. 식품첨가물 및 건강기능식품 소재화를 위한 특성 연구

- 추출물의 carnosine 함량에 따른 생리활성 비교
- Carnosine 추출물의 물리·화학적 특성 연구

다. 실험 3. Carnosine 추출물의 제품화 기반 기술 연구

- 제품화를 위한 추출물의 온도에 대한 안정화 조건 확보
- Carnosine 강화 성분 첨가에 따른 추출물의 안정화 조성 확보

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술 수준 비교

1. Carnosine 강화 축산물로부터 carnosine의 추출 및 정제 기술과 관련된 기술을 보유한 국가는 일본과 우리나라로 현재 기술수준으로는 선진국 100% 대비 약 10% 정도 수준으로 비교적 낮다.

제 2 절 특허 분석

1. 대상 국가는 국내와 국외(미국, 일본, 유럽)로 하여 carnosine이라는 keyword로 하여 특허 조사를 한 결과, 검색 건수가 국내 5건, 해외 69건이 존재했다.
2. 식육 내 천연 carnosine 추출법 및 정제법과 관련된 유효 특허 건수는 3건으로 우리나라 1건, 일본 2건이었으며, 관련성을 10% 정도로 미비한 상태였다.
3. 합성 carnosine의 항산화 능력이 천연 carnosine 함유 물질 보다 월등히 낮기 때문에 carnosine 강화 기능성 축산물 내 천연 carnosine의 효율적 추출방법과 정제기술을 합성 carnosine 제조기술과 차별화하여 특허출원이 가능할 것으로 사료 되어 졌다.

제 3 절 논문 분석

1. 대상 국가는 미국, 일본, 유럽으로 하여 carnosine이라는 keyword로 논문의 제목 및 초록을 조사한 결과, 검색 편수가 2,380편이 존재하였다.
2. 식육 내 천연 carnosine 추출법 및 정제법과 관련된 유효 논문 편수는 8편으로 존재하였고, 관련성은 20% 정도로 관련성이 미비한 상태로 파악되었다.
3. 실제로 carnosine은 1900년대 초에 발견되었지만 그 주요 기능인 항산화 능력에 대한 효과는 1990년대에 들어와서야 주목을 받기 시작하였으며, 연구의 중요성이

날로 증가하는 추세였다.

제 4 절 제품 및 시장 분석

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

가. Carnosine 강화 축산물은 아직 국내에서 판매되는 제품은 없으며, 합성 carnosine 함유 정제 Tablet을 건강보조식품으로 이용하는 일부 소비자층이 형성되고 있는 실정이었다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 국외 역시 carnosine 강화 축산물은 판매되지 않고 있으나 합성 carnosine tablet 시장은 국내보다 훨씬 다양한 합성 carnosine tablet이 시중에 판매중이다. 국내보다 시장이 활성화 되어 있으며 기능성 측면에서의 지속적인 중요성의 부각으로 인해 시장 규모가 확대되고 있다.

나. Carnosine이 acetylation 된 N-Acetylcarnosine은 렌즈를 착용하였을 시 발생하는 단백질 변성을 효과적으로 예방해줌으로서 렌즈착용자의 시력 보호 및 렌즈 보호와 백내장에 효과적인 치료제로서 중요성이 강조되고 있다.

다. Anti-glycation에 의한 당뇨부작용 감소, 항노화 작용(화장품에 이용), 항치매효과에 대한 보건, 의약적 관심이 높아지면서 소비자층이 증대되고 있다.

라. 노화 방지, 항산화, Anti-glycation, 항근육피로 등 여러 가지 좋은 효과가 있는 carnosine 강화 축산물의 기능적 우수성이 검증된다면 소비자들의 수요가 폭발적으로 증가할 것이 예상되었다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 Carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine, anserine의 추출, 정제법 확립

1. 연구개발 수행 내용

가. 노계육과 carnosine 강화 계육에서 carnosine, anserine의 효율적인 추출, 정제법 확립

(1) 계육에서의 carnosine과 anserine의 추출 실험

① 재료 및 실험방법

노계육과 carnosine 강화 계육으로부터 carnosine 함유 펩타이드의 추출은 Chan (1993)과 Gopalakri (1999)의 방법을 변형하여 실시하였다. 노계육과 carnosine 강화 계육을 부위(breast, drumstick, wing, heart, liver)별로 0.5g를 50ml falcon tube에 각각 분취한 후, 추출 용매 (D.W.~70% EtOH) 12 ml을 혼합하여 일정 시간(1hr~5hr) 동안 25℃의 상온과 50℃ 온도 조건하에 stirring 하였다. 그 후, 각 샘플을 원심 분리(20,929×g, 4℃, 30min)하여 상층액만 일정량 옮긴 후, 95% EtOH을 넣어 최종 농도 70% EtOH로 만들어 불순 단백질을 침전 시킨 후 제거했다. 다시 원심 분리(20,929×g, 4℃, 20min) 후 상층액만 취하여 -40℃ deep freezer에 20min 정치시킨 후에 원심 분리(1,620×g, 4℃, 20min) 한 후 이 상층 액을 -40℃ deep freezer에 overnight하여 보관한 후, 침전물을 제거한 후에 여과(13mm, 0.45µm PTFE, Whatman)하였다. 여과액은 speed vacuum concentrator (RC 10.22, Jouan)를 이용하여 잔류 EtOH를 제거하고, 증류수에 녹인 후, 동결 건조하여 이후 여러 실험들에 사용 하였다.

나. 추출조건(추출용매, 추출시간, 추출온도)에 따른 carnosine, anserine의 추출

(1) HPLC를 이용한 계육 추출물의 carnosine과 anserine 정량분석 실험

① 재료 및 실험방법

노계육과 carnosine 강화 계육의 breast, drumstick, wing, heart, liver 부위에서 추출한 carnosine 함유 펩타이드를 pre-column 유도체화 법을 이용하여 검출, 분석

하였다.

㉔ OPA pre-column 유도체화법을 이용한 형광 광도 검출

OPA reagent는 Hernandez J 등 (1996)의 방법을 변형하여 제조하였다. 500 μ l methanol과 OPA 2mg을 혼합한 뒤, 20mM boric acid 19ml와 2-mercapto ethanol 5 μ l를 넣고 vortexing하였다. OPA reagent는 매 12시간 마다 제조하여 사용하였다. 추출한 sample에 D.W. 10 μ l를 넣어 vortexing 한 후에 OPA reagent 100 μ l를 혼합하고 암실에 정치 후, 20 μ l를 취하여 분석에 사용하였다.

㉕ HPLC를 이용한 정량분석

HPLC를 이용한 carnosine 함유 펩타이드의 정량분석방법은 Toldra F 등 (2004)의 방법을 변형하여 분석하였다. Carnosine 함유 펩타이드의 분리를 위하여 HPLC system은 Gilson, Column은 Waters사의 Spherisorb SCX column(5 μ m, 250 \times 4.6mm, Waters fittings)을 사용하였으며, 검출기는 Varian사의 형광검출기(Ex : 338nm, Em : 425nm)를 사용하였다. 용매 A(6.6mM HCl : ACN = 90 : 10)와 용매 B(0.8M NaCl in A)를 처음 5min 동안은 A : B = 80 : 20으로 하고, 5-10min에는 50 : 50으로, 10-20min에는 A : B = 0 : 100으로 한 뒤, 20-30min에서는 다시 처음과 같은 조건으로 하였다. 그리고 Flow rate는 1ml/min로 하였다.

② 실험결과 및 고찰

Figure 2-1은 계육으로부터 추출한 carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 크로마토그램을 나타낸 것이다. Figure 2-2와 Figure 2-3은 5주령, 20주령과 90주령 계육의 breast, drumstick, wing, heart, liver 부위에서 추출한 carnosine과 anserine을 정량한 결과이다. Figure 2-2는 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 D.W.로 2시간 동안 추출하였으며, Figure 2-3은 50 $^{\circ}$ C에서 D.W.로 2시간 동안 추출하였다. Figure 2-4를 보면 알 수 있듯이, 상온에서 추출한 것에 비해 50 $^{\circ}$ C에서 추출한 것이 추출함량이 낮게 나타나, 추출온도가 높아질수록 carnosine의 추출함량이 높게 나타난다는 Maikhunthod (2005)의 논문과는 상이한 결과를 나타냈다. Figure 2-2에서 보면 breast 부위에서 carnosine 함유 펩타이드가 가장 많이 함유 되어 있었으며, 20주령 계육이 전반적으로 carnosine 함유 펩타이드가 많이 함유 되어 있다고 나타났다. 심장과 간 부위에서는 예상보다 낮은 함량이 검출되었는데, 이것은 carnosine이 적색근에 비해 백색근에 다량 함유되어 있는 carnosine 함유 펩타이드의 특징 때문인 것으로 사료된다.

다. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립

(1) RSM 분석 기법

추출조건(X)에 따른 추출효율(Y)을 Park (1981)과 Khuri 등 (1981)의 방법에 따라 contour plot을 설정한 후, 그래프 fitting을 통해 이차 다항 모형의 회귀계수를 추정하고, 추정 식을 도출하여 최적 추출조건을 찾아보았다. 분석 프로그램으로는 Design expert 8.0.1을 이용하였다. 또한 종속변수에 대한 최적 추출 효율간의 유의차는 SAS 통계 분석을 통해 95%의 신뢰수준에서 ANOVA 분석을 진행하였다.

(2) RSM 분석 결과

RSM 분석 기법을 이용하여 최적의 추출조건을 찾기 위해 분석한 결과, Figure 2-5에서 볼 수 있듯이, 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 0~14% 정도에서 carnosine 함유 펩타이드의 함량이 높게 나타났고, Figure 2-4에서 보면, 50℃에서 추출한 것 보다는 상온에서 추출하였을 때, 그래프에서 붉은색 부분이 많이 나타났다. 이로 인해 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 0~14% 로 상온에서 추출을 하는 것이 carnosine 함유 펩타이드의 검출되는 양이 많다는 것을 알 수 있었다.

2. 연구개발 수행 결과

- 가. 90주령 계육이 20주령 계육에 비해 canosine과 anerine 함량이 낮은 양상을 나타냄.
- 나. 상온에서의 추출이 50℃에서의 추출에 비해 carnosine 함량과 anserine의 함량이 높게 측정됨.
- 다. 90주령 계육과 20주령 계육에서의 상온 추출과 50℃ 추출에 유의차($p < 0.05$)가 있음.
- 라. 부위별 함량은 breast 부위에서 가장 높은 추출물을 얻을 수 있었음.

Figure 2-1. Chromatogram of carnosine containing peptide extract from chicken breast meat.

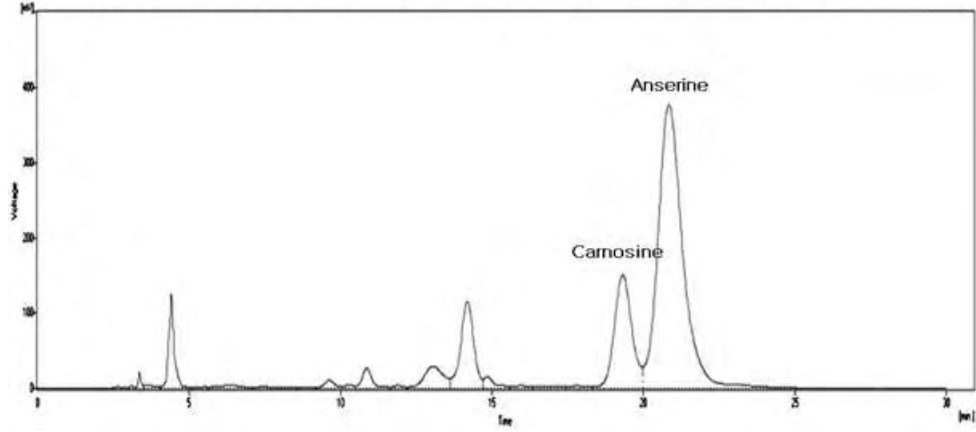


Table 2-1. Independent variable(X) and dependent variable(Y) used in RSM.

Independent variable (X)	추출 시간 (hours)
	추출 용매 (EtOH %)
Dependent variable (Y)	Carnosine and anserine concentration (mg/kg)
	AGE inhibition (%)
	DPPH radical scavenging effect (%)
	Inhibition of lipid peroxidation (%)

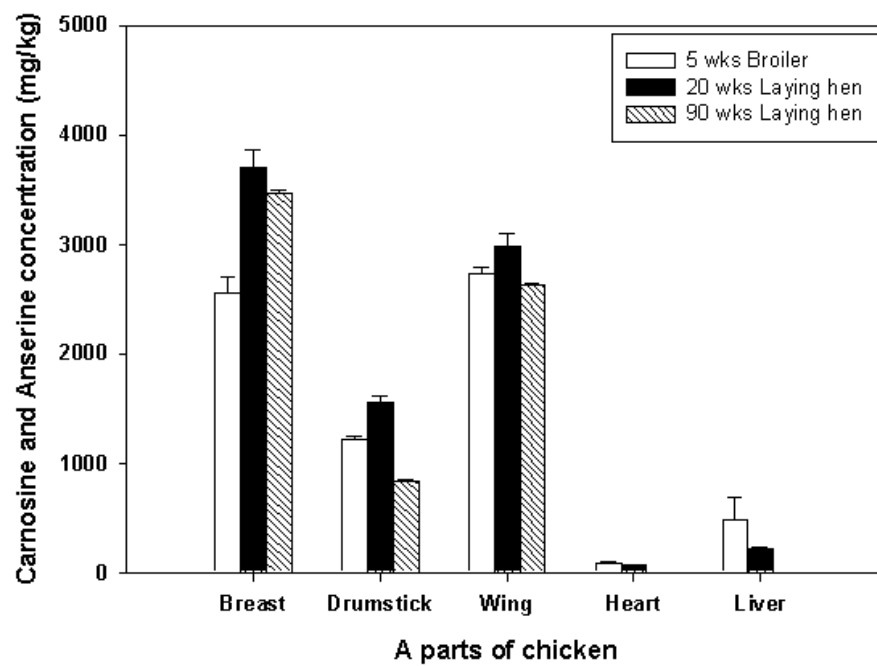


Figure 2-2. Carnosine and anserine concentration in chicken extracts from different parts and ages. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at room temperatures.

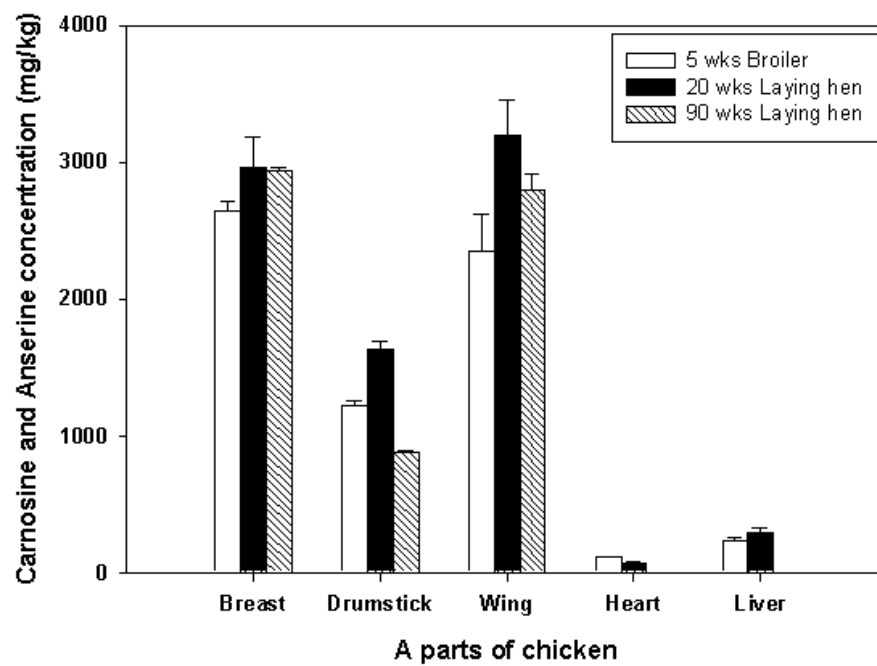


Figure 2-3. Carnosine and anserine concentration in chicken extracts from different parts and ages. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at 50°C temperatures.

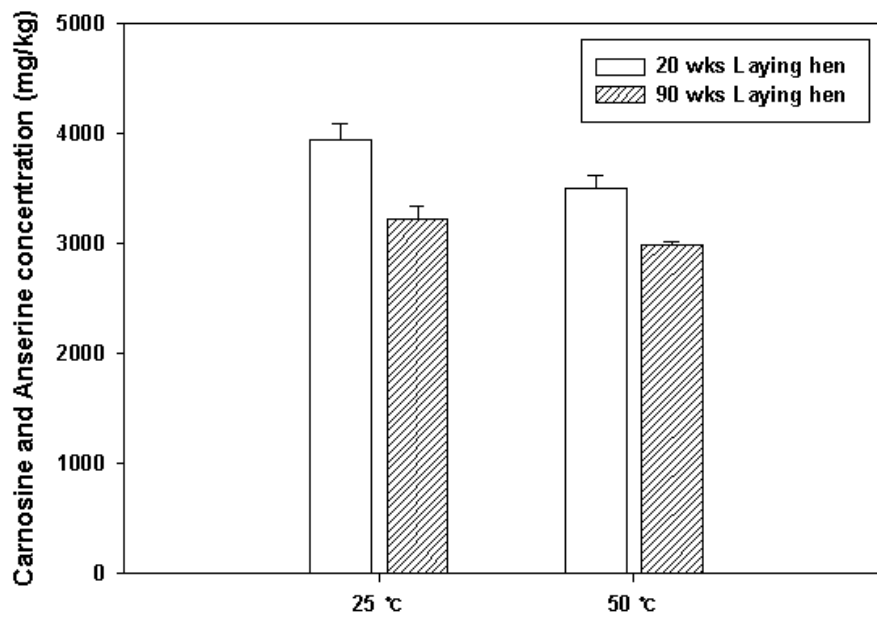


Figure 2-4. Comparison of carnosine and anserine concentration in chicken extracts prepared under optimized condition.

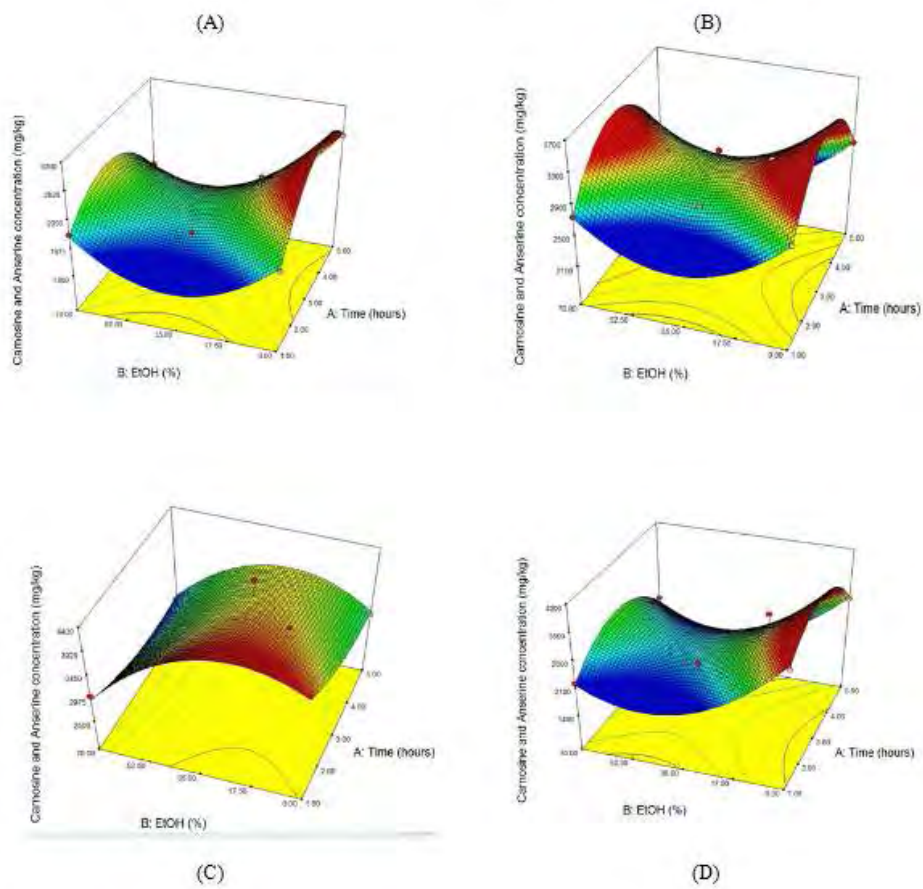


Figure 2-5. Effects of extracting conditions on the concentration of carnosine and anserine in chicken extracts.

**A : 90weeks Laying hen (room temperature), B : 90weeks Laying hen (50℃)
 C : 20weeks Laying hen (room temperature), D : 20weeks Laying hen (50℃)**

제 2 절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine의 생리활성 비교

1. 연구개발 수행 내용

가. 추출조건에 따른 carnosine과 anserine의 생리활성 측정법 확립 및 비교

(1) 생리활성 측정법 확립

Carnosine과 anserine은 다양한 생리활성 나타내는 것으로 보고되고 있으나, 이들 중 가장 대표적인 것이 항글라이케이션과 항산화작용이다. 이들의 생리활성을 측정하고 항글라이케이션 작용은 측정하여 AGE inhibition (%) 형태로 나타내고, 항산화 작용은 여러 항산화능 측정 방법 중 가장 일반적인 DPPH radical scavenging effect (%) 형태와 Inhibition of lipid peroxidation (%) 형태로 나타내었다.

나. Anti-glycation activity (AGE inhibition, %) 측정

(1) AGE inhibition (%) 측정 실험

① 재료 및 실험방법

계육으로부터 추출한 carnosine 함유 펩타이드의 항글라이케이션은 Li 등 (2007)의 방법을 변형하여 측정하였다. 계육으로부터 추출한 carnosine과 anserine의 항글라이케이션의 측정은 AGE inhibition (%)으로 나타냈다. Blank는 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 900 μ l에 5% BSA 100 μ l와 Methylglyoxal 0.46 μ l를 혼합하였다. Carnosine과 anserine standard solution 0mM~50mM를 제조한 후, 100 μ l에 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 800 μ l에 5% BSA 100 μ l와 Methylglyoxal 0.46 μ l를 혼합하여 농도에 따른 AGE inhibition (%)을 측정하였다. 또한 계육에서 추출한 carnosine 함유 펩타이드는 D.W. 100 μ l를 첨가한 뒤, 위와 같은 방법으로 혼합하여 측정하였다. 준비된 시료들은 빛이 없는 37 $^{\circ}$ C의 incubator에서 1일 동안 반응시킨 후, 형광광도계(Ex : 350nm, Em : 450nm)를 이용하여 측정하였다.

② 실험결과 및 고찰

90주령과 20주령 breast 부위에서 추출한 carnosine과 anserine의 항글라이케이션능을 AGE inhibition (%)으로 측정해 보았다. Figure 2-6은 20주령 계육과 90주령 계육을 상온(25 $^{\circ}$ C)에서와 50 $^{\circ}$ C에서 추출한 추출물의 AGE inhibition (%)을 측정한

결과를 보여주고 있다. 그 결과, 20주령 계육이 90주령 계육에 비해 AGE inhibition(%)이 더 높은 것으로 나타났고, 또한 상온(25℃)에서 추출한 펩타이드 혼합물의 AGE inhibition (%)이 50℃에서 추출한 펩타이드 혼합물 보다 더 높게 나타났다. Figure 2-7에서는 EtOH 농도가 높아질수록 항글라이케이션능이 낮아지는 결과를 확인 할 수 있었고, 또한 추출시간이 길어질수록 항글라이케이션능이 낮아지는 경향을 확인하였다. 추출조건에 따른 AGE inhibition (%)의 정도를 알아보면, 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 0~14% 정도에서 높게 나타났다. 이러한 AGE 저해 활성은 앞에서 확인된 carnosine의 절대 함량과 비례하여 증가하는 것으로 확인되어, carnosine 유도체의 전체 함량 보다는 carnosine 자체의 함량이 활성에 가장 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

다. Anti-oxidation activity (DPPH radical scavenging effect, %, Inhibition of lipid peroxidation, %) 측정

(1) DPPH radical scavenging effect (%) 측정 실험

① 재료 및 실험방법

DPPH radical scavenging effect (%)는 Shimada 등 (1992)의 방법에 따라 측정하였다. Blank는 methanol을 사용하였으며, 실험 방법은 다음과 같았다. 계육으로부터 추출한 carnosine 함유 펩타이드에 D.W. 100 μ l (Blank : MeOH 100 μ l)과 0.2mM DPPH solution(in MeOH) 50 μ l을 혼합하였다. 그 후, 혼합액을 vortexing하고, 상온에서 30min 동안 shaking 하였다. 반응 액을 UV/Visible detector로 517nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

② 실험결과 및 고찰

90주령과 20주령 계육의 breast 부위에서 추출한 carnosine과 anserine의 항산화능을 DPPH radical scavenging effect (%)로 측정하였다. Figure 2-8은 20주령 계육과 90주령 계육을 상온(25℃)에서와 50℃에서 추출한 추출물의 가지고 DPPH radical scavenging effect (%)를 측정한 결과를 보여주고 있다. 그 결과, 20주령 계육이 90주령 계육에 비해 DPPH radical scavenging effect(%)가 더 높은 것으로 나타났고, 또한 상온(25℃)에서 추출한 펩타이드 혼합물의 AGE inhibition (%)이 50℃에서 펩타이드 혼합 추출물 보다 더 높게 나타났다. 추출온도와 추출시료별로 DPPH radical scavenging effect (%)에 모두 유의차가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Figure 2-9에서 볼 수 있듯이 EtOH 농도와 추출시간이 증가할수록 DPPH radical scavenging effect (%)가 낮아졌다. 추출조건에 따른 DPPH radical scavenging effect (%)를 종합하면, 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 0~14% 정도에

서 높게 나타났다. 이상의 결과는 앞서 측정된 AGE inhibition (%)의 경향과 동일하였고, carnosine의 함량과 비례하여 항산화능도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(2) Inhibition of lipid peroxidation (%) 측정 실험

① 재료 및 실험방법

Inhibition of lipid peroxidation (%)은 Shimada 등 (1981)의 Ferric thiocyanate method를 변형하여 측정하였다. Blank는 D.W.를 사용하였으며, 실험방법은 다음과 같았다. 계육으로부터 추출한 carnosine 함유 펩타이드에 D.W. 190 μ l와 50mM potassium phosphate buffer (ph 7.0) 400 μ l를 혼합하였다. 이 혼합액에 2.5% linoleic acid (in 95% EtOH) 200 μ l와 EtOH 200 μ l, 10% TWEEN 20 10 μ l를 혼합하였다. 혼합액을 암실 조건 하에 40 $^{\circ}$ C에서 24hr 동안 반응하였다. Accelerate oxidation이 일어난 반응액 15 μ l에 75% EtOH 1,455 μ l와 30% ammonium thiocyanate 15 μ l, 20mM ferrous chloride solution (1n 3.5% HCl) 15 μ l를 각각 넣어 3분 동안 stirring 하였다. 반응액을 UV/Visible detector로 500nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

② 실험결과 및 고찰

90주령과 20주령 계육의 breast 부위에서 추출한 carnosine과 anserine의 항산화능을 Inhibition of lipid peroxidation (%)으로 측정하였다. Figure 2-10은 20주령 계육과 90주령 계육을 상온(25 $^{\circ}$ C)과 50 $^{\circ}$ C에서 추출한 펩타이드 혼합물의 Inhibition of lipid peroxidation (%) 측정 결과를 보여주고 있다. 그 결과, 20주령 계육이 90주령 계육에 비해 Inhibition of lipid peroxidation (%)이 더 높은 것으로 나타났고, 또한 상온(25 $^{\circ}$ C)에서의 추출물이 도 높은 Inhibition of lipid peroxidation (%)을 나타내어, 추출 온도와 부위에 따라 활성에 유의적인 차이를 나타내었다. Figure 2-11에서는 EtOH 농도와 추출시간에 따른 추출물의 활성 변화를 나타내었다. Inhibition of lipid peroxidation (%)은 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 EtOH 함량 0~14% 정도에서 가장 높게 나타났다. 이 활성 또한 앞서 측정된 활성과 동일하게 carnosine의 절대 함량과 비례하여 증가함을 보여 주었다.

라. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립

(1) RSM 분석 기법

추출조건(X)에 따른 추출효율(Y)을 Park (1981)과 Khuri 등 (1981)의 방법에 따라 contour plot을 설정한 후, 그래프 fitting을 통해 이차 다항 모형의 회귀계수를 추정하고, 추정 식을 도출하여 최적 추출조건을 찾아보았다. 분석 프로그램으로는

Design expert 8.0.1을 이용하였다. Table 2-1과 같이 독립변수(X)는 추출시간 : X1(1~5hr), 추출용매 : X2(0~70% EtOH)이며, 그에 따른 종속변수(Y)는 carnosine 과 anserine concentration (mg/kg) : Y1, AGE inhibition (%) : Y2, DPPH radical scavenging effect (%) : Y3, Inhibition of lipid peroxidation (%) : Y4로 설정하였다. 최적 추출조건은 종속변수(Y) 각각의 값들의 최적화 실행을 통해서 얻어진 최적 추출 효율과 최적 생리활성으로 결과를 나타냈다. 또한 종속변수에 대한 초적 추출 효율간의 유의차는 SAS 통계 분석을 통해 95%의 신뢰수준에서 ANOVA 분석을 진행하였다.

(2) RSM 분석 결과

RSM 분석 기법을 이용하여 최적의 추출조건을 찾기 위해 분석한 결과, Figure 2-7, 2-9, 2-11에서 볼 수 있듯이, 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 EtOH 농도 0~14% 에서 carnosine 함유 펩타이드의 생리활성이 가장 높게 나타났고, Figure 2-6, 2-8, 2-10에 나타난 바와 같이, 50℃보다 상온(25℃)에서 추출한 경우 더 높은 활성을 보여 주었다.

2. 연구개발 수행 결과

가. Carnosine과 anserine 함량 및 비율에 따라 Anti-glycation activity, Anti-oxidation activity 활성에 변화를 보임.

나. 일반적으로 carnosine과 anserine 함량이 증가할수록 activity가 증감함.

다. 모든 추출조건에 따른 carnosine과 anserine 함량과 activity는 유의차($p < 0.05$)를 보임.

라. 추출 시간과 추출 EtOH 농도별로 함량과 activity에 유의차($p < 0.05$)가 있음.

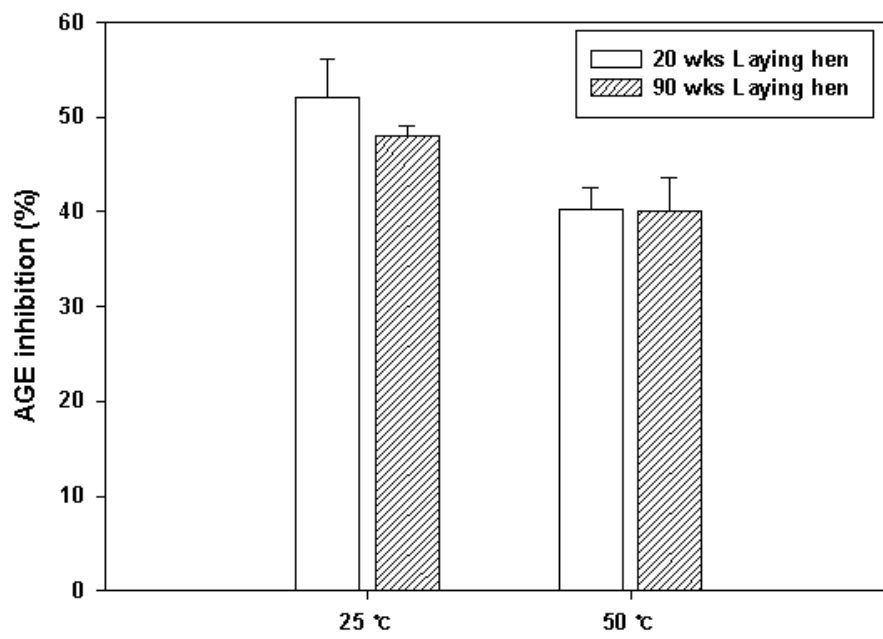


Figure 2-6. Comparing the inhibition of AGE formation with chicken extracts prepared under optimized condition.

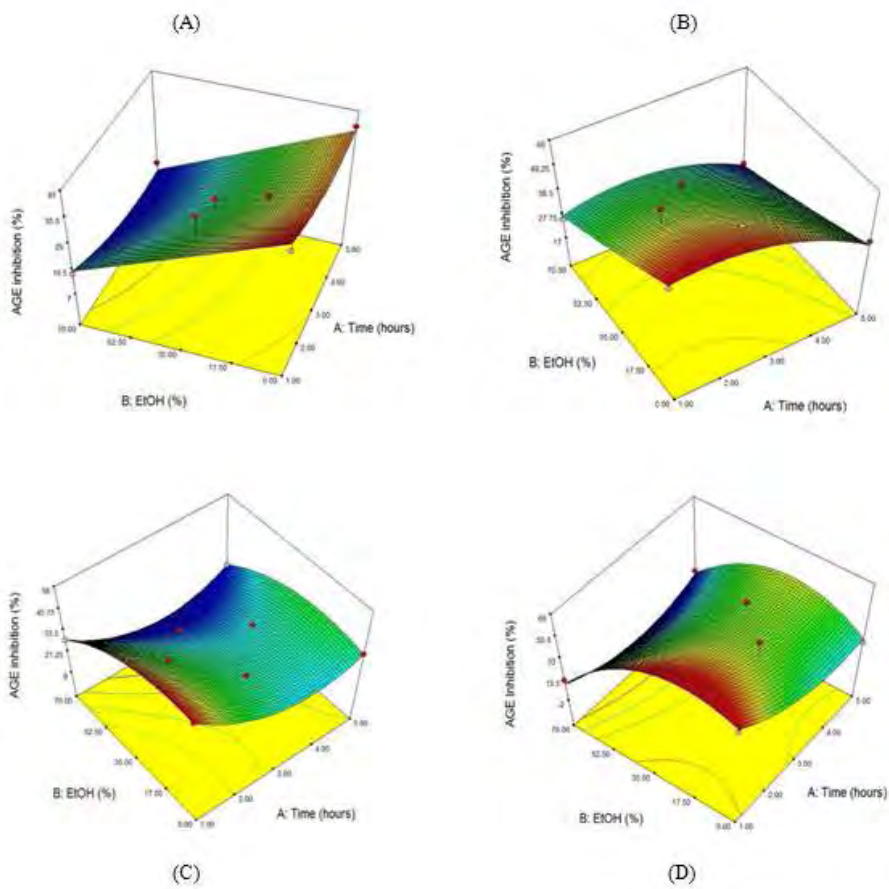


Figure 2-7. Effects of chicken extracts on the inhibition of AGE formation with different extracting conditions.

**A : 90weeks Laying hen (room temperature), B : 90weeks Laying hen (50℃)
 C : 20weeks Laying hen (room temperature), D : 20weeks Laying hen (50℃)**

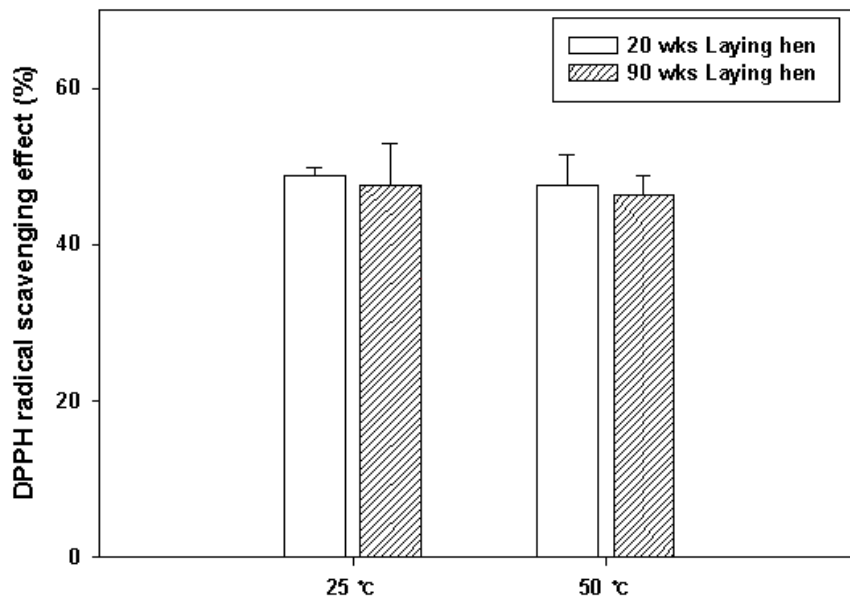


Figure 2-8. Comparison of the DPPH radical scavenging effect of chicken extracts prepared under optimized condition.

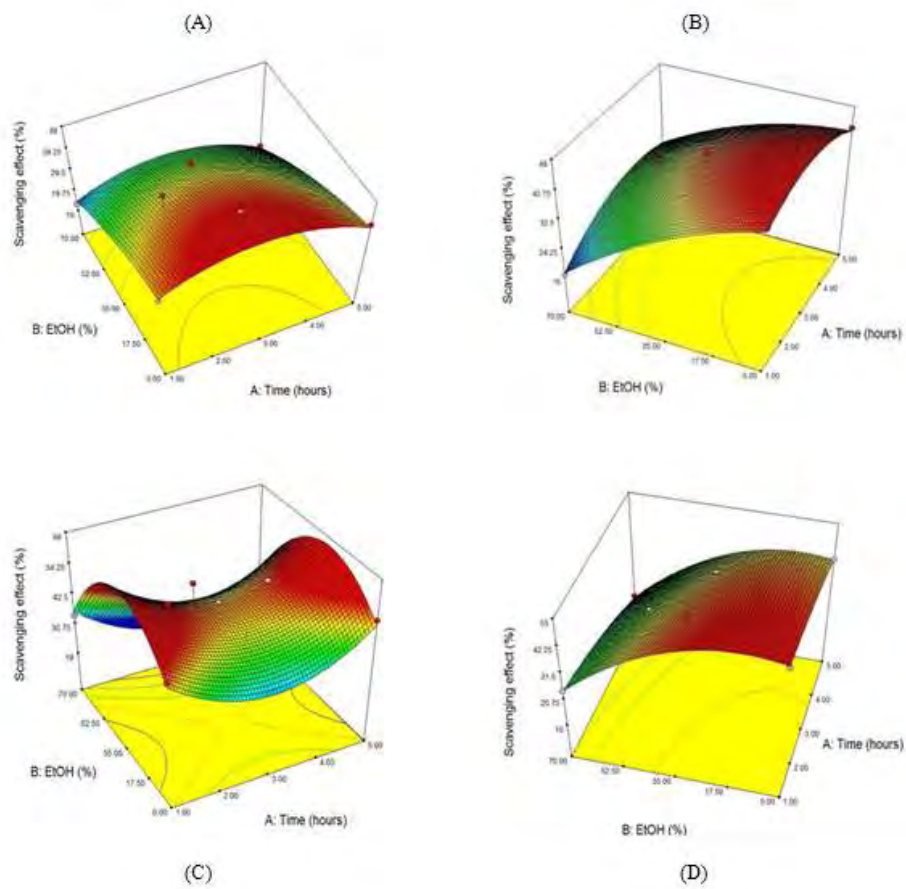


Figure 2-9. Effects of chicken extracts on DPPH radical scavenging effect with different extracting conditions.

**A : 90weeks Laying hen (room temperature), B : 90weeks Laying hen (50℃)
 C : 20weeks Laying hen (room temperature), D : 20weeks Laying hen (50℃)**

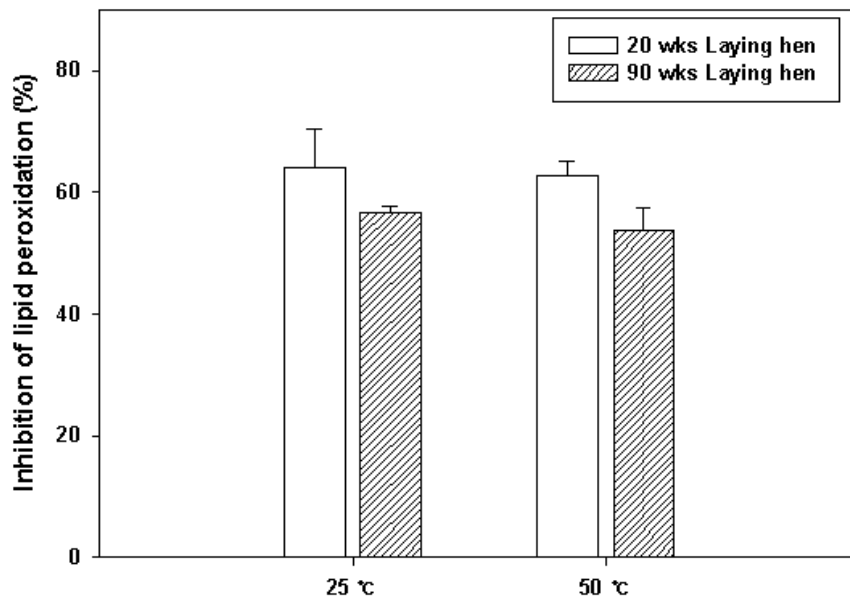


Figure 2-10. Comparing the inhibition of lipid peroxidation with chicken extracts prepared under optimized condition.

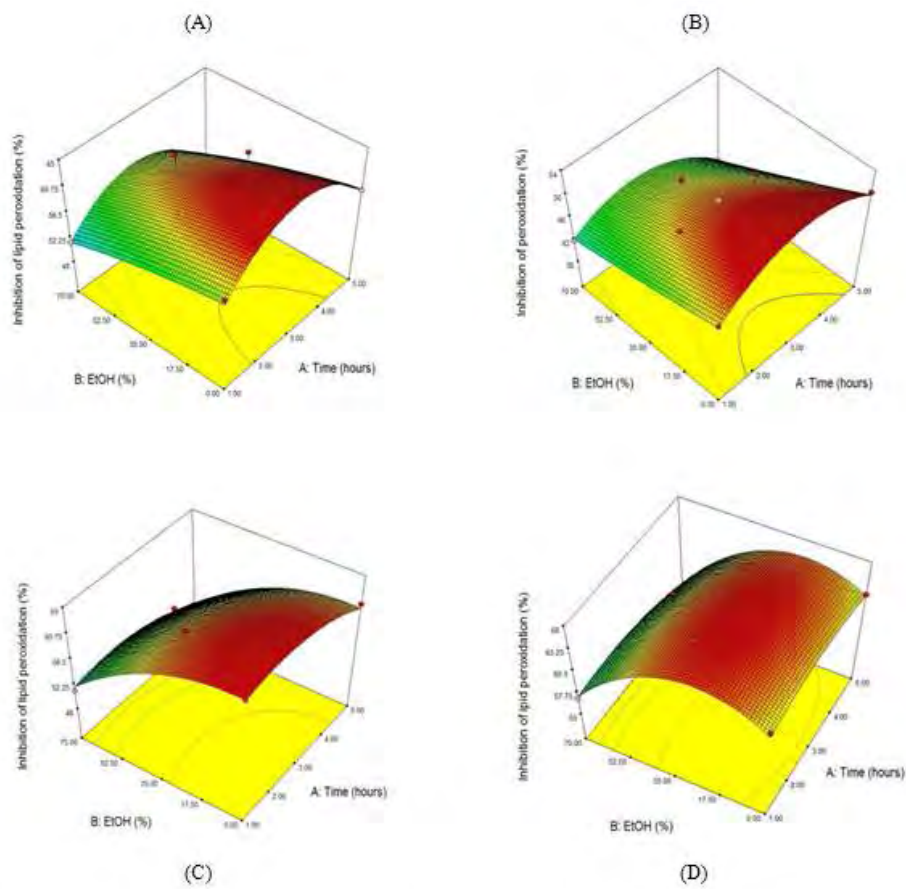


Figure 2-11. Effects of chicken extracts on the inhibition of lipid peroxidation with different extracting conditions.

A : 90weeks Laying hen (room temperature), B : 90weeks Laying hen (50℃)
 C : 20weeks Laying hen (room temperature), D : 20weeks Laying hen (50℃)

제 3 절 Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 한 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구

1. 연구개발 수행 내용

가. 추출조건에 따른 생리활성 변화 측정

(1) 재료 및 실험방법

90주령 계육과 20주령 계육을 다양한 추출조건으로 추출한 다음, 그 추출물의 carnosine 함유 펩타이드의 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), Inhibition of lipid peroxidation (%)의 실험을 통해 추출조건에 따른 생리활성 변화를 알아보았다. 먼저 추출조건은 추출용매(0~70% EtOH), 추출시간(1~5hr), 추출온도(상온, 50℃)로 설정하여 실험을 실시하였다. 실험 재료 및 실험방법은 제 2 절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성에 자세히 서술하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

90주령과 20주령 계육을 위의 실험방법에 따라 다양한 추출조건으로 추출한 후, 그 추출물을 가지고 carnosine 함유 펩타이드의 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), Inhibition of lipid peroxidation (%)의 실험을 실시하고, Design Expert 8.0.1 프로그램을 이용하여 조건에 따른 추출물의 생리활성의 변화를 알아보았다. Figure 2-5, 2-7, 2-9, 2-11들은 추출조건에 따른 생리활성의 변화를 각각의 실험별로 나타낸 것이다. 모든 실험에서 추출용매 조건에서는 EtOH의 농도가 높을수록, 추출시간 조건에서는 시간이 짧을수록, 추출온도 조건에서는 온도가 낮을수록 생리활성이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 먼저 carnosine 함유 펩타이드의 함량은 20주령 계육을 D.W. 으로 2시간 동안 상온에서 추출했을 때, 4227.3 mg/kg으로 가장 많은 함량이 추출되었고, AGE inhibition의 경우에도 20주령 계육을 D.W. 으로 2시간 동안 상온에서 추출한 추출물을 가지고 AGE inhibition을 측정하였을 때, 57.2%로 가장 높은 생리활성을 나타내었다. 또한 항산화능을 나타내는 DPPH radical scavenging effect와 Inhibition of lipid peroxidation도 위의 조건과 동일한 조건에서 추출한 추출물이 각각 61.2%와 72.4%로 가장 높은 Anti-oxidation activity (%)를 나타냈다.

나. 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정

(1) 재료 및 실험방법

위의 추출조건에 따른 생리활성 변화 측정 실험결과를 토대로, RSM 분석 기법을 이용하여 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성을 측정하였다. 추출조건(X)에 따른 추출효율(Y)을 Park (1981)과 Khuri 등 (1981)의 방법에 따라 contour plot을 설정한 후, 그래프 fitting을 통해 이차 다항 모형의 회귀계수를 추정하고, 추정 식을 도출하여 최적 추출조건을 찾아보았다. 분석 프로그램으로는 Design expert 8.0.1을 이용하였다. 최적 추출조건은 종속변수인 carnosine 함유 펩타이드의 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), Inhibition of lipid peroxidation (%) 값들의 동시 최적화(Simultaneous optimization) 실행을 통해서 얻어진 최적 추출 효율과 최적 생리활성으로 결과를 나타냈다. 또한 종속변수에 대한 초적 추출 효율간의 유의차는 SAS 통계 분석을 통해 95%의 신뢰수준에서 ANOVA 분석을 진행하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

위의 실험방법을 가지고 실험한 결과, Table 2-2에서 보면 계육(20주령, 90주령) 별, 온도별(25℃, 50℃)로 각각의 carnosine 함유 펩타이드의 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), Inhibition of lipid peroxidation (%) 값들의 동시 최적화(Simultaneous optimization) 실행을 통해서 추출용매와 추출시간의 최적 조건들이 나타나 있다. 20주령 계육을 25℃에서 추출용매는 D.W. 로, 추출시간은 1hr 동안 추출한 추출물의 생리활성이 가장 높게 나타났는데, carnosine 함유 펩타이드의 함량은 3944.5 mg/kg, AGE inhibition (%)은 52.0%, DPPH radical scavenging effect (%)는 48.7%이고, Inhibition of lipid peroxidation (%)은 64.1%를 나타냈다. 이들 각각의 실험결과 값들은 모든 종속변수(Y)를 동시에 최적화 시킨 조건에서 측정된 값들이기 때문에 실험별 각각의 최적 조건에 따른 실험결과 값들 보다는 조금 낮은 값들이었다. 25℃에서 20주령 계육을 D.W. 로 1시간 동안 추출한 추출물이 가장 높았고, 다음으로 50℃에서 20주령 계육을 D.W. 로 1.6hr 동안 추출한 추출물의 생리활성이 높았고, 25℃에서 90주령 계육을 D.W. 로 2.1hr 동안 추출한 추출물, 50℃에서 90주령 계육을 D.W. 로 2.86hr 동안 추출한 추출물 순으로 나타났다. 결론적으로 볼 때, 상온에서 EtOH 농도가 낮은 용매로 1~2hr 정도로 짧은 시간동안 추출하는 것이 계육에서 carnosine 함유 펩타이드의 추출 효율이 가장 높다는 것을 알 수 있었다.

2. 연구개발 수행 결과

가. EtOH 농도가 낮고, 추출 시간이 1~2 hr일 때, 추출 수율이 가장 좋았으며, 그

에 따른 activity도 높게 측정됨.

나. 상온에서 0~14%의 EtOH로 1~2 hr 추출할 경우 최적의 추출 효율을 보임.

다. 20주령 계육에서 추출한 추출물의 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성.

(1) Carnosine과 anserine 함량 : 2807~4096 mg/kg

(2) AGE inhibition : 42.5~51.2 %

(3) DPPH radical scavenging effect : 45.8~53.6 %

(4) Inhibition of lipid peroxidation : 51.2~64.8 %

Table 2-2. Optimal extraction condition of chicken breast meat.

	Time (hours)	EtOH (%)	Carnosine and Anserine concentration (mg/kg)	AGE inhibition (%)	DPPH radical scavenging effect (%)	Inhibition of lipid peroxidation (%)
Laying hen (90 weeks) RT	2.12	0.00	3220.98	47.94	47.60	63.69
Laying hen (90 weeks) 50°C	2.86	0.00	2983.88	39.99	46.23	53.75
Laying hen (20 weeks) RT	1.60	0.00	3944.53	51.97	48.69	64.12
Laying hen (20 weeks) 50°C	1.00	0.00	3498.42	40.23	47.50	62.68

제 4 절 Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구

1. 연구개발 수행 내용

가. Carnosine 강화 돈육의 근육 내 carnosine의 추출 및 함량 측정

(1) 돈육에서의 carnosine과 anserine의 추출 실험

① 재료 및 실험방법

제3장, 제1절 Carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine 추출, 정제법 확립에서 수행한 내용 중 1, 가, (1), ① 재료 및 실험방법과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

② 실험결과 및 고찰

Figure 2-12는 carnosine 강화 돈육의 등심과 다리 부위와 일반적인 돈육의 등심과 다리 부위에서 추출한 carnosine과 anserine을 정량한 결과이다. Figure 2-13, 2-14에서는 상온(25℃)과 50℃에서 D.W.로 2시간 동안 추출하였는데, 상온에서 추출한 것에 비해 50℃에서 추출한 것이 추출함량이 낮게 나타났다. 추출온도가 높아질수록 EtOH의 농도가 낮을수록 carnosine의 추출함량이 높게 나타난 계육에서 추출한 실험 결과와 동일한 결과를 나타냈다. 또한 돈육 등심이 돈육 다리 부위에 비해 전반적으로 carnosine 함유 펩타이드가 많이 함유 되어 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

나. Carnosine 강화 돈육에서 추출한 carnosine의 생리활성 측정 및 비교

(1) AGE inhibition (%) 측정 실험

① 재료 및 실험방법

제3장, 제2절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성 비교에서 수행한 내용 중 1, 나, (1), ① 재료 및 실험방법과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

② 실험결과 및 고찰

Carnosine 강화 돈육의 등심과 다리 부위와 일반적인 돈육 등심과 다리 부위에서 추출한 carnosine과 anserine의 항글라이케이션능을 AGE inhibition (%)으로 측정

해 보았다. Figure 2-15는 Carnosine 강화 근육의 등심과 다리 부위와 일반적인 근육 등심과 다리 부위를 상온(25℃)과 50℃에서 추출하여 준비한 펩타이드 추출물의 AGE inhibition (%)을 측정 결과를 보여주고 있다. 그 결과, 근육 등심의 추출물이 근육 다리의 추출물에 비해 AGE inhibition(%)이 더 높은 것으로 나타났고, 또한 상온(25℃)에서 추출한 추출물의 AGE inhibition (%)이 50℃ 추출물 보다 더 높았다. 그리고 Figure 2-16, 2-17에서는 EtOH 농도가 높아질수록 항글라이케이션능이 낮아지는 결과를 확인 할 수 있었고, 또한 추출시간이 길어질수록 항글라이케이션 능이 낮아진다는 것을 알 수 있었다. 추출조건에 따른 AGE inhibition (%)의 정도를 알아보면, 추출시간은 1~2hr, 추출용매는 0~25% 에서 높게 나타났는데, 이것은 계속에서 추출하여 실험한 결과와 비슷한 양상을 나타내었다.

(2) DPPH radical scavenging effect (%) 측정 실험

① 재료 및 실험방법

제3장, 제2절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성 비교에서 수행한 내용 중 1, 다, (1), ① 재료 및 실험방법과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

② 실험결과 및 고찰

Carnosine 강화 근육의 등심과 다리 부위와 일반적인 근육 등심과 다리 부위에서 추출한 carnosine과 anserine의 항산화능을 DPPH radical scavenging effect (%)로 측정하였다. Figure 2-18은 carnosine 강화 근육의 등심과 다리 부위와 일반적인 근육 등심과 다리 부위를 상온(25℃)과 50℃에서 추출하여 DPPH radical scavenging effect (%)를 측정한 결과를 보여주고 있다. 그 결과, AGE inhibition (%)의 결과와 마찬가지로, 근육 등심 추출물이 근육 다리 추출물에 비해 DPPH radical scavenging effect(%)가 더 높았고, 또한 상온(25℃) 추출물의 AGE inhibition (%)이 50℃의 추출물 보다 높게 나타났다. 추출온도와 추출시료별로 DPPH radical scavenging effect (%)에 모두 유의차가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 Figure 2-19, 2-20에서는 EtOH 농도가 높아질수록, 또한 추출시간이 길어질수록 DPPH radical scavenging effect (%)가 낮아짐을 보여주고 있다. 추출조건에 따른 DPPH radical scavenging effect (%)는 추출시간 1~2 hr, 추출용매의 EtOH 농도 0~25% 에서 가장 높게 나타났다. 이전 carnosine 정량분석 결과와 비교해보면, carnosine 함유 펩타이드의 함량이 많을수록 DPPH radical scavenging effect (%)도 그에 비례한다는 사실을 알 수 있었다.

다. 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 변화 측정

(1) 재료 및 실험방법

제3장, 제3절, 1, 가. 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 변화 측정 중 (1) 재료 및 실험방법과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

Carnosine 강화 돈육의 등심과 다리 부위와 일반적인 돈육 등심과 다리 부위를 위의 실험방법에 따라 다양한 추출조건으로 추출한 후, 그 추출물을 가지고 carnosine 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%)의 실험을 실시하여 그 결과들을 각각 Design Expert 8.0.1 프로그램을 이용하여 각각의 실험별로 추출조건에 따른 생리활성의 변화를 알아보았다. Figure 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-19, 2-20들은 추출조건에 따른 생리활성의 변화를 각각의 실험별로 나타낸 것이다. 모든 실험에서 추출용매 조건에서는 EtOH의 농도가 높을수록, 추출 시간 조건에서는 시간이 짧을수록, 추출온도 조건에서는 온도가 낮을수록 생리활성이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 먼저 carnosine 함량은 carnosine을 강화한 돈육 등심을 25% EtOH로 2시간 동안 상온에서 추출했을 때, 1036.2 mg/kg으로 가장 많은 양이 추출되었고, AGE inhibition의 경우에도 carnosine을 강화한 돈육 등심을 25% EtOH로 1시간 동안 상온에서 추출 경우, 60.2%로 가장 높은 생리활성을 나타내었다. 또한 항산화능을 나타내는 DPPH radical scavenging effect도 D.W. 으로 1시간동안 추출하는 조건에서 54.3%로 가장 높은 활성을 나타냈다.

라. RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건의 확립과 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정

(1) RSM 분석 기법

추출조건(X)에 따른 추출효율(Y)을 Park (1981)과 Khuri 등 (1981)의 방법에 따라 contour plot을 설정한 후, 그래프 fitting을 통해 이차 다항 모형의 회귀계수를 추정하고, 추정 식을 도출하여 최적 추출조건을 찾아보았다. 분석 프로그램으로는 Design expert 8.0.1을 이용하였다. 독립변수(X)는 추출시간 : X1(1~5hr), 추출용매 : X2(0~70% EtOH)이며, 그에 따른 종속변수(Y)는 carnosine과 anserine concentration (mg/kg) : Y1, AGE inhibition (%) : Y2, DPPH radical scavenging effect (%) : Y3로 설정하였다. 최적 추출조건은 종속변수(Y) 값들의 동시 최적화 (Simultaneous optimization) 실행을 통해서 얻어진 최적 추출 효율로 결과를 나타냈다. 또한 종속변수에 대한 최적 추출 효율간의 유의차는 SAS 통계 분석을 통해 95%의 신뢰수준에서 ANOVA 분석을 진행하였다.

(2) RSM 분석 기법을 활용한 최적 추출조건 확립

RSM 분석 기법을 이용하여 최적의 추출조건을 찾기 위해 분석한 결과, Figure 2-13, 2-14에서 볼 수 있듯이, 추출시간은 1~2hr, 추출용매의 EtOH 농도는 0~25%에서 carnosine 함량이 높게 나타났고, Figure 2-12에서 보면, 50℃보다는 상온 추출물에서 더 많은 carnosine의 추출이 가능함을 확인할 수 있었다.

(3) RSM 분석 기법을 통한 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정

위의 나타난 결과들에서 볼 수 있듯이 (Table 2-3) 돈육(Carnosine 강화 돈육 등심과 다리, 일반적인 돈육 등심과 다리)별, 온도별(25℃, 50℃)로 각각의 carnosine 정량분석, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), 값들의 동시 최적화(Simultaneous optimization) 실행을 통해서 추출용매와 추출시간의 최적 조건이 설정되었다. Carnosine 강화 돈육 등심은 25℃에서 추출용매는 9.8% EtOH 로, 추출시간은 1hr 동안 추출한 경우 생리활성이 가장 높게 나타났는데, carnosine 함량은 1087.5 mg/kg, AGE inhibition (%)은 59.8 %, DPPH radical scavenging effect (%)는 53.3%를 나타냈다. 이들 각각의 실험결과 값들은 모든 종속변수(Y)를 동시에 최적화 시킨 조건에서 측정된 값들이기 때문에 실험별 각각의 최적 조건에 따른 실험결과 값들 보다는 조금 낮은 값들이었다. 25℃에서 carnosine 강화 돈육 등심을 추출용매는 9.8% EtOH 로, 1시간 동안 추출한 추출물이 가장 높았고, 다음으로 25℃에서 일반적인 돈육 등심을 D.W. 로 1hr 동안 추출한 추출물의 생리활성이 높았고, 그 다음으로는 50℃에서 추출한 carnosine 강화 돈육의 등심과 일반 돈육 등심에서 추출한 추출물, 그리고 돈육 다리 부위도 등심과 같은 조건 순으로 추출한 결과로 나타났다. 결론적으로, 상온에서 EtOH 농도가 낮은 용매로 1~2 hr 정도로 짧은 시간동안 추출하는 것이 돈육에서 carnosine의 추출 효율이 가장 높다는 것을 알 수 있었고, 또한 carnosine 강화 돈육이 일반 돈육에 비해 carnosine의 함량과 더불어, 생리활성도 높다는 것을 알 수 있었다.

2. 연구개발 수행 결과

- 가. 돈육 등심이 돈육 다리 부위에 비해서 carnosine 함량이 높은 양상을 띤.
- 나. 상온에서의 추출이 50℃에서의 추출에 비해 carnosine 함량 높게 측정됨.
- 다. 돈육 등심과 돈육 다리 부위에서의 상온 추출과 50℃ 추출에 유의차($p < 0.05$)가 있음.
- 라. 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 비교의 경우, 제2절에서 연구 수행한 수행 결과와 유사한 양상을 띤.
- 마. 최적 추출조건에 따른 생리활성 비교 및 최적 생리활성 측정의 경우, 제3절에서 연구 수행한 수행 결과와 유사한 양상을 띤.
- 바. 일반 돈육에서 추출한 추출물의 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성.

- (1) Carnosine 함량 : 835.6~1021.7 mg/kg
- (2) AGE inhibition : 51.4~57.4 %
- (3) DPPH radical scavenging effect : 44.4~53.1 %

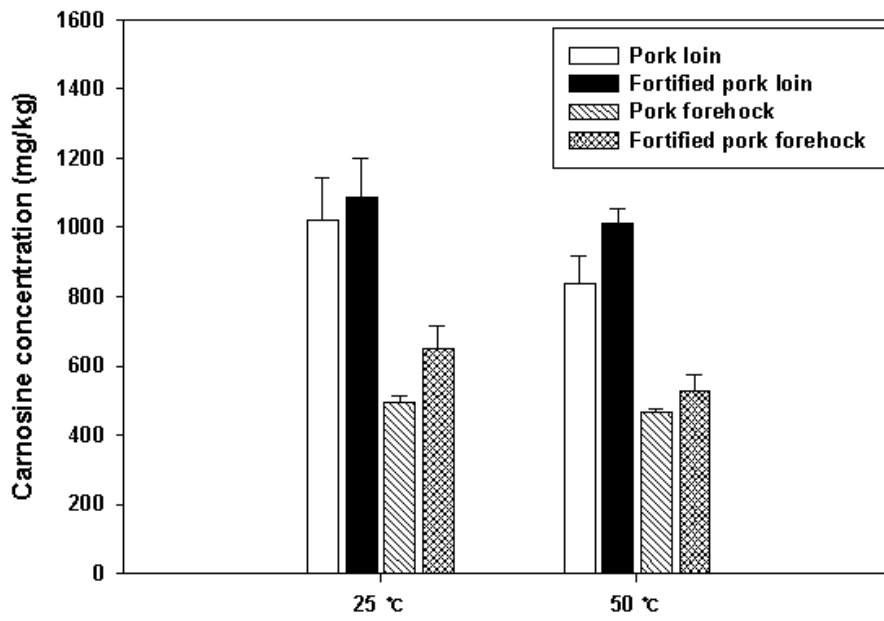


Figure 2-12. Comparison of carnosine concentration in pork extracts prepared under optimized condition.

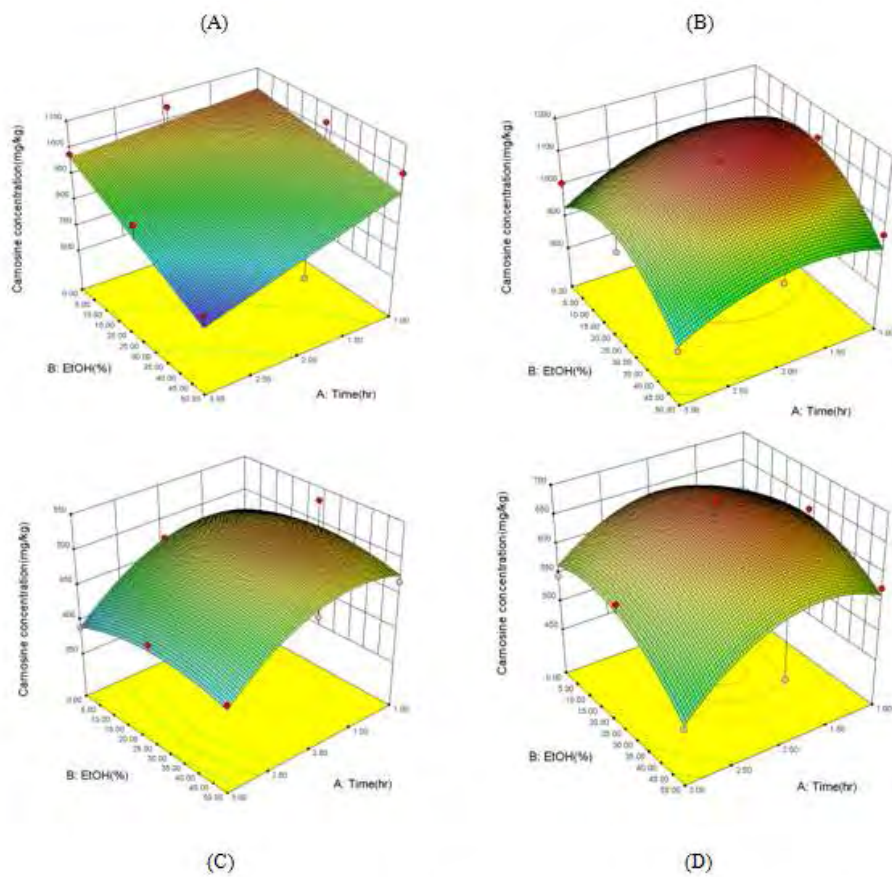


Figure 2-13. Effects of extracting conditions on the concentration of carnosine in pork extracts.
 Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at room temperatures.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
 C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

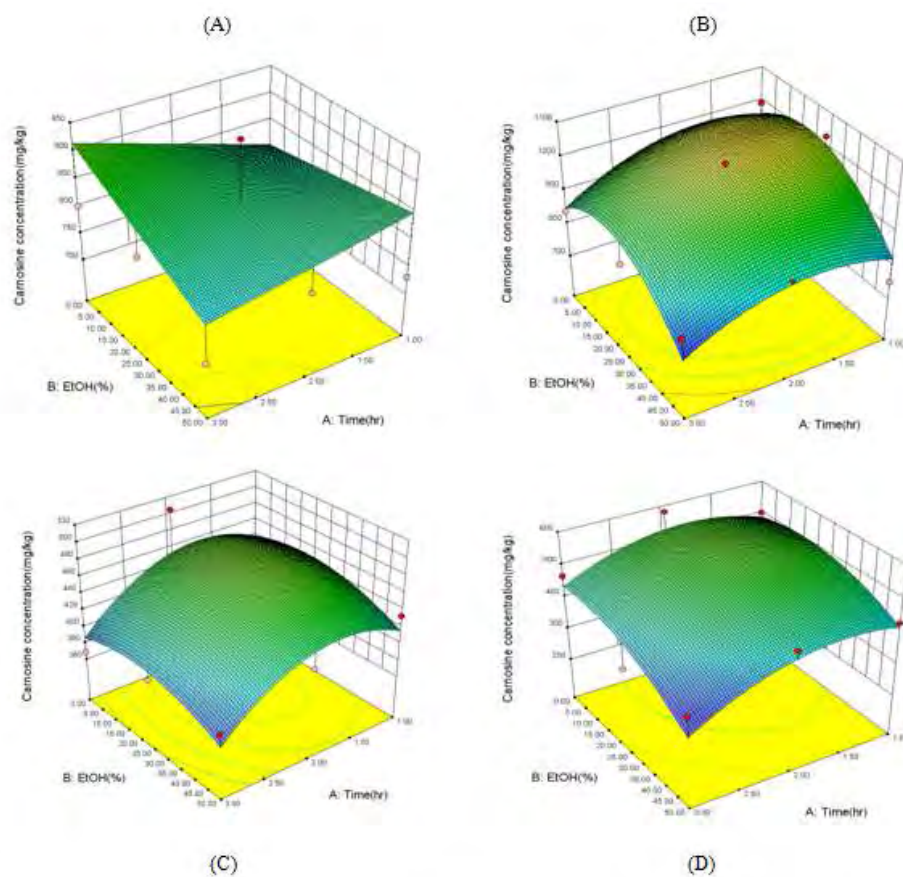


Figure 2-14. Effects of extracting conditions on the concentration of carnosine in pork extracts. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at 50 °C.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
 C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

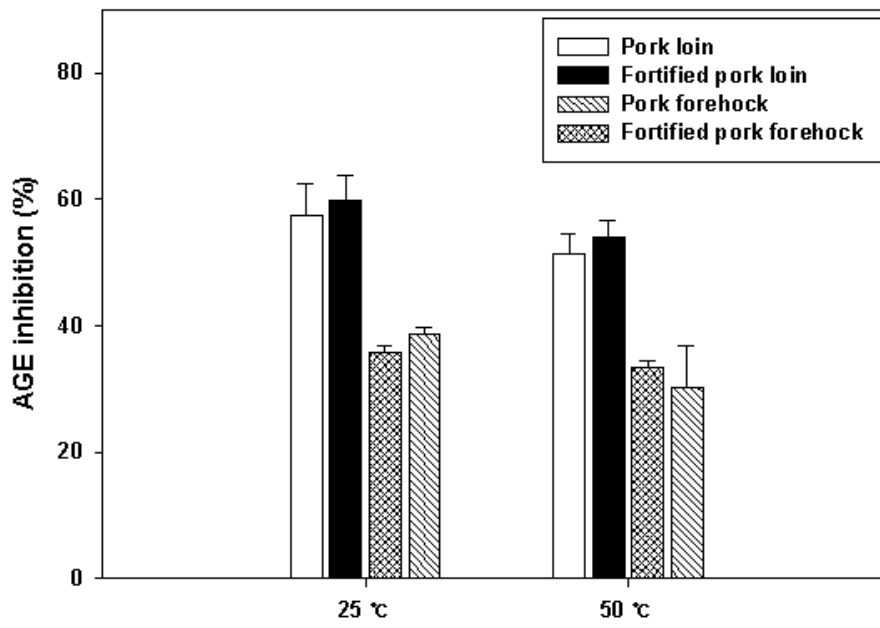


Figure 2-15. Comparing the inhibition of AGE formation with pork extracts prepared under optimized condition.

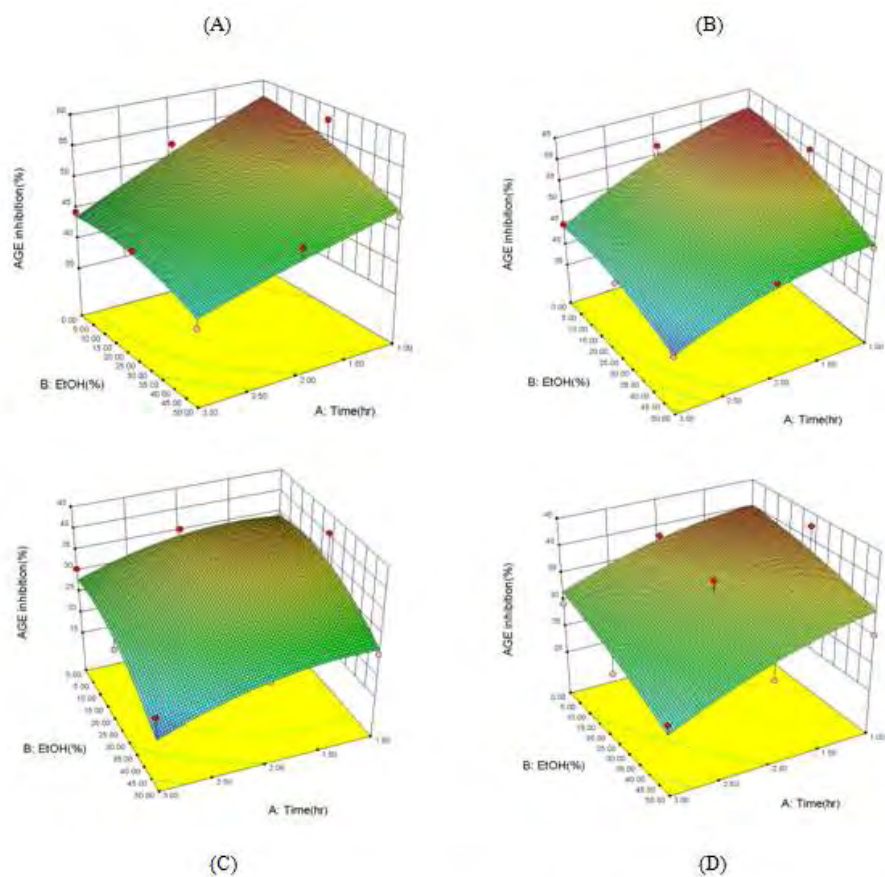


Figure 2-16. Effects of pork extracts on the inhibition of AGE formation with different extracting conditions. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at room temperatures.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

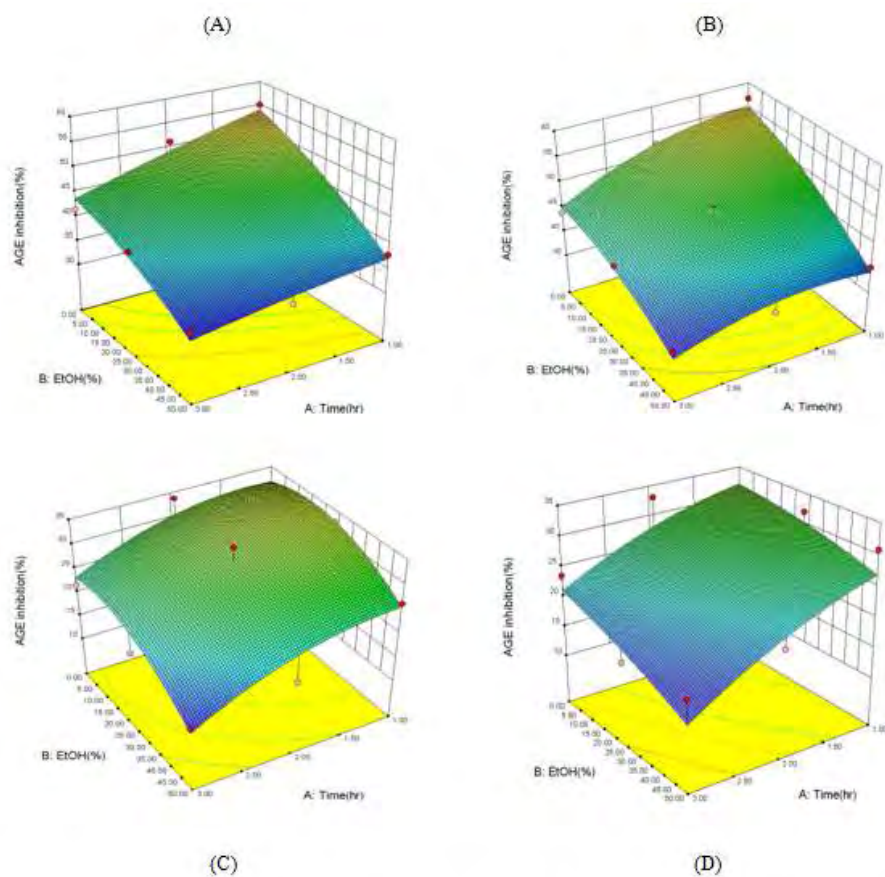


Figure 2-17. Effects of pork extracts on the inhibition of AGE formation with different extracting conditions. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at 50 °C.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

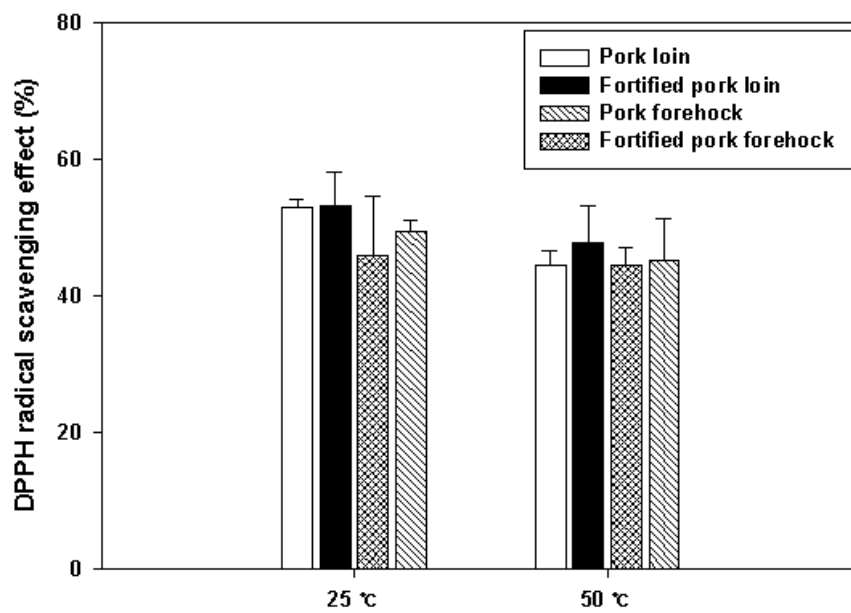


Figure 2-18. Comparison of the DPPH radical scavenging effect of pork extracts prepared under optimized condition.

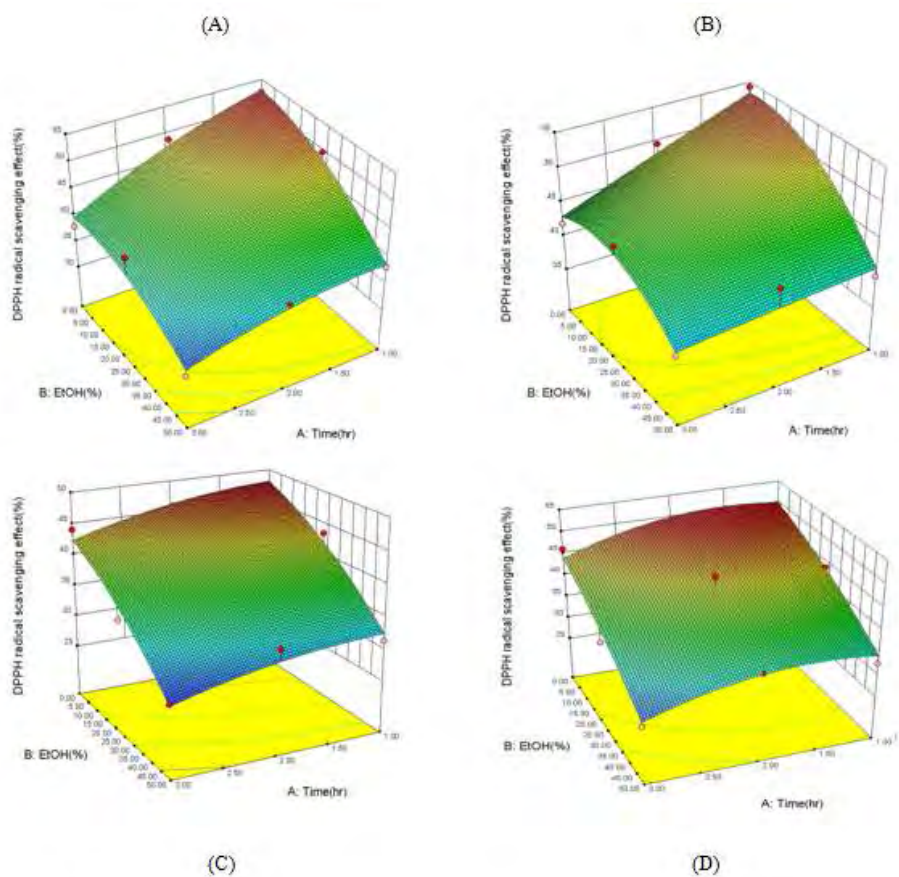


Figure 2-19. Effects of pork extracts on DPPH radical scavenging effect with different extracting conditions. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at room temperatures.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

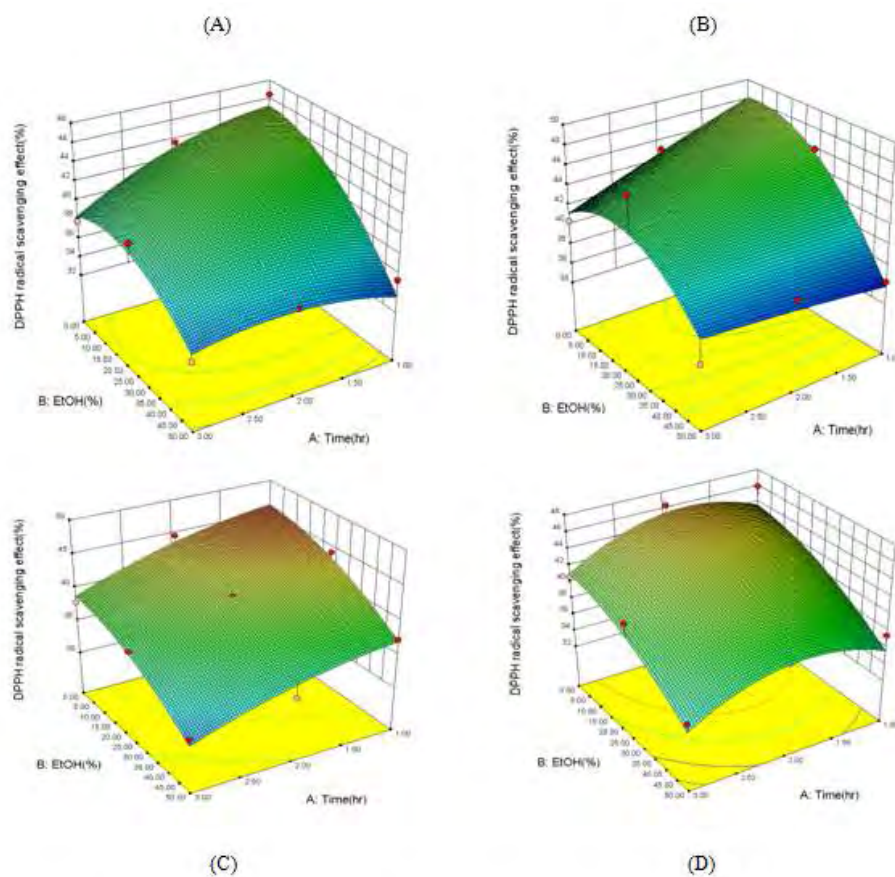


Figure 2-20. Effects of pork extracts on DPPH radical scavenging effect with different extracting conditions. Extracts were prepared for 2 hours with distilled water at 50°C.

A : Pork loin, B : Fortified pork loin
C : Pork forehock, D : Fortified pork forehock

Table 2-3. Optimal conditions for carnosine extraction from pork meat.

	Time (hours)	EtOH (%)	Carnosine concentration (mg/kg)	AGE inhibition (%)	DPPH radical scavenging effect (%)
Pork loin RT	1.00	0.00	1021.73	57.37	53.06
Pork loin 50°C	1.58	0.00	835.66	51.38	44.41
Fortified pork loin RT	1.00	9.81	1087.45	59.76	53.26
Fortified pork loin 50°C	1.18	7.72	1010.41	53.90	47.70
Pork forehock RT	1.40	8.74	494.22	35.68	45.95
Pork forehock 50°C	1.42	11.79	464.68	33.35	44.58
Fortified pork forehock RT	1.55	6.61	648.38	38.60	49.46
Fortified pork forehock 50°C	1.52	3.23	530.14	30.18	45.19

제 5 절 식품 첨가물 및 건강기능식품 소재화를 위한 특성 연구

1. 연구개발 수행 내용

가. 추출물의 carnosine 함량에 따른 생리활성 비교

(1) 재료 및 실험방법

선행 연구 결과를 기반으로 20주령, 90주령과 carnosine 강화 계육으로부터 carnosine 함유 펩타이드를 여러 가지 추출조건에 따라 추출하여, 최적의 추출조건 확립과 그에 따른 최적의 생리활성 조건도 확립하였다. Figure 2-21에 나타난 바와 같이 추출 조건 (시간(Time), EtOH(%) 농도)에 따른 4가지 요인들 (carnosine과 anserine의 함량, AGE inhibition (%), DPPH radical scavenging effect (%), Inhibition of lipid peroxidation (%)) 최적점을 측정 후 동시 최적화 기법을 이용하여 최적의 조건을 확립하였다. 또한 동일 조건에서 carnosine 강화 계육의 펩타이드 혼합물을 분리하고 이들의 생리 활성을 비교 분석하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

기존 결과와 carnosine 강화육 추출물의 분석 결과를 Figure 2-22에서 나타내었다. Carnosine의 함량은 전체적인 carnosine과 anserine의 량과 함께 증가하는 것으로 나타났다. Figure 2-23은 carnosine의 함량에 따른 AGE inhibition (%)의 상관관계를 나타낸 것으로, 20주령 계육에서 준비된 상은 추출물에서 가장 높은 carnosine 함량이 측정되었고 이에 따른 AGE inhibition (%)도 가장 높은 것으로 나타났다. 이와 반대로 50℃ 90주령 노계육 추출물은 가장 낮은 carnosine 함량과 함께 생리활성도 가장 낮게 측정되었다. Figure 2-24, 2-25에서는 carnosine 함량에 따른 Anti-oxidation activity (%)의 상관관계를 나타내었다. AGE 저해능과 동일하게 이들 활성도 carnosine 함량 증가와 함께 증가한 결과를 보였다. 이상의 결과를 종합하면, 추출물에서의 생리활성은 anserine과 carnosine의 함량에 따라 증가하며, 특히 carnosine의 상대적 비율이 높을 수록 비례하여 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 근육의 노화에 따라 carnosine의 양과 생리활성도 함께 감소하며, carnosine 강화육의 경우는 상대적인 carnosine 양의 증가에 의해 specific activity가 증대되었음을 보여주었다. 이러한 특성은 carnosine 강화육의 소재화에 매우 유용한 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대되었다.

나. Carnosine 추출물의 물리·화학적 특성 연구

(1) 재료 및 실험방법

Carnosine 추출물의 물성 특성을 측정하였다. 먼저 시료는 5%, 10% carnosine standard 용액, 5%, 10% carnosine 추출물과 carnosine 추출물에 carnosine의 안정화를 위해 trehalose를 2%, 4%를 첨가하여 제조하였다. Carnosine 추출물의 점도 측정을 위해 Rheometer (AR2000, TA, INS.)를 사용하였고, 전단율(Shear rate, 1/s)은 예비실험을 통해 carnosine 추출물에 적합한 10-100 s^{-1} 로 설정하고 이에 따른 점도와 전단응력(Shear stress, Pa)의 변화를 측정하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

Carnosine와 carnosine 함유 추출물, 그리고 trehalose가 첨가된 과 carnosine 추출물에 대한 물성 측정 결과는 Figure 2-26과 2-27에 정리하였다. 모든 시료들이 shear rate 증가에 따라 stress가 linear하게 증가하는 경향을 나타내었고, 10%의 농도에서도 매우 낮은 점도 값을 보였다. 전체적으로 dilatant 특성을 보였고, 시료들 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Trehalose는 protein / peptide drug의 formulation 시에 가장 중요한 안정화 요소로 널리 이용되는 소재로서 이당류의 단순한 구조를 함유하고 있다. Carnosine 안정화를 위한 model system으로 trehalose를 첨가하고 이들의 동력학적 특성을 비교하였으나, 추출물 등의 시료들과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이것은 trehalose 매우 높은 친수성 특성에 의한 것으로서 추가적인 점도 증가를 억제하여 친수성 펩타이드인 carnosine의 안정화에 긍정적인 영향을 주는 것으로 판단된다.

2. 연구개발 수행 결과

- 가. Carnosine 추출물 중 carnosine의 함량이 높을수록 그에 따른 생리활성도 큼.
- 나. Carnosine 강화 축산물에서의 추출한 carnosine 함유 펩타이드 중에서 carnosine이 anserine보다 생리활성이 더 큼.
- 다. Carnosine 추출물은 전단율(Shear rate, 1/s)에 따라 점도가 점점 증가하는 팽창성 유체(Dilatant liquid)와 유사한 특성을 나타냄.

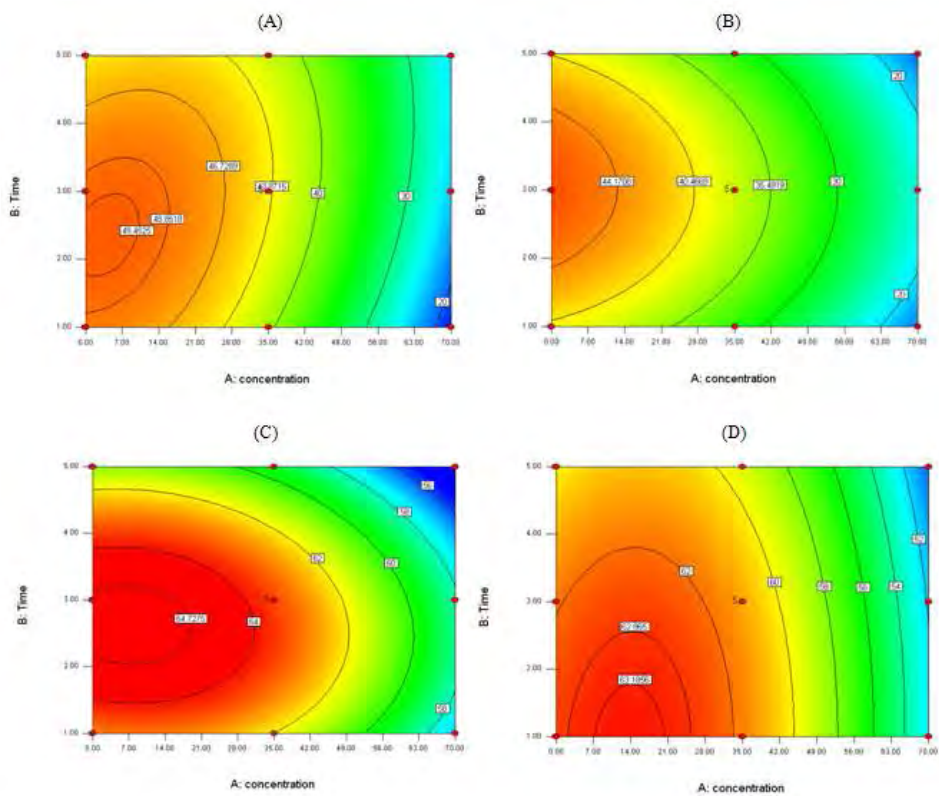


Figure 2-21. Multiple board optimization of chicken extracts on physiological activities with different extracting conditions.

A : 90 weeks Laying hen (room temperature) , B : 20 weeks Laying hen (50°C)
 C : 20 weeks Laying hen (room temperature) , D : 20 weeks Laying hen (50°C)

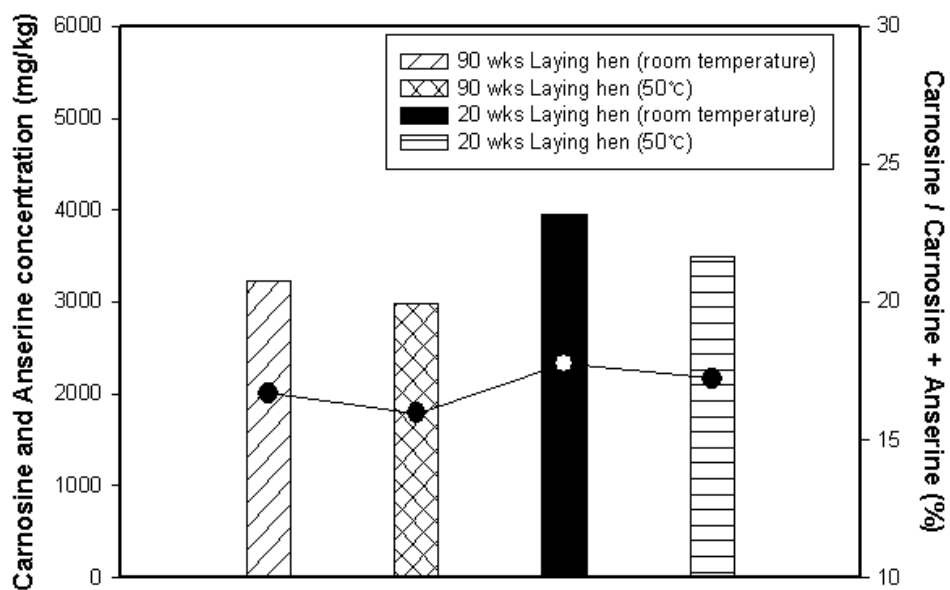


Figure 2-22. Comparing of carnosine and anserine concentration in chicken extracts prepared under optimized condition.

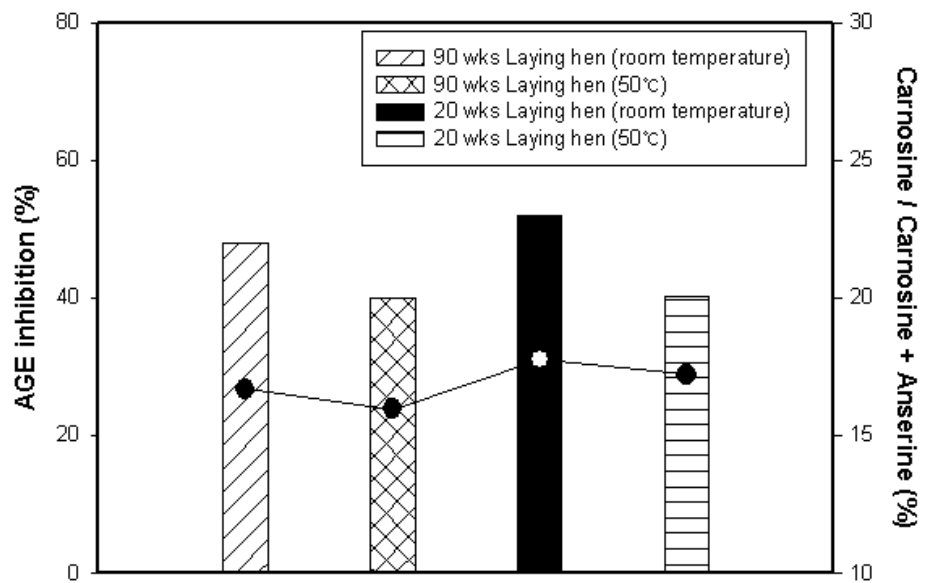


Figure 2-23. Comparing of inhibition of AGE formation with chicken extracts prepared under optimized condition.

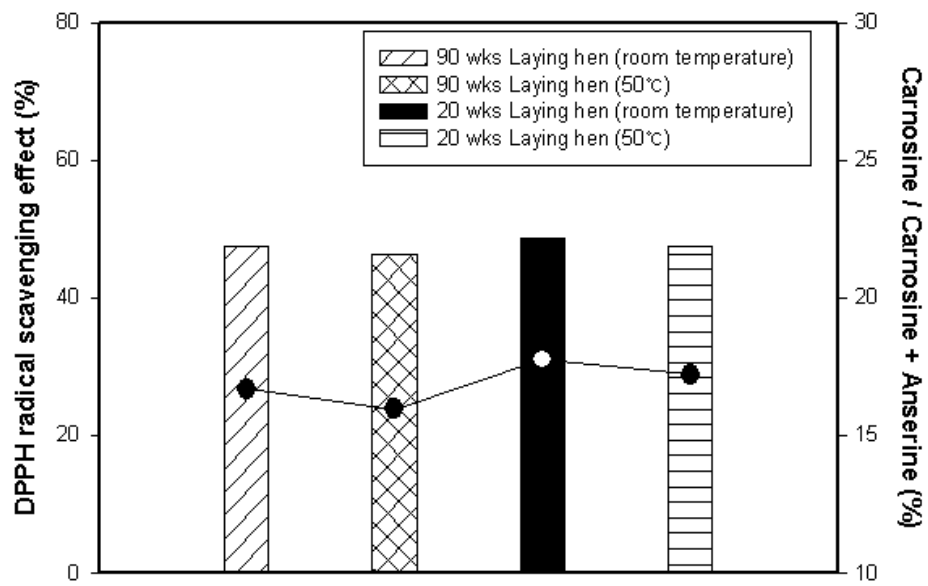


Figure 2-24. Comparing of the DPPH radical scavenging effect of chicken extracts prepared under optimized condition.

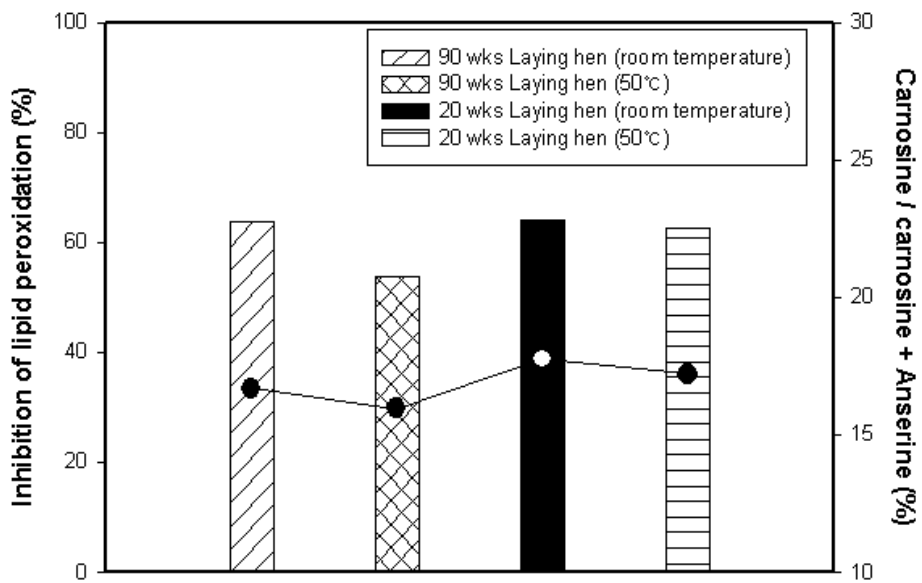


Figure 2-25. Comparing the inhibition of lipid peroxidation with chicken extracts prepared under optimized condition.

Table 2-4. Optimal conditions for carnosine extraction from chicken breast and pork loin meat.

	Time (hour)	EtOH (%)	Carnosine containing peptide (mg/kg)	Carnosine ratio (%)	Anserine ratio (%)	AGE inhibition (%)	DPPH radical scavenging effect (%)
Chicken breast	1.60	0.00	3944.53	21.05	78.95	51.97	48.69
Pork loin	1.00	0.00	1221.73	85.22	14.78	57.37	53.06

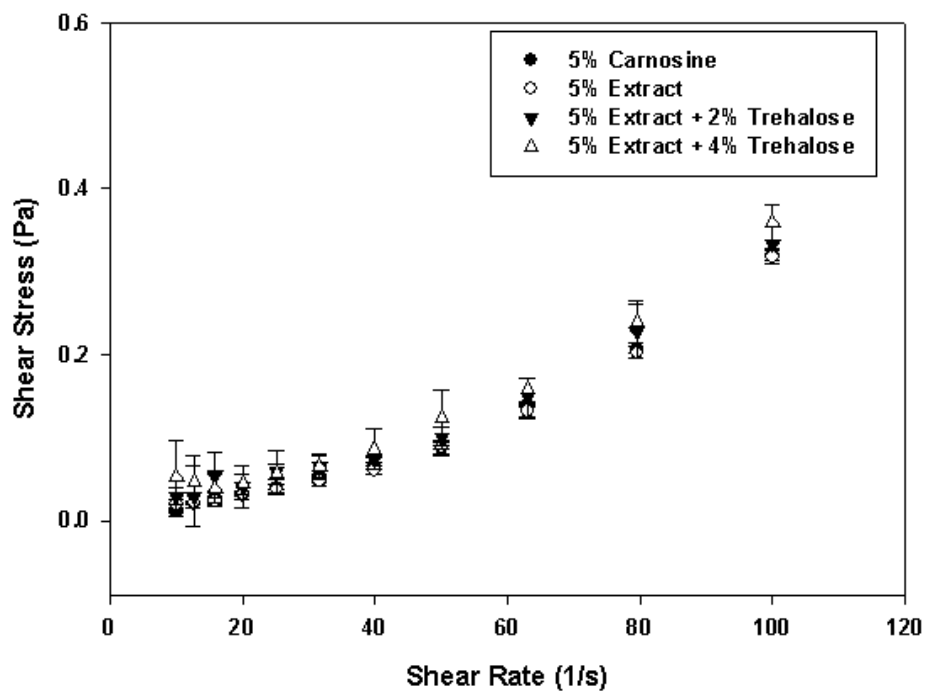


Figure 2-26. Comparing the rheological properties of carnosine, carnosine extract from chicken with trehalose as stabilizing agent (5%, w/v)

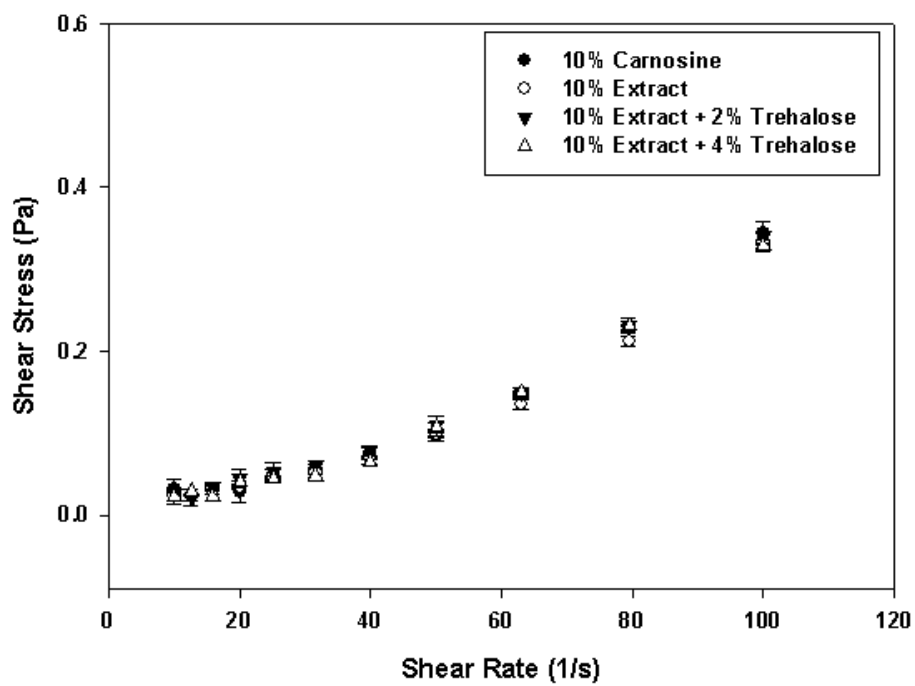


Figure 2-27. Comparing the rheological properties of carnosine, carnosine extract from chicken with trehalose as stabilizing agent (10%, w/v).

제 6 절 Carnosine 추출물의 제품화 기반 기술연구

1. 연구개발 수행 내용

가. 제품화를 위한 추출물의 온도에 대한 안정화 조건 확보

(1) 재료 및 실험방법

Carnosine 강화 돈육과 강화 계육으로부터 최적의 추출조건 및 정제조건으로 추출한 carnosine 함유 펩타이드 추출물의 제품화 기반 기술연구를 위해 추출물의 열안정성을 기반으로 안정화 조건을 조사하였다. 설정온도는 50~80℃, 시간은 0~3시간으로 정하여 실험을 실시하였다. 실험은 열처리 후 carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성을 측정하여, 설정온도와 설정 시간에 따른 생리활성 감소 정도를 제3장, 제2절 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성 비교에서 수행한 내용 중 AGE inhibition (%)과 DPPH radical scavenging effect (%)를 측정하는 방법으로 진행하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

실험은 여러 실험조건에 따른 생리활성의 감소 정도를 가지고 온도와 시간에 따른 carnosine 함유 펩타이드 혼합물 열안정성을 알아보았다. Figure 2-28은 온도와 시간에 따른 AGE inhibition (%)을 측정한 결과로 온도가 높아질수록 AGE inhibition (%)이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 Figure 2-29 열처리에 따른 상대적인 활성의 감소를 표기한 결과이다. 초기 활성의 50% 감소하는 시점은 기준으로 IC50 값을 산출한 결과, 50℃에서는 약 3시간, 60℃에서는 약 2.5시간, 70℃에서는 약 2.2시간, 그리고 80℃에서는 약 1.5시간으로 나타났다. 그러나 DPPH radical scavenging effect (%)의 경우는 80℃에서 3시간의 열처리를 거친 후에도 50% 이상의 활성을 유지하는 것으로 측정되었다. 이상의 결과들에 비추어 carnosine은 일반적인 펩타이드들에 비해 매우 높은 열안정성을 보유하고 있는 안정한 구조의 소재임을 확인할 수 있었고, 이러한 특성은 소재화를 통한 산업화에 매우 유리한 특성으로 판단되었다.

나. Carnosine 안정화 성분 참가에 따른 추출물의 안정화 조성 확보

(1) 재료 및 실험방법

Carnosine 강화 축산물로부터 추출한 carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 제품화 기술 기반 연구를 위해, trehalose를 후보 물질로 선정하여 carnosine의 안정화 효과를 측정하였다. 실험은 제3장, 제6절, 1, 가. 제품화를 위한 추출물의 온도에 대한

안정화 조건 확보를 위한 (1)재료 및 실험방법과 동일하게 진행하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

실험은 다양한 온도와 시간에서의 열처리에 따른 carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 활성을 측정하여 진행하였다. 후보물질로 선정된 trehalose는 단백질과 펩타이드 의약품의 안정화 formulation 시에 가장 중요한 역할을 하는 이당류의 당성분으로 높은 물리, 화학적 안정성과 수분과의 친화력을 기반으로 특히 수용성 생리활성 성분들의 안정화에 가장 좋은 소재의 하나로 인정받고 있다. 본 연구에서는 carnosine이 일반적인 생리활성을 보이는 소수성 펩타이드들과 달리 높은 수용성의 특징을 나타내는 점에 기반하여, trehalose 첨가에 의한 carnosine 혼합물의 안정화 효과를 측정해 보았다. Figure 2-28, 2-29은 trehalose의 첨가에 의한 시료들의 AGE inhibition (%)을 측정한 것으로 trehalose의 첨가는 AGE inhibition 활성 자체를 높이는 특성이 나타났다. Trehalose의 첨가는 무첨가구에 비해 약 5-10%의 활성 증가를 보였으며, 또한 80℃에서 3시간의 열처리 이후에도 AGE 저해 활성이 50% 이상 잔존하는 것으로 나타나 carnosine 활성의 안정화에 매우 유용함을 알 수 있었다.

항산화능의 경우(Figure 2-36, 2-37)도 trehalose 첨가에 의해 활성이 3-5% 가량 증가하는 것으로 나타났고, 열처리 이후에 모든 실험구에서 50% 이상의 항산화 활성이 잔존하는 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과를 통해 carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 안정화를 위해 trehalose의 첨가가 매우 유용함을 확인할 수 있었고, 안정성의 증대 뿐 아니라 carnosine 자체의 활성 증대를 통해 소재로서의 가치를 증대할 수 있을 것으로 기대되었다.

2. 연구개발 수행 결과

- 가. Carnosine 함유 펩타이드 혼합물은 고온에서도 안정성이 뛰어난 내열성이 안정한 소재질로 사료됨.
- 나. Carnosine 혼합물의 AGE 저해 활성에 대한 IC50 값은 50℃에서는 약 3시간, 60℃에서는 약 2.6시간, 70℃에서는 약 2.2시간, 80℃에서는 약 1.5시간으로 나타남.
- 다. 항산화능의 경우 열처리 이후에도 50% 이상의 활성을 보유하는 것으로 측정되어 매우 안정한 것으로 판단됨.
- 라. Carnosine 혼합물의 안정화를 위해 trehalose를 첨가한 경우, AGE 저해능은 약 5-10%, 항산화능은 약 3-5% 증가하는 것으로 나타났고, 열처리에 따른 안정성도 크게 증가하는 것으로 나타남.
- 마. Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 안정화를 위해 trehalose의 사용이 매우 유

용할 것으로 판단됨.

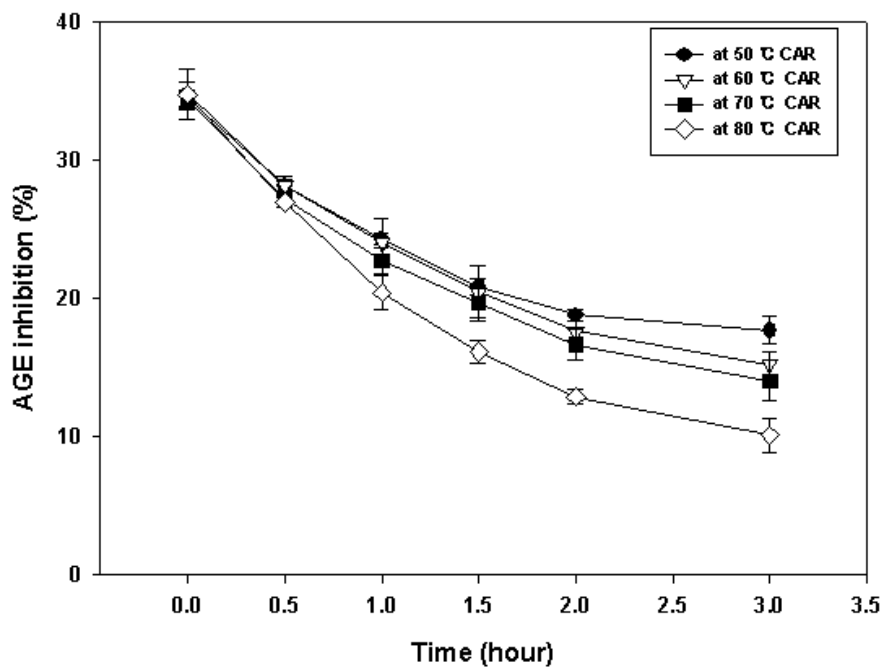


Figure 2-28. Effect of heat treatment on the AGE inhibition activity of carnosine.

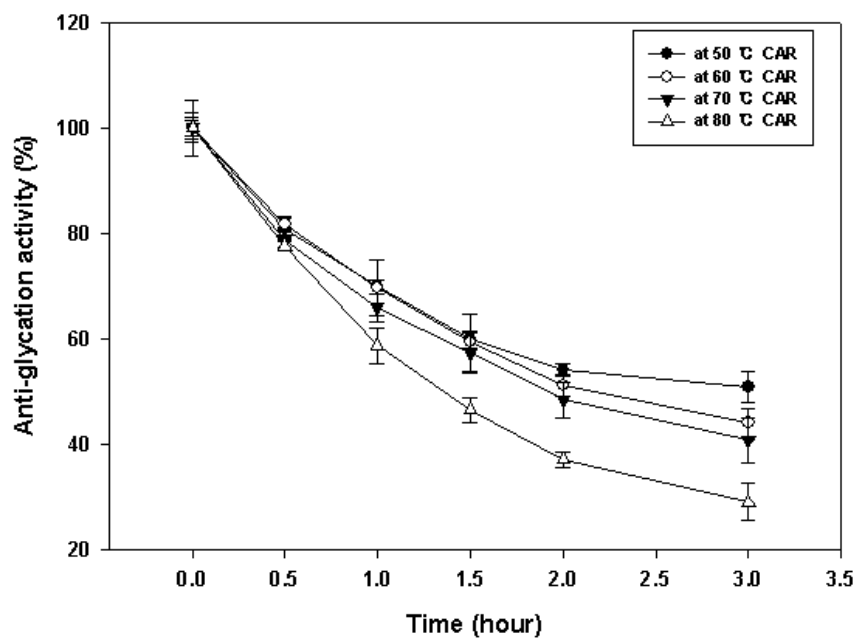


Figure 2-29. Effect of heat treatment on the anti-glycation activity of carnosine.

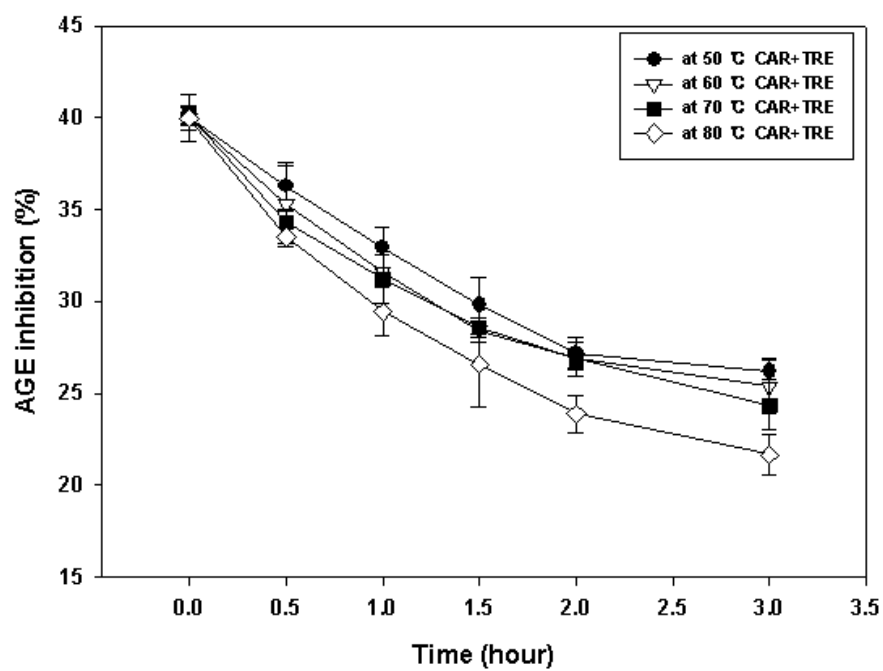


Figure 2-30. Effect of heat treatment on the AGE inhibition activity of carnosine solutions with trehalose as stabilizing agent.

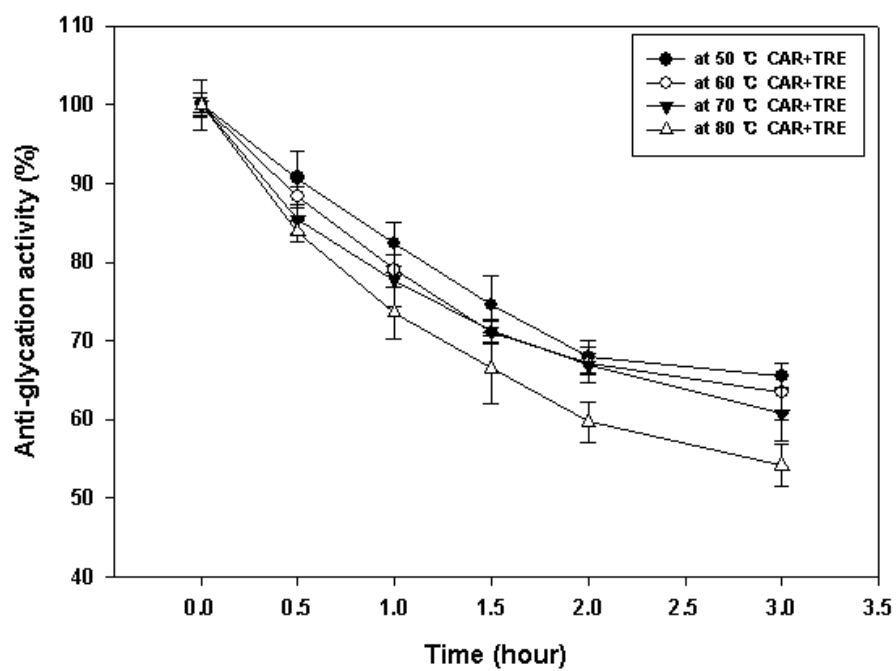


Figure 2-31. Effect of heat treatment on the anti-glycation activity of carnosine solutions with trehalose as stabilizing agent.

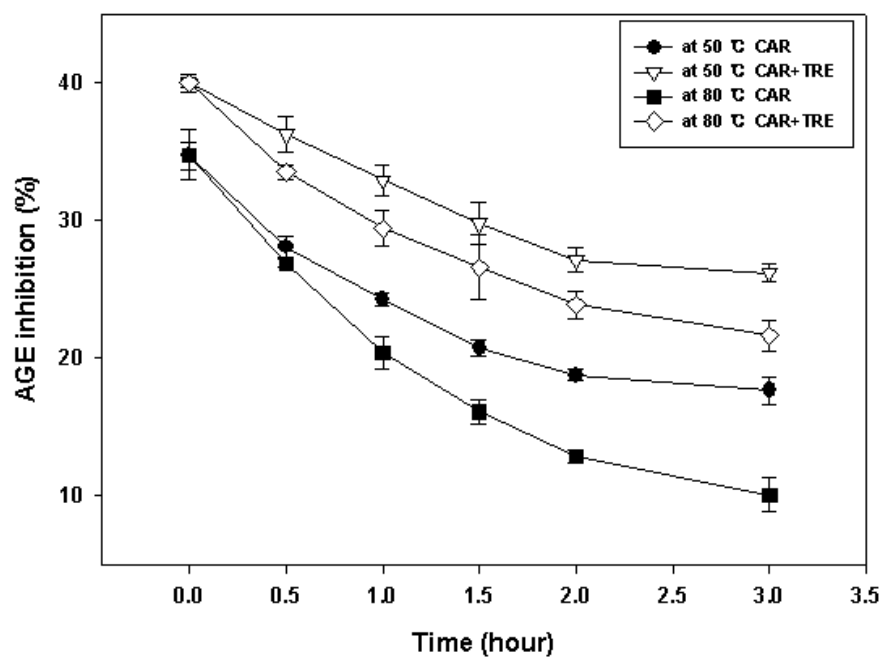


Figure 2-32. Comparing the AGE inhibition activity of carnosine with or without trehalose after different heat treatments.

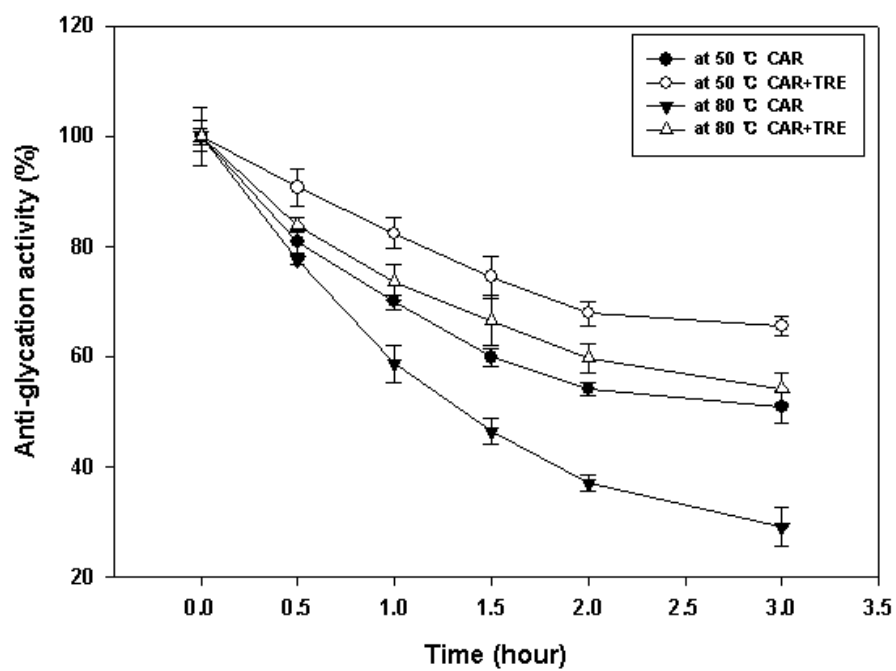


Figure 2-33. Comparing the Anti-glycation activity of carnosine with or without trehalose after different heat treatments.

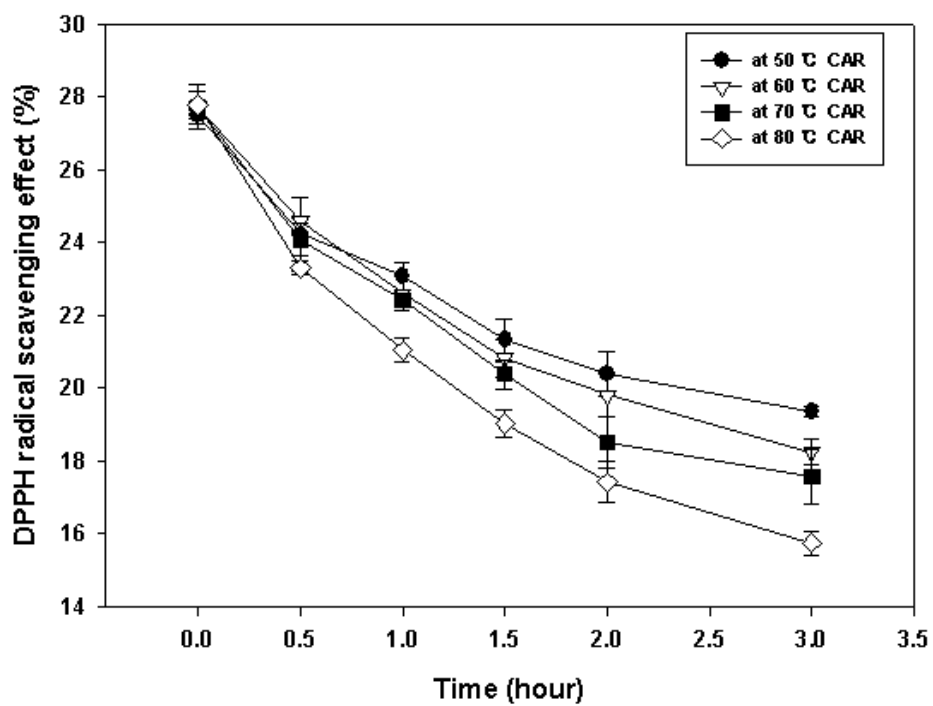


Figure 2-34. Effect of heat treatment on the DPPH radical scavenging activity of carnosine.

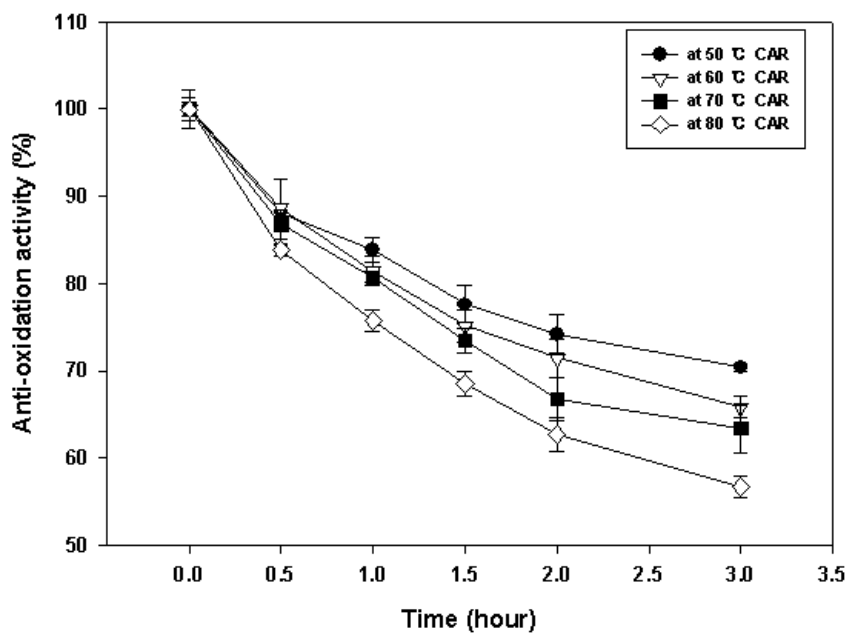


Figure 2-35. Effect of heat treatment on the anti-oxidation activity of carnosine.

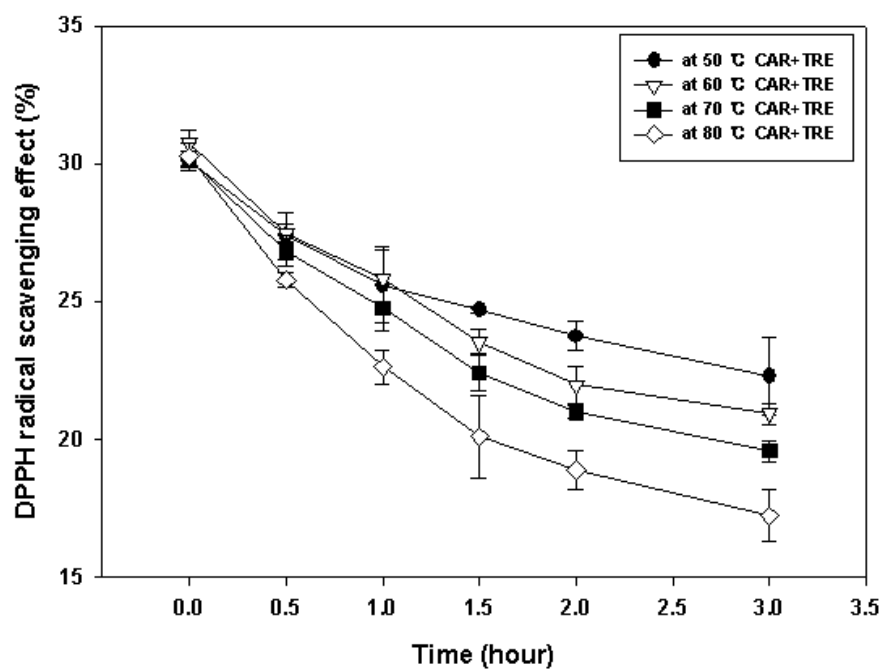


Figure 2-36. Effect of heat treatment on the DPPH radical scavenging activity of carnosine solutions with trehalose as stabilizing agent.

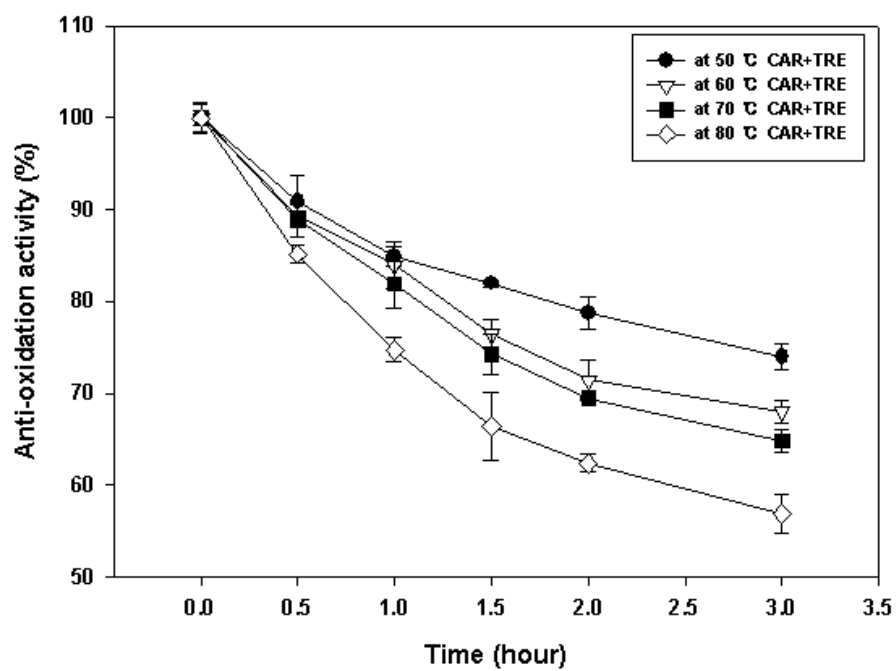


Figure 2-37. Effect of heat treatment on the anti-oxidation activity of carnosine solutions with trehalose as stabilizing agent.

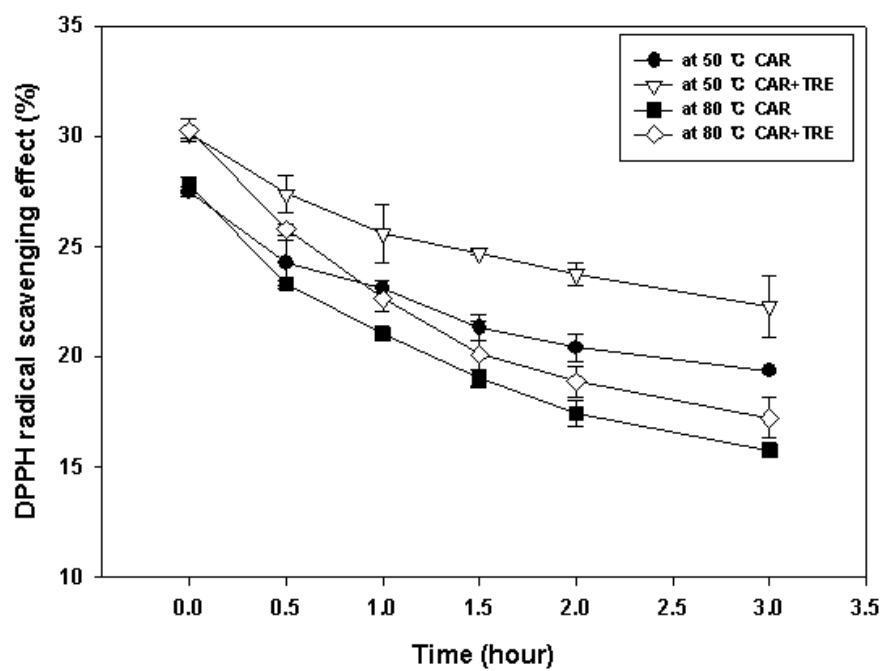


Figure 2-38. Comparing the DPPH radical scavenging activity of carnosine with or without trehalose after different heat treatments.

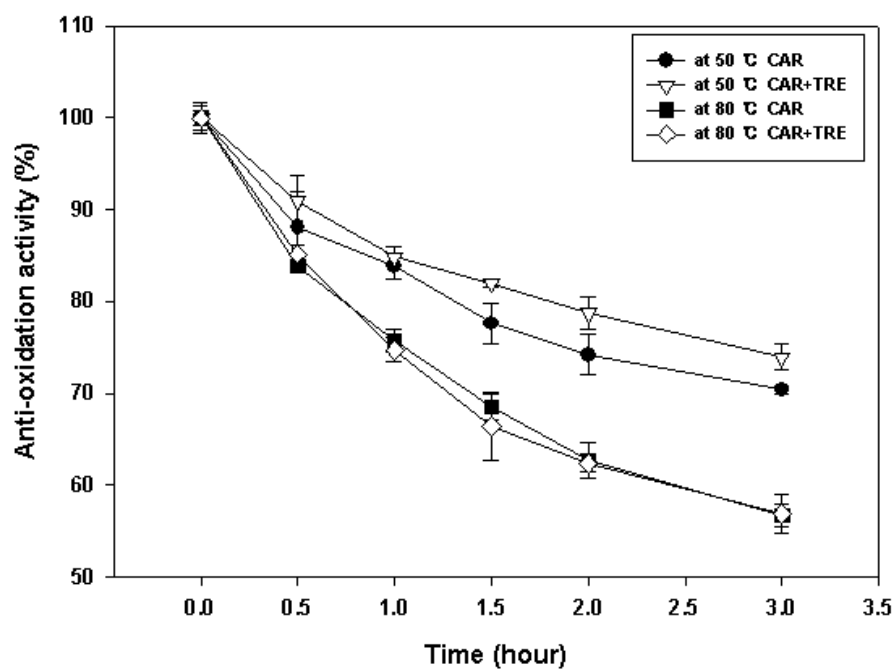


Figure 2-39. Comparing the anti-oxidation activity of carnosine with or without trehalose after different heat treatments.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표, 내용과 달성도 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

<제 2 세부과제>

가. Carnosine 강화 계육으로부터 효율적 carnosine, anserine의 추출 및 정제법 확립

나. 추출 및 정제조건에 따른 carnosine 생리활성 비교

다. Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 한 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구

라. Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구

마. 식품첨가물 및 건강기능식품 소재화를 위한 특성 연구

바. Carnosine 추출물의 제품화 기반 기술 연구

2. 연차별 연구개발 목표와 내용, 범위 및 달성도

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
2009	Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물 소재화 기술 개발	실험 1. 계육으로부터 효율적 carnosine 추출법 개발 - 노계육과 carnosine 강화 계육에서 carnosine, anserine의 추출, 정제법 확립 - 추출조건에 따른 carnosine, anserine의 추출 - RSM 통계 기법을 활용한 최적의 추출조건 확립	100 %
		실험 2. 추출 및 정제조건에 따른 carnosine의 생리활성 비교 - Anti-glycation activity (%) 측정 - Anti-oxidation activity (%) 측정 - RSM 통계 기법을 활용한 최적의 추출조건 확립	100 %
		실험 3. Carnosine 함유 펩타이드의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 한 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구 - 추출조건에 따른 생리활성 변화 측정 - 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정	100 %
2010	Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물 소재화 기술 개발	실험 4. Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구 - Carnosine의 추출 및 함량 측정 - 추출한 carnosine의 생리활성 비교 - 추출 및 정제조건에 따른 생리활성 변화 측정 - RSM 분석기법을 활용한 최적 추출조건의 확립과 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정	100 %
		실험 5. 식품첨가물 및 건강기능 식품 소재화를 위한 특성 연구 - 추출물의 carnosine의 함량에 따른 생리활성 비교 - Carnosine 추출물의 물리·화학적 특성 연구	100 %
		실험 6. Carnosine 추출물의 제품화 기술 연구 - 제품화를 위한 추출물의 온도에 따른 안정화 조건 확보 - Carnosine 강화 성분 첨가에 따른 추출물의 안정화 조성 확보	100 %

3. 연구 평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2009	Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물 소재화 기술 개발	30 %	Carnosine 강화 계육으로부터 효율적인 carnosine 추출, 정제법 확립
			30 %	추출 및 정제조건에 따른 carnosine의 생리활성 비교
			40 %	Carnosine 함유 펩타이드 혼합물의 생리활성 비교 및 이를 기반으로 한 최적의 생리활성 확보 및 조성 연구
2차 연도	2010	Carnosine 함유 천연 기능성 펩타이드 혼합물 소재화 기술 개발	30 %	Carnosine 강화 돈육에서의 carnosine의 효율적인 추출, 정제법 연구
			30 %	식품 첨가물 및 건강기능식품 소재화를 위한 특성 연구
			40 %	Carnosine 추출물의 제품화 기반 기술 연구
최종 평가		<ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 carnosine의 추출 및 정제법 확립 - Carnosine의 생리활성 기준법 확보 - 최적 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정 - RSM 분석 기법을 통한 최적 추출조건의 확립 - 제품화 위한 carnosine 의 안정화 조건 확보 	20 %	효율적인 carnosine의 추출 및 정제법 확립
			20 %	Carnosine의 생리활성 기준법 확보
			20 %	최적의 추출조건에 따른 최적 생리활성 측정
			20 %	RSM 분석 기법을 통한 최적 추출조건의 확립
			20 %	제품화를 위한 carnosine의 안정화 조건 확보

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 학술지 논문 게재 실적

- 가. Auh, J.H., Namgung, N., Shin, K.S., Park, S.W., Paik, I.K. 2010. Effect of supplementary blood meal on the contents of carnosine and anserine in broiler meat. *Journal of Poultry Science* 47: 302-309.
- 나. Kim, S.K., Paik, I.K., Auh, J.H. 2010. Comparing the anti-glycation activity of carnosine extracts from chicken and pork, *Food Science and Biotechnology*, (in preparation)

2. 학술대회 발표 실적

- 가. Yu-Mi Kim, Yun-Jung Park, Su-Jin Heo, Joong-Hyuk Auh, Preparation of carnosine containing peptides from chicken and it's functionality, 한국식품영양과학회 2009년도 국제 심포지엄 및 정기 학술 대회, 2009
- 나. Seung-Ki Kim, Joong-Hyuk Auh, Anti-glycation and radical scavenging activities of L-carnosine containing extract from pork, 한국식품영양과학회 2010년도 국제 심포지엄 및 정기 학술 대회, 2009

제 2 절 연구개발 성과활용 계획

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

가. 성장 중인 국내 및 해외의 기능성 축산물 시장 및 Tablet과 같은 건강기능성 식품 시장을 target으로 한다.

나. 제품의 특징으로는 carnosine 강화 기능성 축산물 및 천연 carnosine 함유 펩타이드 물질을 가지고 있는 건강 보조 기능성 물질로서 Anti-oxidant, Anti-aging 기능과 Anti-glycation 기능, 뇌기능 향상 및 지리병 예방과 더불어 운동 시 젖산 축적 감소 효과에 의한 피로감 감소 및 운동 지속 시간 증가 등을 강조하며 carnosine 함유 펩타이드 물질로 만듦 제품의 판매 대상으로는 건강한 삶을 오래도록 유지하고 싶어 하는 현대인, 과로와 피로를 쉽게 느끼는 직장인과 노화의 지연을 소망하는 노년층, 헬스 보충제 및 운동 능력 개선제로 carnosine에 관심이 있는 운동선수와 질병의 예방을 최우선으로 생각하는 Well-being 족, 뿐만 아니라 기능성 식품에 관심이 있는 모든 소비층을 주 Target으로 Marketing 을 펼친다.

2. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과 ¹⁾	1,000	2,000	3,000	5,000	8,000	19,000
경제적 파급효과 ²⁾	2,000	4,000	6,000	10,000	14,000	36,000
부가가치 창출액 ³⁾	4,000	6,000	10,000	15,000	25,000	60,000
합 계	7,000	12,000	19,000	30,000	47,000	115,000

1) 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
 2) 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
 3) 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 6 장 참고문헌

- Alhamadani MS, Al-Kassir AH, Abbas FK, Jaleel NA, Al-Tae MF; Antglycation and Antioxidation effect of Carnosine against Glucose Degradation Products in Peritoneal Cells. *Nephron Clin Pract* 107: 24-34, 2007
- Aristoy MC, Soler C, Toldra F; A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feed for ruminants. *Food Chemistry* 84: 485-491, 2004
- Aristoy MC, Toldra F; Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin protein in feeds for ruminants. *Meat Science* 67: 211-217, 2004
- Assero G, Lupo G, Anfuso CD, Ragusa N, Alberghina M; High glucose and advanced glycation end products induced phospholipid hydrolysis and phospholipid enzyme inhibition in bovine retinal pericytes. *Biochemical et Iophysica Acta* 1533: 128-140, 2001
- Bebum G, Cunliffe A, Leveritt M; Physiological Role of Carnosine in Contracting Muscle. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 15: 493-514, 2000
- Brownson C, Hipkiss AR; Carnosine reacts with a glycated protein. *Free Radical Biology & Medicine* 10: 1564-1570, 2000
- Carini M, Aldini G, Beretta G, Arlandini E, Facino RM; Acrolein-sequestering ability of endogenous dipeptides: Characterization of carnosine and homocarnosine/acrolein adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 38:996-1006, 2003
- Dukic S, Schinzel R, Riederer P, Münch G; AGEs in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and Anti-dementia drug. *Biogerontology* 2: 19-34, 2001

- Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, Halimi S: Albumin Antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Mediab* 31: 169-177, 2005
- Gariballa SE, Sinclair AJ: Carnosine : physiological properties and therapeutic potential. *Age and Ageing* 29: 207-210, 2000
- Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J, Souza MF; Caffeic and chlorogenic acid in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80: 339-344, 2009
- Harding JJ, Genea E: Protection against glycation and similar post-translational modification of proteins. *Biochemica et Biophysica Acta* 1964: 1436-1446, 2006
- Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ: Carnosine, the Anti-ageing, Anti-oxidation dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mechanisms of Ageing and Development* 122: 1431-1445, 2001
- Hipkiss AR, Brownson C: A possible new role the Anti-ageing peptide carnosine. *Biomolecular Sciences Division* 57: 747-753, 2000
- Hipkiss AR, Chana H: Carnosine Protects proteins against Methylglyoxal-mediated Modifications. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 248: 28-32, 1998
- Hipkiss AR: Carnosine and Protein Carbonyl Groups: A possible Relationship. *Biochemistry* 7: 771-778, 2000
- Hipkiss AR: Carnosine, a protective, Anti-ageing peptide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 863-868, 1998
- Hipkiss AR: Glycation, ageing and carnosine: Are carnivorous diets beneficial. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1034-1039, 2005
- Hobart LJ, Seibel I, Yeargans GS, Seidler NW: Anti-crosslinking properties

of carnosine: Significance of histidine. *Life sciences* 75: 1379-1389, 2004

Huand SC, Kuo JC; Concentrations and Antioxidative Activity of Anserine and Carnosine in Poultry Meat Extracts Treated with Demineralization and Papain. *Life sciences* 24: 193-201, 2000

Intarapichet KO, Maikhunthod B; Genotype and gender differences in carnosine extracts and Antioxidant activities of chicken breast and thigh meats. *Meat Science* 71: 634-642, 2005

Iwaes H, Gondo K, Koike T, Ono I; Pre-column Deproteinization Method of Human Plasma Using a hydroxyapatite Cartridge for High-Performance Liquid Chromatographic Amino Acid Analysis. *Analytical Science* 11: 73-77, 1995

Johnsen MB, Kiemer L, Brunak S; Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology* 16: 844-853, 2006

Jung HA, Jung TI, Yoon NY; Inhibitory effects of Nelumbo nucifera leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 46: 6818-3826, 2008

Kantha SS, Takeuchi M, Watabe S, Ochi H; HPLC Determination of Carnosine in Commercial Canned Soups and Natural Meat Extracts. *LWT-Food Science and Technology* 33:60-62, 2000

Khan KM, Saeed S, Ali M, Gohar M, Zahid J, Hhan A, Perveen S, Coudhary MI; Unsymmetrically disubstituted urea derivatives: A potent class of Antiglycation agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 2447-2451, 2009

Kim MS, Kim DW, Rhyn DY; 천연자원의 라디칼 소거능과 최종 당화 산물의 생성 저해활성 검색. *Korean journal of Pharmacognosy* 37: 307-313, 2006

Kim YS, Choi IW; 단백질 glycation 저해효과가 있는 식품 소재. *Korean Journal of Food Science Technology* 39: 458-463, 2007

- Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO; Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *Journal of Biological Chemistry* 273: 23252-25278, 1998
- Lee SK, Polyakova Y, Row KH, Lee SK; HCl 프로그램을 이용한 RP-HPLC에서의 펩타이드의 최적 분리 조건. *Theories and Applications of Chemical & Engineering* 8: 3517-3520, 2002
- Lehman TD, Ortwerth BJ; Inhibitors of advanced glycation endproduct-associated protein cross-linking. *Biochemical et Biophysica Acta* 1535: 110-119, 2001
- Li W, Ota K, Nakamura J, Naruse K, Nakashoma E, Oiso Y, Hamada Y; Antiglycation Effect of Gliclazide on *in vitro* AGE Formation from Glucose and Methylglyoxal. *Society for Experimental Biology and Medicine* 233: 176-179, 2008
- Lim SS, Kim HM, Kim SY, Jeon YE, Lee YS, Kang IJ; Effect of *Alpiniaofficinarum* on the Formation of Advanced Glycation Endproducts and Aldose Reductase Activity. *Food Science and Biotechnology* 18: 190-196, 2009
- Maemura H, Goto K, Toshioka T, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Takamatsu K; Effect of Carnosine and Anserine Supplementation on Relatively High Intensity Endurance Performance. *International Journal of Sports and Health Science* 4: 86-94, 2006
- Maikhunthod B, Intarapichet KO; Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its Antioxidant activity. *Meat Science* 71: 364-374, 2005
- Molyneux P; The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating Antioxidant activity Songklankarin. *Journal of Science and Technology* 26: 211-219, 2004
- Mora L, Sentandreu MA, Toldra F; Contents of creatins, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science* 79: 709-715, 2008

- Morgan PE, Dean RT, Davies MJ; Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 403: 259-269, 2002
- Múnch G, Mayer S, Michaelis J, Hipkiss AR, Riederer P, Müller R, Neumann A, Schinel R, Cunningham AM; Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of β -amyloid peptide. *Biochemica et Biophysica Acta* 1360: 17-29, 1997
- Nardiello D, Cataldi TRI; Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of chromatography A* 1035:285-289, 2004
- Park SH; Simultaneous Optimization Techniques for Multi-purpose Response Functions. *Journal of the Military Operations Research Society of Korea* 7: 1, 1981
- Plowman JE, Close E; An evaluation of a Method to Differentiate the Species of Origin of Meats on the Basis on the Contents of Anserine, Balenine and Carnosien in skeletal Muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 45: 69-78, 1988
- Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW; Chelating Activity of Advanced Glycation End-Product (AGE) inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 48967-48972, 2001
- Rahbar S, Yernini K, Scott S, Gonzales N, Lalezari I; Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419: 69-79, 2003
- Sato M, Karasawa N, Shimizu M; Safety evaluation of chicken breast extract containing carnosine and anserine. *Food and chemical Toxicology* 46:480-489, 2008
- Scartezzini P, Antognoni F, Raggi MA, Poli F, Sabbioni C; Vitamin C content and Antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic

preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 113-118, 2006

Song HS, Lee KT, Kang OJ; 뱀장어(*Anguilla japonica*) 추출물 중의 Carnosine, 단백질 및 펩톤 함량에 미치는 추출방법의 영향. *Journal of Fisheries Science and Technology* 39: 384-390, 2006

Szwergold BS; Carnosine and anserine act as effective transglycation agents in decomposition of aldose-derived Schiff bases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336: 36-41, 2005

Khuri AI, Conlon M; Simultaneous optimization of multiple responses represented by polynomial regression functions. *Technometrics* 23(4), 1981

Tian Y, Xie M, Wang W, Wu H, Fu Z, Lin L; determination of carnosine in Black-Bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) and common chicken by HPLC. *European Food Research and Technology* 226: 311-314, 2004

Vinson JA, Howard III TB; Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Nutritional Biochemistry* 7: 657-663, 1996

Wang AM, Ma C, Xie ZH, Shen F; Use of Carnosine as a Natural Anti-senescence Drug for Human Beings. *Biochemistry* 65: 869-871, 2000

Wu H, Shiao CY, Chen HM, Chiou TK; Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *Journal of Food and Drug Analysis* 11: 148-155, 2003

Yan H, Harding JJ; Glycation-induced inactivation and loss of Antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochemical Journal* 328: 599-605, 1997

Yeagans GS, Seidler NW; Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 75-80, 2003

Yokozawa T, Nakagawa T, Terasawa K: Effects of oriental medicines on the production of advanced glycation end products. *Journal of Traditional Medicines* 18: 107-112, 2001

Yoo MY, Park SH: 산죽잎으로부터 추출한 항산화물질의 특성. *Journal of Life Science* 15: 796-801, 2005