

뱀장어 (*Anguilla japonica*) 추출물 중의 Carnosine, 단백질 및 철분 함량에 미치는 추출방법의 영향

송호수* · 이근태 · 강옥주¹
 부경대학교 식품생명공학부, ¹경남대학교 생명과학부

Effects of Extraction Method on the Carnosine, Protein, and Iron Contents of Eel (*Anguilla japonica*) Extracts

Ho-Su SONG*, Keun-Tai LEE and Ok-ju KANG¹
 Department of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
¹Department of Food and Nutritional Sciences Kyungnam University 449 Wolyoung-dong, Masan, Kyungnam, 631-701 Korea

To improve the extractability of carnosine and the levels of pro-oxidants such as iron in eel (*Anguilla japonica*) extracts, we examined the effects of extraction time, temperature, ion exchange chromatography and ultrafiltration (UF). The respective protein and total iron were reduced approximately 55 and 60% at 60 °C, 63 and 70% at 80 °C, 68 and 76% at 100 °C and 82 and 48% with ion exchange chromatography, respectively, compared to the untreated extract. However, there was no significant difference in the carnosine levels in the eel extracts. Ultrafiltration reduced the protein content of the extract by 52% compared with the untreated extract. UF reduced the protein contents of the samples from 60, 80, and 100 °C heat treatment and ion exchange chromatography treatment by 27, 50, 46 and 47%, respectively. UF reduced the total iron contents of the identical four treatments by 14, 22, 23, and 43%, respectively, while UF increased the carnosine by 23, 17, 20, and 6%, respectively.

Key words: *Anguilla japonica*, Eel, Carnosine, Heat treatment, Ultrafiltration, Ion exchange chromatography

서 론

Carnosine은 β-alanine과 histidine이 펩타이드 결합을 이루고 있는 디펩타이드 화합물로서 약 100년 전 러시아 과학자인 Gluevitch and Amiradgibi (1900)에 의해 처음으로 발견되었다.

Carnosine은 척추동물의 골격근, 심장 등에 많이 함유되어 있다고 알려져 있으며 (Crush, 1970), 지금까지 carnosine의 추출은 주로 쇠고기와 칠면조, 닭 등과 같은 육상 동물의 골격근을 원료로 이루어져 왔다 (Chan et al., 1993; Gopalakrishnan et al., 1999). 골격근에 많은 양으로 존재하고 있는 천연 디펩타이드인 carnosine은 *in vitro*에서 철, hemoglobin과 singlet oxygen에 의해 촉매되는 지방산화를 억제시킬 수 있다는 것이 발견되었다 (Decker and Faraji, 1990).

철과 heme 함유 수용성 근육추출물에는 carnosine이 일정량 존재하고 있고, 비단백질에 결합된 철 즉, 저분자량의 철은 superoxide anion, H₂O₂·OH을 만들 수 있고, 이것이 지방산화를 촉진시킬 수 있다고 하였다 (Kanner et al., 1991; Chan, 1993; Decker, 1993). Heme 함유 화합물과 methemoglobin은 *in vitro*와 생체막에서 지방산화의 활성 촉매제이고 골격근으로부터 효과적인 천연항산화제를 얻기 위해서는 carnosine의 농도는 높고 유지하면서 산화촉진제의 함량은 낮출 수 있는 기술이

필요 하다고 보고하였다 (Bussayarat, 2005).

Decker and Crum (1993)는 가열처리 및 한외여과처리를 통해 어느 정도 유리철과 철단백질과 같은 산화촉진제의 함량을 감소시킬 수 있다고 보고하였으나 좀 더 효과적인 추출방법의 개선이 필요하다고 생각된다. 게다가 해양생물자원으로부터 carnosine의 효과적인 추출방법에 대해서는 아직 보고된 바가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 높은 carnosine의 함량은 유지하면서 산화촉진제의 함량은 낮출 수 있는 효율적인 방법을 검토하고자 지금까지 시도된 바 없는 수산 동물을 원료로 뱀장어로부터 다양한 추출방법으로 carnosine을 추출하여 이에 따른 carnosine 및 산화촉진제의 함량을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 뱀장어 (*Anguilla japonica*)는 부산광역시 남천동 남천해변시장에서 평균체중 300-400 g, 체장 50-70 cm의 뱀장어를 구입하여 살아있는 상태로 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

Carnosine과 p-bromoaniline, ferrozine, bovine serum albumin (BSA)과 Follin Ciocalteu's phenol 시약은 Sigma chemical (St. Louis, MO)에서 구입하였으며 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

*Corresponding author: coorwater@hanmail.net

시료 전처리

Carnosine 추출을 위해 살아있는 뱀장어를 수육 상에서 3시간 정도 방치시킨 후 즉살시켜 껍질과 두부, 내장, 뼈를 제거한 후 carnosine 추출용 시료로 사용 하였다.

일반성분 분석

일반성분의 분석은 AOAC법 (1995)에 준하여 실시하였다. 즉, 수분은 105℃에서 상압가열건조법으로, 조회분은 직접회화법으로, 조단백질은 micro-Kjeldahl법으로, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산은 Ser 등 (2002)의 방법에 준하여 다음과 같이 행하였다. 즉, 시료 50 g에 75% ethanol 50-250 mL를 가하여 75℃에서 60분간 환류 추출하였다. 잔사는 다시 75% ethanol 250 mL로 2회 반복 추출하여 40℃에서 감압농축한 후 0.2 M lithium citrate buffer (pH 2.2)로 용해시켜 50 mL로 정용하였으며 0.22 μm의 syringer filter로 여과하여 아미노산 자동 분석기 (Hitachi Model 835-50, Japan)로 분석하였다.

무기성분 분석

무기성분분석은 식품공전 시험법 (2002)에 따라서 습식분해법으로 시료를 조제하여 분석하였다. 즉, 시료 5 g을 250 mL 분해플라스크에 취하고 HNO₃ 10 mL를 넣어 가열하여 내용물을 건조시킨 후 HNO₃용액 (HNO₃:H₂O=1:2) 10 mL와 60% HClO₄ 10 mL를 넣고 무색이 될 때까지 가열하였다. 이어 소량의 증류수로 희석하여 증발접시에 옮기고 다시 가열하여 HClO₄를 증발시킨 후 HCl용액 (HCl:H₂O=1:2) 10 mL와 동량의 증류수로 희석하여 수육 상에서 완전히 용해한 후 100 mL로 정용하여 분석용 시료로 사용하였으며 원자흡광분광광도계 (AAAnalyst 800, Perkin elmer, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

Carnosine 함량 측정

Carnosine 함량 측정은 Parker (1966)의 방법에 따라 추출물 1.0 mL에 1.0 mL의 0.04 M versene과 1.0 mL의 20% Na₂CO₃와 diazotized ρ-bromoanilione 용액을 첨가하고 95% ethanol 2 mL를 첨가한 후 5분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

단백질 함량 측정

추출조건에 따른 단백질 함량의 변화를 살펴보기 위해 Lowry et al. (1951)의 방법에 의거하여 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하여 추출조건에 따른 단백질의 함량변화를 살펴보았다.

철 함량 측정

철 함량 측정은 Stookey (1970)의 방법에 따라 추출물 1.0 mL에 0.2 mL의 sulfuric acid를 가해 용해시킨 후 0.4 mL의 30% hydrogen peroxide를 첨가하여 110℃에서 2시간 동안 가

열하고 1.0 mL의 10% hydroxyl amine hydrochloride를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응 시킨 후 1.0 mL의 ammonium acetate buffer를 첨가하고 1 M NaOH를 가해 pH를 6.0으로 조절한다. 그리고 0.5 mL의 ferrozine solution (9 mM)을 첨가한 후 실온에서 5분간 방치 후 562 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산 하였다.

HPLC 분석

Knecht 등 (1986)의 방법에 따라 추출물 25 μL에 탈이온수 25 μL를 첨가한 후 혼합물에 50 μL NaHCO₃ buffer (100 mM; pH 8.3)와 200 μL의 Dabsyl-Cl 용액 (4 mM)을 첨가한 후 70-72℃에서 15분간 가열하고 700 μL의 Na₂HPO₄ buffer (50 mM; pH 7.0)를 첨가한 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 액을 HPLC (Hewlett Packard, 1,100 serie, USA)에 10 μL를 주입하였으며 column은 Jupiter C₁₈ (5 μm; 4.6 mm×25 cm, phenomenex)을 사용하였다. 이동상 용매는 sodium acetate buffer (25 mM; pH 6.5)와 acetonitrile을 사용하였고 유속은 1 μL/min, column 온도는 40℃ 검출과장은 436 nm에서 분석 하였다.

LC/MS를 이용한 질량분석

Carnosine 추출물은 LC/MS (Agilent 1100 Series LC/MSD Agilent, Co. Ltd.)를 이용하여 분석하였으며 이동상은 Water/Acetonitrile/MeOH=35:30:35 (pH 2.6)을 사용하였으며 컬럼은 Symmetry (150×3.9 mm, 5 μm 1 mL/min)를 사용하여 분석 하였다.

Carnosine 추출

1) 가열추출

Chan (1993)의 방법에 따라 뱀장어 육 약 100 g을 잘게 썰어 2배의 탈이온수를 가한 다음 blender에서 2분간 갈은 후 homogenizer로 2분간 4회 균질화한 후 4℃, 8,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 상등액을 취한 후 Whatman No. 4 필터를 이용하여 여과한 액을 60℃, 80℃, 100℃에서 10분간 가열처리 후 다시 8,000×g에서 15분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 후 Whatman No. 4 필터로 여과하였다 (Fig. 1).

2) 이온교환처리

McManus (1957)의 방법을 변형하여 뱀장어 육에 10배 가량의 1% picric acid를 가해 마쇄한 뱀장어 육을 균질화한 후 8,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 상등액을 Dowex-2 chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 단백질 잔여물과 picric acid를 제거하였다 (Fig. 2).

3) 한외여과처리

Bussayarat 등 (2005)의 방법을 변형하여 추출물의 분자량을 조절하였으며, Amicon 사의 stirred cell 한외여과 장치를 이용 하였다. 즉, 저분자 펩타이드인 carnosine 분리를 위해서 가열 처리 및 이온교환 처리한 시료를 membrane filter (XM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)로 걸러서 분자량을 최종

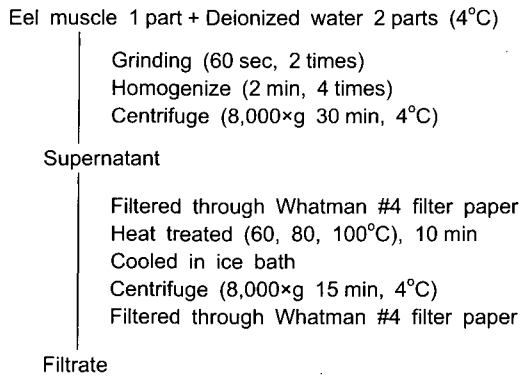


Fig. 1. Procedures for extraction of eel (*Anguilla japonica*) carnosine with heat treatments.

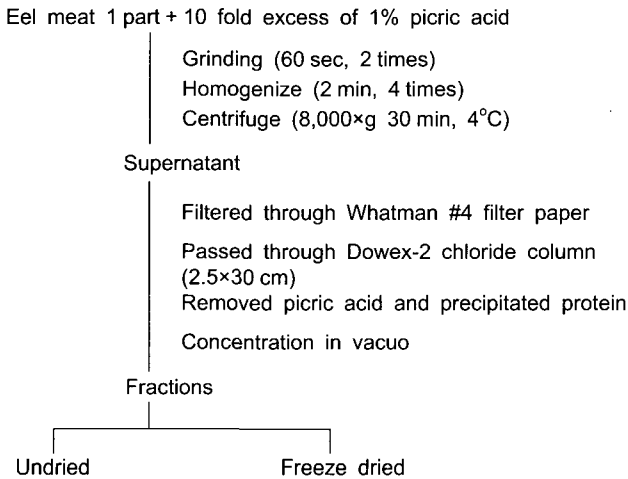


Fig. 2. Procedures for extraction of eel (*Anguilla japonica*) carnosine with ion exchange chromatography.

500 Da 이하까지 조절하였으며 여과액을 -50°C 이하로 냉동시킨 후 동결건조하여 실험용 시료로 사용하였다 (Fig. 3).

통계처리

통계적인 유의성 검정은 SPSS system (Statistical package, SPSS INC. NO)을 이용하여 Duncan's multiple range test로 P<0.05 수준에서 시료간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

뱀장어육의 성분 분석

뱀장어 육의 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 수분 60.66±0.52%, 단백질 17.93±0.42%, 지질 19.98±0.11%, 회분 1.18±0.07%로 나타났다. 황 (1999)의 보고에 의하면 떡장어와 갯장어의 경우 단백질은 각각 16.62%, 19.6%, 지질은 7.03%, 11.9%를 함유하고 있다고 하였다. 본 연구의 시료로 사용한 뱀장어의 지질함량은 갯장어나 떡장어보다 높은 결과를 나타내었다.

뱀장어에 함유된 무기성분 함량을 분석한 결과는 Table 2와

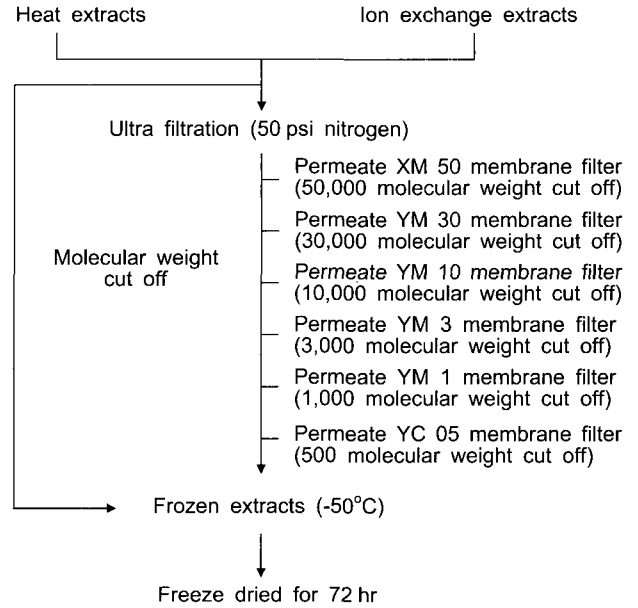


Fig. 3. Procedures for molecular weight cut off of eel (*Anguilla japonica*) extracts.

Table 1. Proximate composition of eel (*Anguilla japonica*)

Ingredients	Content (%)
Moisture	60.66 ± 0.52*
Crude Protein	17.93 ± 0.42
Crude Lipid	19.98 ± 0.11
Crude Ash	1.18 ± 0.07

*Data are expressed as means±standard deviation (n=3).

Table 2. Contents of mineral of eel (*Anguilla japonica*) (mg/100 g)

Minerals	Content
Ca	159.6
P	216.9
K	232.4
Na	129.3
Cu	5.1
Zn	1.9
Fe	2.4
Total	747.6

같다. 전체 무기질 함량 중 근육과 신경의 기능조절에 필요한 K이 가장 높았으며, 다음으로는 인체 내에서 골격과 치아조직의 형성과 삼투압 조절에 중요한 역할을 담당하는 P, Ca, Na 순으로 높게 나타났으며 항산화 효소의 구성성분인 Cu와 Zn이 각각 5.14 mg/100 g, 1.94 mg/100 g 그리고 산화촉진제로 작용할 수 있는 Fe이 2.36 mg/100 g 함유되어 있는 것으로 조사되었다.

히스티딘계 저분자 펩타이드인 carnosine 추출을 위한 원료로서 뱀장어의 적합성을 확인하고자 수산 어류 중 히스티딘계 저분자 펩타이드가 많이 함유된 것으로 알려진 뱀장어와 가다랑어를 대상으로 유리 아미노산 함량을 분석하였다

Table 3. Contents of free amino acid in eel (*Anguilla japonica*) and skipjack tuna (*Euthys pelmis*) (mg/100 g)

	Eel	Skipjack
Alanine	-	12.3
Anserine	-	409.6
Arginine	3.5	5.4
Asparagine	0.3	-
Aspartic acid	0.6	-
Carnosine	377.9	59.3
Citrulline	3	-
Cystathionine	14.4	1.6
Cysteine	2.2	-
D,L- β -Aminoisobutyric acid	32.9	-
Glutamic acid	3.8	12.4
Glycine	6.4	5.3
Histidine	3.7	606.7
Hydroxy-L-Proline	3.7	-
Isoleucine	2.2	1.2
Leucine	1	4.1
Lysine	7.9	10.3
Mehionine	-	2.7
Phenylalanine	-	2.5
Proline	4.9	4.3
Sarosine	0.6	1.3
Srine	1.7	1.6
Taurine	28	41.2
Threonine	2.6	1.8
Tyrosine	4.4	3.7
Valine	0.4	2.6
β -Alanine	0.4	3.4
δ -Hydroxylysine	2.7	-
Total	542.5	1,193.3

(Table 3). 뱀장어의 경우 carnosine이 전체 유리아미노산 조성의 약 70%의 함량을 나타내었으며, 가다랑어는 histidine이 50.84%, anserine이 34.32%로 전체 유리 아미노산의 85% 이상을 차지하는 것으로 나타났다. 뱀장어에는 anserine이 함유되어 있지 않으나 가다랑어에는 carnosine과 anserine을 모두 함유하고 있는 것으로 나타났고, anserine의 함량이 carnosine에 비해 8배 정도 높은 것으로 조사되었다. 이상의 결과에서 뱀장어의 경우 히스티딘계 저분자 펩타이드 중 anserine은 함유되어 있지 않고, carnosine만 함유하고 있다는 사실은 뱀장어가 carnosine 추출용 원료로 적합하다는 사실을 보여주는 결과라 판단된다.

Hwang (1999)에 의하면 먹장어의 경우 삼투압조절과 오피늄류의 대사에 관여한다고 알려져 있는 alanine, glycine, proline, taurine 등의 아미노산 함량이 높은 반면 carnosine은 검출되지 않았으며, anserine은 5.8% 정도 함유되어져 있다고 보고하였다.

동물의 근육에 함유된 히스티딘계 저분자 펩타이드의 종류 및 함량은 종과 근육의 종류 및 나이에 따라 차이가 있으며, 연어, 토끼, 닭에는 anserine 함량이 높은 반면 돼지, 소, 칠면조에는 carnosine이 anserine 보다 높다고 보고되어 있다 (Chan et al., 1993; Comet et al., 1999). 그리고 근육의 종류에 따라서는 적색근 보다 백색근에서 carnosine 함량이 높으며 골격근 내 히스티딘계 저분자 펩타이드 존재량은 소, 돼지, 닭, 어류에

서 5-70 mM 정도 존재하는 것으로 알려져 있다 (Crush et al., 1970; Djenane et al., 2004).

추출조건에 따른 함량변화

1) 가열온도에 따른 함량변화

Carnosine 추출과정상의 가열온도에 따른 추출물 중에 함유된 단백질, 철, carnosine 함량변화를 살펴본 결과는 다음과 같다 (Table 4).

Table 4. Composition of undried eel (*Anguilla japonica*) extracts which had been subjected to heat treatment

Treatments	Contents (μ g/mL)		
	Protein	Total Fe	Carnosine
Unheated	146.9 \pm 5.4 ^{*a}	9.2 \pm 0.7 ^a	480.4 \pm 7.0 ^a
60°C, 10 min.	66.5 \pm 6.2 ^b	3.6 \pm 0.8 ^b	437.0 \pm 13.2 ^b
80°C, 10 min.	53.6 \pm 2.9 ^c	2.7 \pm 0.3 ^b	465.4 \pm 16.1 ^a
100°C, 10 min.	46.1 \pm 3.5 ^d	2.2 \pm 0.2 ^b	483.5 \pm 3.7 ^a

*means \pm standard deviation (n=3).

60, 80, 100°C로 가열처리하였을 때 단백질 함량은 비가열처리 구에 비해 각각 55%, 63%, 68% 감소되었으며, 철 함량은 60%, 70%, 76% 감소된 것으로 조사되었다.

이러한 단백질 함량의 감소는 가열 처리를 통해 단백질의 열변성이 야기되고 변성이 일어난 단백질은 상대적으로 구상 단백질의 응집현상에 의해서 용해성이 감소하게 되며 원심분리를 통해서 변성 단백질을 침전시킴으로써 효율적으로 단백질의 함량을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 단백질 침전을 통해 산화촉진제로 작용할 수 있는 철단백질 및 유리 철 또한 감소되는 것으로 알려져 있다 (Bussayarat, 2005).

이에 반해 상대적으로 carnosine 함량은 60°C로 가열처리한 경우에는 약간의 감소가 나타났으나 80°C와 100°C로 가열한 경우에는 비가열처리구와 비교시 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 기타 연구보고에 의하면 가열처리를 통해 단백질 및 철함량을 감소시킬 수 있으나 (Decker et al., 1993; Chan et al., 1993; Kanner et al., 1991), 온도변화에 따른 carnosine의 함량 변화는 크지 않았다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다 (Bussayarat et al., 2005; Gopalakrishnan et al., 1999).

2) 이온교환처리에 따른 함량변화

이온교환법을 이용한 추출물 중의 단백질, 철, carnosine 함량을 조사한 결과는 Table 5에 나타내었다. 표에서 단백질, 철, carnosine 함량은 각각 25.29 \pm 1.05 μ g/mL, 4.76 \pm 0.15 μ g/mL, 502.41 \pm 1.12 μ g/mL이었다. 단백질 함량은 비가열처리구에 비해 82%, 100°C 가열처리구에 비해 45% 정도 감소한 것으로 나타났으며, carnosine 함량의 차이는 크지 않았다. 철 함량은 비가열처리구에 비해 48% 정도 낮았으나 가열처리구에 비해서는 다소 높은 함량을 나타내었다. 이는 이온교환 처리구의 경우 공정 중에 picric acid로 뱀장어 육단백질을 침전시키게 되는데 이로 인하여 철 함량에 비하여 단백질 함량이

Table 5. Composition of undried eel (*Anguilla japonica*) extracts which had been subjected to ion exchange chromatography (IEC) treatment

Composition	Contents ($\mu\text{g/mL}$)
Protein	$25.3 \pm 1.1^*$
Total Fe	4.8 ± 0.2
Carnosine	502.4 ± 1.1

*Data are expressed as means \pm standard deviation ($n=3$).

상대적으로 낮아진 것이 원인이라 생각된다. 따라서 철 함량을 더 감소시킬 수 있는 방법을 적용한다면 가열처리 추출방법에 비해 이온교환에 의한 추출방법이 carnosine의 함량은 높은 농도로 유지하면서 상대적으로 단백질 함량은 감소시킬 수 있는 효과적인 방법이 될 것으로 사료된다.

3) 분자량 조절에 따른 함량변화

분자량 조절에 따른 변화를 살펴보기 위하여 한외여과를 이용해 분자량을 조절한 동결 건조한 추출물의 단백질, 철, carnosine 함량을 측정하였다 (Table 6). 먼저 비가열처리의 경우 분자량 조절에 의해 약 52%의 단백질 함량 감소를 나타내었으며, 가열처리는 60, 80, 100°C 가열온도에 따라 각각 27%, 50%, 46%의 단백질 함량의 감소를 나타내었다. 철 함량의 변화는 가열처리의 경우 각각 14%, 22%, 23% 감소하였으며, carnosine 함량은 가열처리가 각각 23%, 17%, 20%의 함량 증가를 나타낸 반면 비가열처리는 오히려 35% 정도 함량이 감소되는 결과를 나타내었다.

Table 6. The effects of ultrafiltration on protein, total Fe and carnosine contents of eel (*Anguilla japonica*) extracts using different extraction methods

Treatments	Contents		
	Protein (mg/g)	Total Fe ($\mu\text{g/g}$)	Carnosine ($\mu\text{g/g}$)
Unheated	$127.3 \pm 9.2^{*a}$	ND	$12,288.5 \pm 428.4^a$
Unheated-UF	60.3 ± 6.9^b	ND	$7,950.3 \pm 310.3^c$
60°C	64.9 ± 7.6^b	153.7 ± 3.3^b	$9,306.7 \pm 100.7^b$
60°C-UF	47.2 ± 4.5^b	131.1 ± 1.9^c	$11,466.7 \pm 986.6^a$
80°C	53.1 ± 5.8^b	150.7 ± 1.5^b	$9,651.4 \pm 52.1^b$
80°C-UF	26.2 ± 3.1^d	116.3 ± 4.2^d	$11,316.7 \pm 500.8^a$
100°C	44.5 ± 1.8^c	127.1 ± 2.2^c	$9,683.3 \pm 57.7^b$
100°C-UF	23.9 ± 2.4^d	96.7 ± 6.1^e	$11,703.3 \pm 298.4^a$
IEC	24.6 ± 3.0^d	162.3 ± 1.6^a	$10,535.7 \pm 415.2^a$
IEC-UF	13.0 ± 3.1^e	91.8 ± 9.0^e	$11,153.3 \pm 215.7^a$

ND: not determined.

*Data are expressed as means \pm standard deviation ($n=3$).

IEC: represent the sample which had been extracted by ion exchange.

IEC-UF: represent the sample which had been extracted by ion exchange and permeate ultrafiltration.

이는 한외여과 시 단백질과 같은 고분자 물질들이 carnosine 과 같은 저분자 물질의 여과막 통과를 방해한 것이 원인이라 생각된다. Decker et al. (1993)은 가열처리 없이 한외여과처리만 하였을 경우 28% 정도의 carnosine 함량 감소가 있었다고 보고하였다.

이온교환 처리한 추출물을 한외여과법으로 분자량을 조절 하였을 때 나타난 함량변화에서 단백질 및 철 함량은 약 47%, 43% 정도 감소되었으며, carnosine 함량은 약 6% 정도 증가하였다. 100°C 가열처리에 비하여 단백질 및 철 함량은 각각 45%, 5% 정도 낮았으며, carnosine 함량은 비슷한 수준을 보였다.

4) 기기분석을 통한 추출방법의 비교

기기분석을 통한 추출방법들 간의 차이를 비교한 결과는 다음과 같다. 먼저 HPLC를 이용하여 각 추출 조건에 따른 변화를 Fig. 4와 5에 나타내었다. HPLC 분석 결과에서 carnosine 표준은 29분대에서 peak가 나타남을 확인할 수 있었다. 비가열처리의 경우 29분 영역에서 carnosine의 peak가 확인되었으나 다소 분자량이 큰 것으로 추정되는 peak들이 10-25분대 영역에서 나타났다. 60°C로 가열처리한 경우에는 10-25분대 사이에 존재하던 다수의 peak가 많이 사라졌는데 이는 단백질 잔여물의 감소에 의한 것으로 판단된다. 가열처리 후 한외여과법으로 분자량을 조절한 경우 10-25분대 사이에 존재하던 peak가 거의 제거되었으며, 특히 100°C 가열처리와 한외여과처리를 병행하였을 때 단백질 잔여물로 추정되는 물질의 제거 효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

이온교환 처리한 추출물에서는 가열처리와 한외여과 처리를 병행한 것 보다 단백질 잔여물 제거 효과가 더 높은 것으로 나타났으며, 이상의 결과에서 기존에 많이 사용되어지고 있는 carnosine 추출방법인 가열처리와 한외여과처리를 병행하는 방법보다는 이온교환처리와 한외여과 처리를 병행하는 방법이 산화촉진물질의 제거에 더 효과적인 방법이라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 이온교환처리와 한외여과처리를 병행하여 제조한 시료를 각종 실험에 사용하였다.

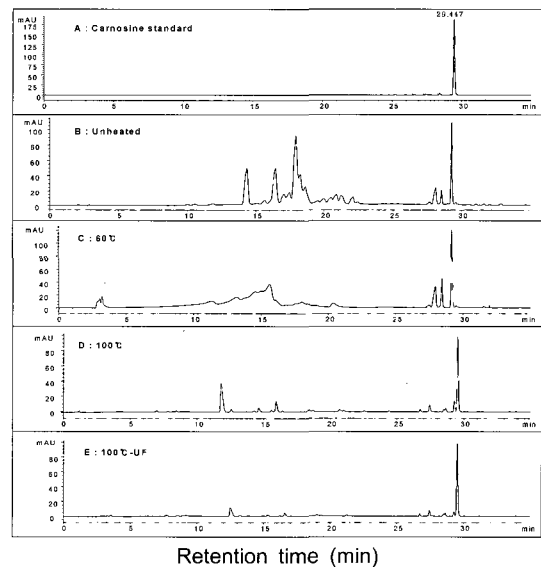


Fig. 4. HPLC chromatograms of carnosine standard and extracts of eel (*Anguilla japonica*).

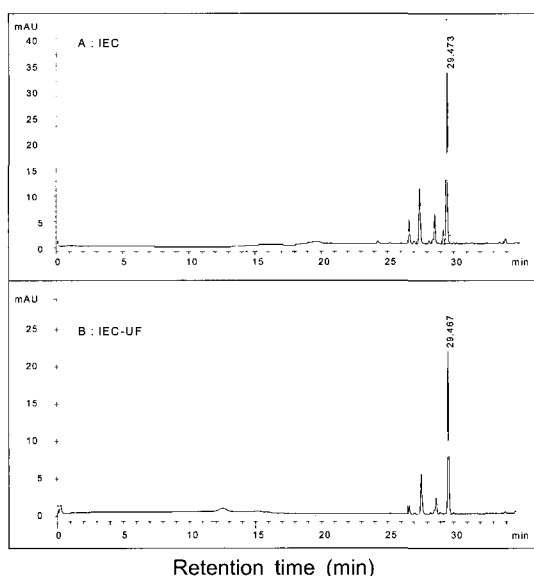


Fig. 5. HPLC chromatogram of eel (*Anguilla japonica*) extracts with ion-exchange chromatography and ultrafiltration.

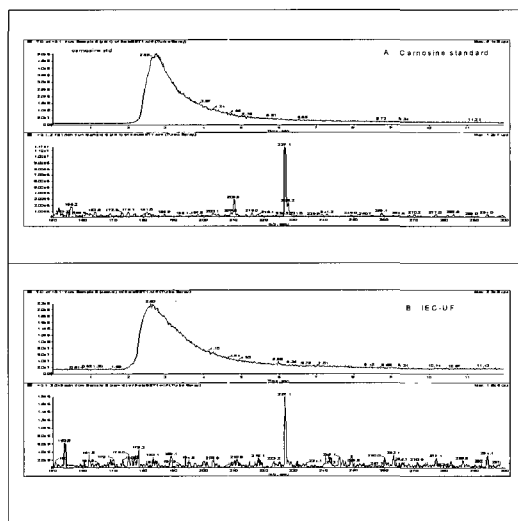


Fig. 6. LC/MS spectrum of carnosine standard and eel carnosine.

LC/MS를 이용하여 표준 carnosine과 본 연구에서 추출한 carnosine의 분자량을 확인한 결과 (Fig. 6) 두 시료 모두 동일한 분자량 (Mw 226)을 가진 물질임이 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 기존의 carnosine 추출 방법인 가열처리와 한외여과를 병행하는 방법보다 이온교환처리와 한외여과처리를 병행한 추출방법이 carnosine의 농도는 고농도로 유지 시키면서 상대적으로 산화촉진물질의 제거에 있어서는 더 효율적인 방법이라 판단된다.

사 사

본 연구는 부경대학교 2005년도 “기성회 학술연구비 지원

사업” 과제의 일부로 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 69-74.
- Block, G. and L. Langseth. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technol., 48, 80-85.
- Branen, A.L. 1975. Toxicological and anisole and butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS, 52, 59.
- Bucala, R., A. Cerami and H. Vlassara. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. Diabet. Rev., 3, 258-268.
- Burton, G.W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. J. Nutri., 119, 110-116.
- Bussayarat, M. and K.O. Intarapichet. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. Meat Sci., 71, 364-374.
- Casteels, P., C. Ampe and P. Tempst. 1989. Antibacterial peptides from honeybees. EMBOJ, 9, 2397-2391.
- Chan, K.M., E.A. Decker and W.J. Means. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. J. Food Sci., 58, 1-7.
- Chasovnikova, L.V., V.E. Formazyuk, V.I. Sergienko, A.A. Boldyrev and S.E. Severine, 1990. The antioxidative properties of carnosine and other deuge, Biochem. Int., 20, 1097-1103.
- Cornet, M. and J. Bousset. 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between ‘red’ and ‘white’ muscles. Meat Sci., 51, 215-219.
- Crush, K.G. 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. Comp. Biochem. Physiol., 34, 3-30.
- 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, 756-759.
- Decker, E.A. and A.D. Crum. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. Meat Sci., 34, 245-253.
- Djenane, D., L. Martinez, A.S. Escalante, J.A. Beltran and P. Roncales. 2004. Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. Food Chem., 85, 453-459.
- Frankel, E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. Food Chem., 57, 51.
- Gayiva, E., I. Kron, V. Pavlisak, M. Fedurco and B. Novakova. 1999. carnosine in patients with diabetes mellitus type I. Bratisl Lek Listy., 100, 500-502.

- Giese, J. 1996. Antioxidants : Tool for preventing lipid oxidation. *Food Technol.*, 50, 73.
- Gopalakrishnan, J., E.A. Decker and W.J. Means. 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Sci.*, 52, 101-110.
- Gulevitch, V.S. and S. Amiradgibi. 1900. Uber das carnosine, eine neuorganische base des fleisch-extraktes, *ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 33, 1902.
- Hwang, E.Y. 1999. Nutritional qualities of meat protein and biologically active peptides in hagfis, *Eptatretus burgeri*. Ph.D. Thesis, University of Pukyong National University, Pusan, Korea, 1-102.
- Hipkiss, A.R., C. Brownson and M.J. Carrier. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech. Age. Develop.*, 122, 1431-1445.
- 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. *Bioch. Biophys. 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, 1017-1024.
- Kim, S.K., H.C. Lee and Y.J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.*, 29, 246-255.
- Kim, S.K., Y.I. Choi and J.H. Choi. 2000. Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43, 225-227.
- Kohama, Y. 1988. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332-336.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969.
- Lee, B.J., Y.S. Lee, K.S. Kang, M.H. Cho and D.G. Hendricks. 1999. Carnosine and related compounds protect against copper-induced damage of biomolecules. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 32, 350-357.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- McManus, I.R. 1957. Some metabolic precursors of the N-1-methyl group of anserine in the rat. *J. Bio. Chem.*, 225, 325-334.
- Nakazato, M., J. Asai, M. Mitazato and H. Matsuo. 1990. Isolation and identification of islet amyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. Peptides*, 31, 179-186.
- Parker, C.J. Jr. 1966. Spectrophotometric Determination of Carnosine and anserine in muscle. *Anal. Chem.*, 38, 1359-1362.
- Partt, D.E. and B.J.F. Hudson. 1990. Natural antioxidant not exploited commercially. In: *Food Antioxidants*. Elsevier, 1-171.
- Seki, E., K. Osajima, T. Matsui and Y. Osajima. 1993. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Hogyo Gakkashi*, 40, 783-791.
- Stookey, L.L. 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, 42, 779-781.

2006년 9월 4일 접수
2006년 10월 30일 수리