

참치자숙액 추출물 중의 히스티딘계 저분자 펩타이드 및 산화촉진물질 함량에 미치는 추출방법의 영향

강옥주[†]

경남대학교 식품영양학과

Effects of Extraction Method on the Histidine Containing Low Molecular Weight Peptide and Pro-oxidants Contents of Tuna Boiled Extracts

Ok-ju Kang[†]

Department of Food and Nutritional Sciences Kyungnam University,
449 Wolyoung-dong, Masan, Kyungnam, 631-701 Korea

Abstract

In an effort to augment extractability of carnosine and anserine at the levels of pro-oxidants such as iron and protein in Tuna boiled extracts(*Skipjack*, *Yellowfin* and *Bigeye*), we assessed the effects of heated and ion exchange chromatography(IEC) and ultrafiltration(UF) using a MW 500 cut-off(500 MWCO). We also evaluated the antioxidant activity of these extracts processed as free radical scavengers and reducing agents. Tuna boiled extracts of dark and ordinary muscle protein and total iron were reduced, whereas carnosine and anserine concentrations and antioxidant activity were increased. The carnosine and anserine concentrations of the ion exchange and permeate UF(IEC-UF) extracts were higher than those observed in the heated and permeate UF(heat-UF), whereas the protein and total iron contents were lower than that observed in the heat-UF. The quantity of carnosine and anserine in ordinary muscle was higher than that detected in dark muscle. HPLC analysis and SDS-PAGE were shown to removes the effect of UF on high molecular weight impurities in the tuna boiled extracts. The major free amino acids(FFAs) from *Skipjack*, *Yellowfin* and *Bigeye* tuna IEC-UF extracts were anserine, histidine and carnosine. These three peptides constituted more than 80~85%. of the detected amino acid. The IEC-UF treated ordinary muscle extracts evidenced the highest levels of DPPH radical scavenging activity and the highest levels of reducing power among the various extracts. The IEC-UF extracts evidenced a DPPH radical scavenging effect equal to that of 1mM ascorbic acid.

Key words: anserine, carnosine, ion exchange chromatography, tuna boiled extracts, ultrafiltration

1. 서론

최근 다양한 수산가공물 소비의 증가로 인해 수산가공업에서 발생하는 부산물의 양은 다량으로 증가되고 있다. 이 중에서 자숙액은 주로 다랑어, 고등어, 새우, 오징어 및 멸치 등과 같은 통조림 및 건제품 가공공정에서 발생되며, 이들 대부분은 농축하여 폐기물로 처리되고 일부는 저가로 수출되거나 식품중간소재인 조미료로 이용되고 있는 실정이다. 다랑어 가공 공정 중 대부분은 자숙액, 내장, 두부, 껍질 등으로 부산물의 양이 더 많은 비중을 차

지하며 자숙액의 경우 아미노산이나 단백질 등과 같은 합질소 성분 외에도 기능성 지질성분도 다량 함유하고 있어 기능성 식품의 소재로서의 활용 가능성이 대단히 높은 것으로 알려져 있다.

최근 천연 저분자 펩타이드는 관능성, 영양, 표면활성, 항산화적의 측면에서 연구가 이루어지고 있으며, 이 중 carnosine이나 anserine과 같은 히스티딘계 저분자 펩타이드는 항산화능, 자유라디칼과 금속이온 소거능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 이들 저분자 펩타이드는 다른 항산화제와 달리 활성산소제거 뿐만 아니라 성인병 및 노화억제에 깊이 관련하고 있는 것으로 보고 되고 있으며. 특히 참치에 다량 함유되어 있는 것으로 조사되어 있다 (Kim WS 2003).

기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구에 있어서 Gopala-

[†]Corresponding author: Ok-Ju Kang, 449, Wolyoung-Dong Masan, Kyungnam, 631-701, Korea
Tel: 055-249-2235
Fax: 055-244-6504
E-mail: koj117@kyungnam.ac.kr

krishnan J 등(1999)에 의해 돼지골격근 추출물에 함유된 기능성 저분자 펩타이드의 검색에 대한 연구는 이루어진 바 있으나, 수산물 중 어류를 이용한 기능성 펩타이드 추출 또는 관련 제품을 개발한 사례는 아직 보고되지 않고 있다. Hipkiss AR 등(2001)에 의해 항산화성 저분자 펩타이드의 노화 억제능에 대해서는 보고되어 있으나 이러한 물질의 추출 및 정제에 대해서는 부족한 상태이며, 주로 축 육을 대상으로 Yeargans GS와 Seidler NW(2003)에 의해서 기능성 저분자 펩타이드의 추출에 관한 연구가 진행되어 있을 뿐 수산물을 이용한 추출은 아직 세계적으로도 미미한 실정이다.

골격근에 많은 양으로 존재하고 있는 천연 디펩타이드인 carnosine과 anserine은 *in vitro*에서 철, hemoglobin과 singlet oxygen에 의해 촉매 되는 지방산화를 억제시킬 수 있다는 것이 발견되었다(Decker EA와 Faraji H 1990). 철과 heme 함유 수용성 근육추출물에는 carnosine이 일정량 존재하고 있고, 비단백질에 결합된 철 즉, 저분자량의 철은 superoxide anion, $H_2O_2 \cdot OH$ 을 만들 수 있고, 이것이 지방산화를 촉진시킬 수 있다고 하였다(Kanner JS 등 1991, Chan KM 등 1993, Decker EA와 Crum AD 1993). Heme 함유 화합물과 methemoglobin은 *in vitro*와 생체막에서 지방산화의 활성 촉매제이고 골격근으로부터 효과적인 천연항산화제를 얻기 위해서는 carnosine과 anserine의 농도는 높이 유지하면서 산화촉진제의 함량은 낮출 수 있는 기술이 필요 하다고 보고하였다(Maikhunthod B와 Intarapichet KO 2005). Decker EA와 Crum AD(1993)은 가열처리 및 한외여과처리를 통해 어느 정도 유리철과 철단백질과 같은 산화촉진제의 함량을 감소시킬 수 있다고 보고하였으나 좀 더 효과적인 추출방법의 개선이 필요하다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 carnosine과 anserine의 함량은 유지하면서 산화촉진제의 함량은 낮출 수 있는 효율적인 방법을 검토하고자 수산가공 부산물인 참치 자숙액으로부터 가열처리 및 이온교환법과 한외여과장치를 통한 분자량 조절 방법으로 추출하여 이에 따른 carnosine과 anserine 및 산화촉진제의 함량을 비교 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 실험에 사용한 참치육은 (주)서영티엔비로부터 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*), 황다랑어(*Thunnus albacares*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*)를 제공받아 히스티딘계 저분자 펩타이드의 추출용 시료로 사용하였고 자숙액은 혈합육과 보통육으로 나누어서 20 Brix로 농축한 후 $-20^{\circ}C$ 의 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였다. Anserine과 carnosine, Iron stock standard, p-bromoaniline, ferrozine, DOWEX

2×8-400 Chloride, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, ascorbic acid 등은 sigma chemical(St. Louis. USA)에서 구입하였으며 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 히스티딘계 저분자 펩타이드의 추출

(1) 가열추출

Chan KM 등(1993)의 방법에 따라 자숙액 시료 중량의 2배의 탈 이온수를 가한 다음 homogenizer(12,000 rpm, 2 min, 4 times)로 균질화한 후 $4^{\circ}C$, $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리 시켜 상등액을 취한 후 Whatman No. 4 필터를 이용하여 여과하였다. 이를 다시 $80^{\circ}C$ 에서 10분간 가열처리 후 다시 $8,000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 후 Whatman No. 4 필터로 여과하였다(Fig. 1).

(2) 이온교환 처리

William HS와 Stanford M(1954)와 McManus IR(1957)의 방법을 변형하여 시료 중량의 2배의 1% picric acid를 가하여 blender에서 2분간 2회 마쇄한 후 homogenizer(12,000 rpm, 2 min, 4 times)로 균질화하여 $4^{\circ}C$, $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리 시켜 침전물을 제거한 후 상층액을 DOWEX 2×8-400 Chloride column(2.5×30 cm)을 이용하여 불용성 염과 picric acid 잔여물을 제거하였다(Fig. 2).

(3) 한외여과 장치를 이용한 분자량 조절

Maikhunthod B와 Intarapichet KO(2005)의 방법을 변형하여 추출물의 분자량을 조절하였으며, 한외여과 장치는 stirred cell(Amicon Co., Ltd, USA)을 이용하였다. 즉, 저

Tuna boiling extracts (Skipjack, Yellowfin and Bigeye tuna)

2 part of $4^{\circ}C$ deionized water

Homogenize (12,000rpm, 2 min, 4 times)

Heated ($80^{\circ}C$, 10min)

Cooled in icebath

Centrifuge ($10000 \times g$, 20 min, $4^{\circ}C$)

Supernatant

Filtered through Whatman #4

Filtered through $0.45 \mu m$ filter

Filtrate

Fig. 1. Procedure for extraction of histidine containing low molecular weight peptide by heat treatment($80^{\circ}C$, 10 min).

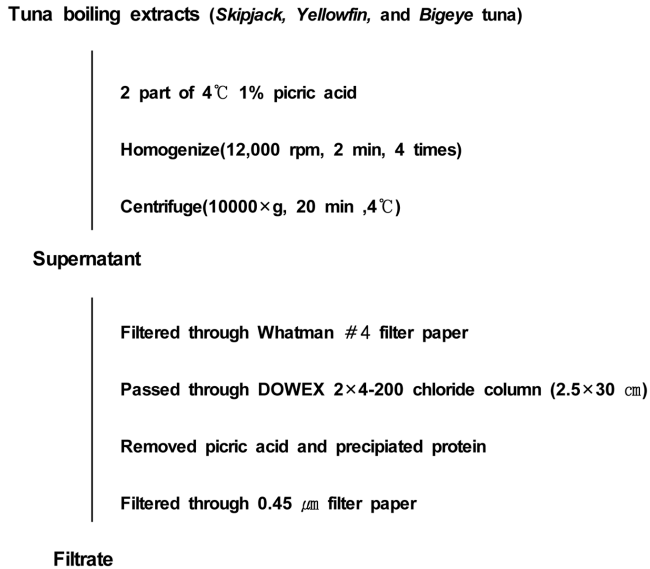


Fig. 2. Procedure for extraction of histidine containing low molecular weight peptide by ion exchange chromatography.

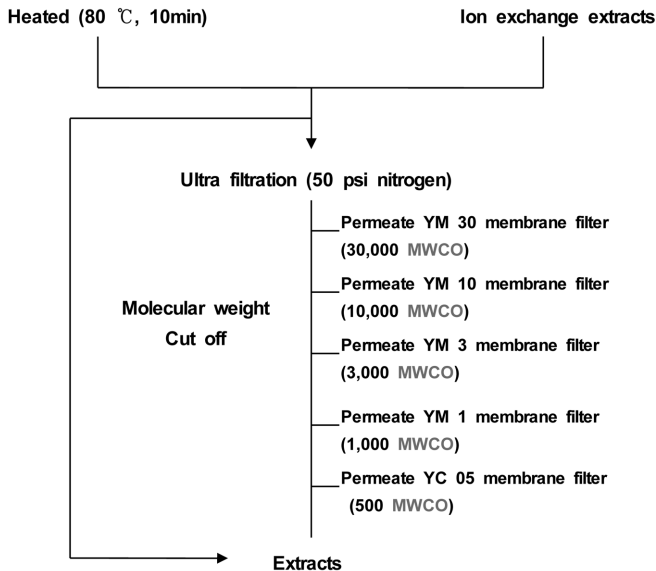


Fig. 3. Procedure for molecular weight cut off of tuna heat and ion exchange extracts.

분자 펩타이드인 carnosine과 anserine의 분리를 위해 가열 처리 및 이온교환 처리한 시료를 membrane filter(YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)를 이용하여 분자량을 최종 500 MWCO(500 molecular weight cut off)이하까지 조절하였다 (Fig. 3).

2) 히스티딘계 저분자 펩타이드 및 총철 함량의 측정

(1) 단백질 함량 측정

추출조건에 따른 단백질 함량의 변화를 살펴보기 위해 Lowry OH 등(1951)의 방법에 의거하여 측정하였으며, 표

준물질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 추출 조건에 따른 단백질의 함량변화를 살펴보았다.

(2) 총철 함량 측정

Stokey LL(1970)의 방법에 따라 추출물 1 mL에 0.2 mL의 sulfuric acid를 가하여 용해시키고 0.4 mL의 30% hydrogen peroxide를 첨가하여 110°C에서 2시간 동안 결합된 iron을 해리시키고 즉시 냉각시킨 후 1 mL의 10% hydroxylamine hydrochloride를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 1 mL의 ammonium acetate buffer를 첨가하여 pH 6.0으로 조절한 뒤, 0.5 mL의 9 mM ferrozine solution을 첨가한 후 암소에서 5분간 방치 후에 562 nm에서 측정하였으며, Iron stock solution을 이용하여 검량식을 작성하여 함량을 비교하였다.

(3) Carnosine 함량 측정

Parker JR(1966)의 방법에 따라 추출물 1 mL에 0.04 M EDTA 시약 1 mL와 20% Na₂CO₃와 diazotized p-bromoaniline 2 mL와 95% EtOH 2 mL을 차례로 반응 시킨 후 5분간 방치 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며 carnosine 표준을 이용하여 검량식을 작성 후 계산하였다.

(4) Anserine 함량 측정

Parker JR(1966)의 방법에 따라 1 mL의 추출물에 0.8 mL의 4.0% NaHCO₃와 0.2 mL의 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (FDNB) solution 0.2 mL를 가한 뒤 혼합하여 55°C, 30분간 가열 한 뒤, 0.1 mL의 10 N NaOH를 가하여 반응하지 않은 FDNB를 2,4-dinitrophenol로 변환시켜 1.0 mL의 20% HCl을 가한 후 2 mL의 ether를 혼합하여 1분간 반응한 후 430 nm에서 흡광도를 측정하였으며 anserine표준의 검량식을 이용하여 계산한 값에서 carnosine의 함량을 빼어 anserine의 함량으로 계산하였다.

3) 추출물의 정제도 확인

(1) SDS-PAGE

추출 방법에 따른 고분자 물질의 제거를 확인하기 위해 SDS 전기영동을 행하였다. 전기영동은 Mini-Protein 3(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 사용하여 Laemmli UK(1970) 방법에 따라 행하였다. 20% polyacrylamide gel을 사용하였으며 시료를 각각 10 μL씩 각 well에 주입하고 25 mM Tris-192 mM glycine 완충용액(pH 8.3)을 전극액으로 사용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 SDS-gel의 염색은 Com-massie brilliant blue R-250을 사용하였고, 염색이 끝난 gel은 빙초산/메탄올/증류수 혼합액(v/v/v, 1 : 2 : 7)으로 탈색하였다.

(2) HPLC 분석

Hector G 등(1995)의 방법에 따라 추출물 25 μL에 탈이

온수 25 μ L를 가한 후 50 μ L NaHCO₃ buffer(100 mM, pH 8.3)와 200 μ L의 Dabsyl-Cl 용액(4 mM)을 첨가하고 이용액을 70~72°C에서 15분간 반응시킨 다음 700 μ L의 Na₂HPO₄ buffer(50 mM; pH 7.0)를 첨가한 후 0.22 μ m membrane filter로 여과시켜 HPLC분석용 시료로 사용하였다. HPLC(Hewlett-Packard 1100 series, USA)의 column은 C-18(5 μ m; 4.6 mm \times 20 cm)을 사용하였다. 이동상 용액은 sodium acetate buffer(25 mM; pH 6.5)와 acetonitrile을 사용하였고 유속은 1 mL/min, column 온도는 40°C 검출 파장은 436 nm에서 분석하였다.

(3) 유리아미노산 함량 측정

유리아미노산은 Spackman 등(1958)의 방법을 수정하여 시료 5 g에 75% ethanol 50 mL를 가하여 75°C에서 60분간 환류 추출하였다. 잔사는 다시 75% ethanol 250 mL로 2회 반복 추출하여 40°C에서 감압농축한 후 0.2 M lithium citrate buffer(pH 2.2)로 용해시켜 50 mL로 정용하였으며 0.22 μ m의 syringe filter로 여과하여 아미노산 자동 분석기(Hitachi L-8900, Rigong INC., Japan)로 분석하였다.

4) 항산화능 및 환원력

(1) DPPH 라디칼 소거능

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 제거 능력은 Shimada K 등(1992)의 방법에 따라 측정하였다. 공시험구는 탈 이온수를 사용하여 행하였다. 시료 2 mL에 각각 95% Ethanol 에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 첨가한 후 교반 한 후 실온에서 30분간 방치하여 자외선 분광계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거 능력을 측정하였으며 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\frac{\text{Blank absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Blank absorbance}} \times 100(\%)$$

(2) 환원력 측정

환원력은 Oyaizu M(1988)의 방법에 따라서 측정하였다. 대조구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 시료 2 mL에 phosphate buffer(0.2 M, pH 6.6) 2 mL와 2 mL의 1% potassium ferricyanide를 첨가한 후 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후 2 mL의 10% trichloroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가한 후 반응물 2 mL에 증류수 2 mL와 0.4 mL의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가한 후 10분 후에 자외선분광계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 가열처리에 따른 함량변화

Gopalakrishnan J 등(1999)에 의하면 돈육 추출물을 60~80°C로 가열처리시 디펩타이드의 농도와 항산화능이 80°C로 가열처리 한 경우 가장 높게 나타났으며, Maikhunthod B와 Intarapichet KO(2005)에 의하면 닭 가슴살 추출물을 60, 80, 100°C로 가열처리 시 60°C에 비해 80, 100°C가 더 높은 디펩타이드의 농도를 나타내었으며, 80°C와 100°C를 비교하였을 경우 디펩타이드의 농도와 항산화능 모두 유의한 차이를 나타내지 않는다고 하였다. 또한 산화촉진제로 작용할 수 있는 단백질과 총철의 함량은 온도가 증가함에 따라서 감소한다고 하였다. 이에 80°C로 가열처리에 따른 자숙액 추출물 중에 함유된 단백질, 철, carnosine, anserine의 함량변화를 측정하였다.

자숙액을 혈합육과 보통육으로 나누어 가열처리하였을 경우 단백질 함량은 비가열처리 구에 비해 가다랑어는 43%, 61%(Table 1), 황다랑어 49%, 51%(Table 2), 눈다랑어 47%, 69%(Table 3)로 각각 감소되었으며, 총철 함량은 가다랑어 87%, 84%, 황다랑어 84%, 83%, 눈다랑어 90%, 85% 감소된 것으로 조사되었다. 이러한 단백질 함량의 감소는 가열 처리를 통해 단백질의 열변성이 야기되고 변성이 일어난 단백질은 상대적으로 구상단백질의 응집현상에 의해서 용해성이 감소하게 되며 원심분리를 통해서 변성 단백질을 침전시킴으로써 효율적으로 단백질의 함량을 감소

Table 1. Composition of *Skipjack* tuna boiled extracts which had been subjected to several treatment

| <i>Skipjack</i> tuna | Contents | | | | |
|----------------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------|
| | Protein (mg/mL) | Total iron (μg/mL) | Carnosine (mg/mL) | Anserine (mg/mL) | |
| Raw material | 24.38±0.43 | 3.09±0.08 | 0.52±0.01 | 4.53±0.05 | |
| Heating | 13.81±0.21 | 0.40±0.02 | 0.80±0.01 | 4.25±0.25 | |
| Dark | IEC | 8.20±0.19 | 0.23±0.03 | 0.90±0.06 | 4.35±0.16 |
| Heat-UF | 6.79±0.20 | 0.30±0.01 | 1.57±0.05 | 6.79±0.07 | |
| IEC-UF | 5.97±0.09 | 0.18±0.02 | 1.92±0.05 | 7.21±0.08 | |
| Raw material | 33.02±0.57 | 2.80±0.08 | 0.65±0.01 | 5.38±0.60 | |
| Heating | 12.71±0.74 | 0.43±0.07 | 0.74±0.03 | 5.48±0.31 | |
| Ordinary | IEC | 14.26±0.22 | 0.17±0.04 | 0.78±0.03 | 5.96±0.34 |
| Heat-UF | 9.28±0.35 | 0.23±0.08 | 1.54±0.04 | 7.63±0.12 | |
| IEC-UF | 8.93±0.02 | 0.08±0.03 | 1.62±0.03 | 9.66±0.09 | |

Data are expressed as mean \pm standard deviation(n=3)

Heating: represent the sample which had been extracted by heated 80°C, 10 min

IEC: represent the sample which had been extracted by Dowex 2 \times 8 ion exchange

Heat-UF: represent the sample which had been extracted by heated 80°C, 10 min and permeate ultrafiltration

IEC-UF: represent the sample which had been extracted by Dowex 2 \times 8 ion exchange and permeate ultrafiltration

Table 2. Composition of *Yellowfin* tuna boiled extracts which had been subjected to several treatment

| <i>Yellowfin</i> tuna | Contents | | | |
|-----------------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|
| | Prorein (mg/mL) | Total iron (µg/mL) | Carnosine (mg/mL) | Anserine (mg/mL) |
| Raw material | 28.32±1.07 | 3.26±0.11 | 0.43±0.02 | 4.60±0.69 |
| Heating | 14.56±0.17 | 0.49±0.07 | 0.60±0.01 | 4.61±0.08 |
| Dark IEC | 8.49±0.28 | 0.25±0.05 | 0.62±0.02 | 4.41±0.25 |
| Heat-UF | 6.24±0.02 | 0.33±0.10 | 0.75±0.04 | 6.02±0.06 |
| IEC-UF | 4.88±0.11 | 0.15±0.02 | 0.85±0.02 | 6.28±0.04 |
| Raw material | 30.59±1.09 | 3.04±0.28 | 0.63±0.02 | 4.70±0.73 |
| Heating | 14.91±0.28 | 0.51±0.08 | 0.88±0.01 | 3.36±0.11 |
| Ordinary IEC | 8.31±0.33 | 0.18±0.04 | 0.91±0.02 | 4.55±0.22 |
| Heat-UF | 7.46±0.29 | 0.17±0.12 | 1.58±0.02 | 7.10±0.07 |
| IEC-UF | 5.76±0.20 | 0.10±0.02 | 1.60±0.02 | 7.20±0.05 |

Data are expressed as mean ± standard deviation(n = 3)

Table 3. Composition of *Bigeye* tuna boiled extracts which had been subjected to several treatment

| <i>Bigeye</i> tuna | Contents | | | |
|--------------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|
| | Prorein (mg/mL) | Total iron (µg/mL) | Carnosine (mg/mL) | Anserine (mg/mL) |
| Raw material | 32.71±1.14 | 3.24±0.41 | 0.23±0.01 | 3.42±0.65 |
| Heating | 17.39±0.62 | 0.32±0.03 | 0.47±0.01 | 2.12±0.10 |
| Dark IEC | 10.90±0.66 | 0.16±0.03 | 0.49±0.02 | 3.53±0.08 |
| Heat-UF | 5.05±0.04 | 0.24±0.03 | 0.55±0.10 | 5.59±0.07 |
| IEC-UF | 4.97±0.62 | 0.12±0.02 | 0.57±0.01 | 5.78±0.05 |
| Raw material | 37.63±0.25 | 2.76±0.19 | 0.24±0.01 | 5.22±0.18 |
| Heating | 11.44±0.20 | 0.39±0.01 | 0.47±0.02 | 3.54±0.06 |
| Ordinary IEC | 11.40±0.22 | 0.31±0.19 | 0.44±0.02 | 4.48±0.03 |
| Heat-UF | 5.71±0.24 | 0.24±0.01 | 0.56±0.01 | 7.48±0.05 |
| IEC-UF | 4.89±0.11 | 0.19±0.03 | 0.53±0.03 | 7.88±0.02 |

Data are expressed as mean ± standard deviation(n = 3)

시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 단백질을 침전을 통해 산화축진제로 작용할 수 있는 철단백질 및 유리 철 또한 감소되는 것으로 알려져 있다(Maikhunthod B 와 Intarapichet KO 2005). 이에 반해 상대적으로 carnosine의 함량은 약간 증가함이 나타났으며 anserine 함량은 비가열 처리구와 비교시 약간의 감소가 나타난 것으로 나타났다. Decker EA와 Crum AD(1993), Chan KM 등(1993), Kanner JS 등(1991)의 보고에 의하면 가열처리를 통해 단백질 및 철 함량을 감소시킬 수 있으나, 온도변화에 따른 디펩타이드의 함량 변화는 크지 않았다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

2. 이온교환처리에 따른 함량변화

이온교환처리에 따른 자숙액의 혈합육과 보통육의 단백질 함량은 원액에 비해 가다랑어는 66%, 57%, 황다랑어

70%, 73%, 눈다랑어 67%, 70%로 각각 감소되었으며, 철 함량은 가다랑어 93%, 94%, 황다랑어 92%, 94%, 눈다랑어 93%, 89% 감소된 것으로 조사되었다. Carnosine 함량의 차이는 크지 않았으며, anserine의 함량은 약간의 감소가 나타났다. 철 함량은 가열 처리구에 비해 더 낮은 함량을 나타내었다. 이는 이온교환 처리구의 경우 공정 중에 picric acid로 단백질을 침전시키게 되는데 이로 인하여 단백질 함량이 상대적으로 낮아져 고분자 철 화합물과, 저분자 철 화합물의 농도가 상대적으로 낮아진 것이 원인이라 생각된다. 따라서 철 함량을 더 감소시킬 수 있는 방법을 적용한다면 기존에 사용되고 있는 가열처리 추출방법에 비해 이온교환에 의한 추출방법이 carnosine과 anserine의 함량은 높은 농도로 유지하면서 상대적으로 산화축진제로 작용할 수 있는 단백질 함량은 감소시킬 수 있는 효과적인 방법이 될 것으로 사료된다.

3. 한외여과처리에 따른 함량변화

분자량 조절에 따른 변화를 살펴보기 위하여 한외여과 장치를 이용하여 분자량을 조절한 추출물의 단백질, 철, carnosine, anserine의 함량을 측정하였다. 한외여과 처리에 따른 자숙액의 혈합육과 보통육의 단백질 함량은 원액에 비해 가열처리와 한외여과를 병행한 경우 가다랑어는 72%, 72%, 황다랑어 70%, 73%, 눈다랑어 85%, 84%로 각각 감소되었으며, 철 함량은 가다랑어 90%, 92%, 황다랑어 90%, 94%, 눈다랑어 92%, 91% 감소된 것으로 조사되었다. Carnosine 함량은 가열처리와 한외여과를 병행한 경우 모두 약간의 증가를 나타내었으며 anserine의 함량은 각각 가다랑어는 33%, 29%, 황다랑어 23%, 33%, 눈다랑어 38%, 30% 정도 증가되는 결과를 나타내었다. Decker EA와 Crum AD(1993)은 가열처리 없이 한외여과 처리만 하였을 경우 28% 정도의 디펩타이드의 함량 감소가 있었다고 보고하였다.

이온교환 처리와 한외여과를 병행하였을 때 나타난 함량변화에서 단백질 함량은 각각 가다랑어는 75%, 73%, 황다랑어는 82%, 81%, 눈다랑어 84%, 87% 정도 감소되었으며, 철 함량은 각각 가다랑어는 94%, 97%, 황다랑어는 95%, 97%, 눈다랑어 96%, 93% 정도 감소되었으며 carnosine 함량은 가열처리와 한외여과처리를 병행한 경우에 비해 각각 가다랑어는 6%, 2%, 황다랑어는 7%, 1%, 눈다랑어 2%, 3% 정도 약간 증가되었으며, anserine의 함량은 가열처리와 한외여과 처리한 경우에 비해 각각 가다랑어는 4%, 15%, 황다랑어는 3%, 1%, 눈다랑어 2%, 3% 정도 증가되었다.

4. 추출물의 정제도 확인

1) SDS 전기영동

SDS전기영동을 통하여 각 추출 조건에 따른 고분자 단

백질의 정제를 확인하였다(Fig. 4, 5, 6). 가다랑어, 황다랑어, 눈다랑어 자숙액 모두 비가열처리 구에서는 겔 상단의 진한 색의 고분자 물질의 밴드를 확인할 수 있었으며, 가열처리와 이온교환을 각각 한 경우 다소 상단의 고분

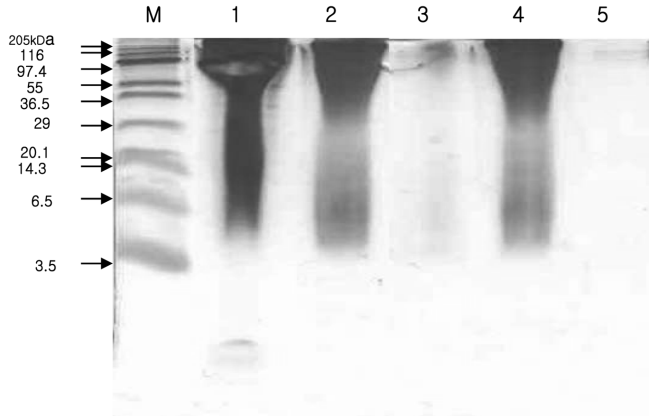


Fig. 4. Identification of *Skipjack* tuna boiled extract refinement for SDS-PAGE.

- M : Protein marker
- 1 : *Skipjack* tuna boiled extract raw material
- 2 : *Skipjack* tuna boiled extract treated by heating at 80°C, 10 minutes
- 3 : *Skipjack* tuna boiled extract treated by at 80°C, 10 minutes, and permeate ultrafiltration
- 4 : *Skipjack* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange
- 5 : *Skipjack* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

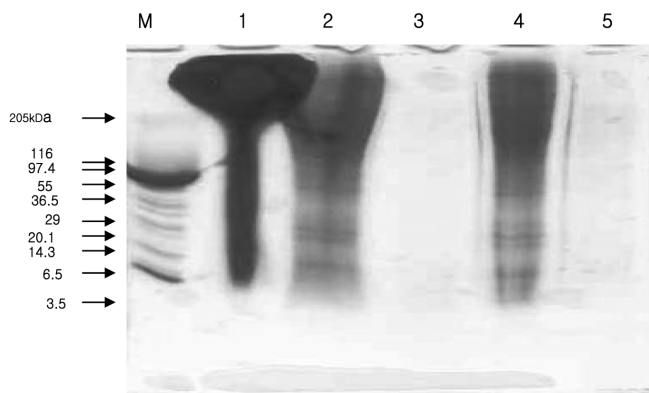


Fig. 5. Identification of *Yellowfin* tuna boiled extract refinement for SDS-PAGE.

- M : Protein marker
- 1 : *Yellowfin* tuna boiled extract raw material
- 2 : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by heating at 80°C, 10 minutes
- 3 : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by at 80°C, 10 minutes, and permeate ultrafiltration
- 4 : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange
- 5 : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

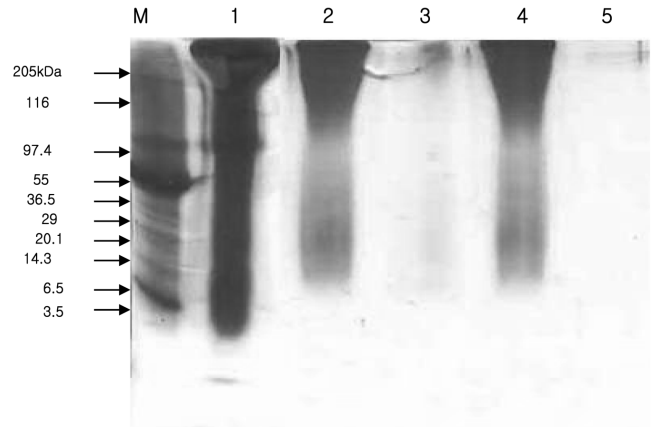


Fig. 6. Identification of *Bigeye* tuna boiled extract refinement for SDS-PAGE.

- M : Protein marker
- 1 : *Bigeye* tuna boiled extract raw material
- 2 : *Bigeye* tuna boiled extract treated by heating at 80°C, 10 minutes
- 3 : *Bigeye* tuna boiled extract treated by at 80°C, 10 minutes, and permeate ultrafiltration
- 4 : *Bigeye* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange
- 5 : *Bigeye* tuna boiled extract treated by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

자 물질이 제거된 열은 밴드를 확인할 수 있었다. 가열처리와 한외여과를 병행한 경우(3 lane)와 이온교환과 한외여과를 병행한 경우(5 lane)에서는 모두 3.5 kDa 이상의 밴드가 나타나지 않았으며, 이는 한외여과를 통하여 분자량을 500 Da 이하로 조절하였기 때문에 전기영동 상에서 밴드가 나타나지 않은 결과를 나타내었다.

2) HPLC분석

HPLC를 이용하여 혈합육에 비하여 단백질과 철 화합물의 함량은 낮고, carnosine과 anserine의 함량이 상대적으로 높은 자숙액 보통육의 추출 조건에 따른 변화를 Fig. 7, 8, 9에 나타내었다. HPLC 분석 결과에서 anserine과 carnosine 표품은 5분과 6분대에서 peak가 나타남을 확인할 수 있었다. 자숙액 원액의 경우 5분과 6분 영역에서 anserine과 carnosine의 peak가 확인되었으나 다소 분자량이 큰 것으로 추정되는 peak들이 7~12분대 영역에서 나타났다. 가열처리와 한외여과를 병행한 경우에는 7~12분대 사이에 존재하던 다수의 peak가 많이 사라졌는데 이는 단백질 잔여물의 감소에 의한 것으로 판단된다. 이온교환 후 한외여과법으로 분자량을 조절한 경우 7-12분대 사이에 존재하던 peak가 거의 제거되었다. 이상의 결과에서 기존에 많이 사용되어지고 있는 carnosine과 anserine의 추출 방법인 가열처리와 한외여과처리를 병행하는 방법보다는 이온교환처리와 한외여과 처리를 병행하는 방법이 산화촉진물질의 제거에 더 효과적인 방법이라 사료된다.

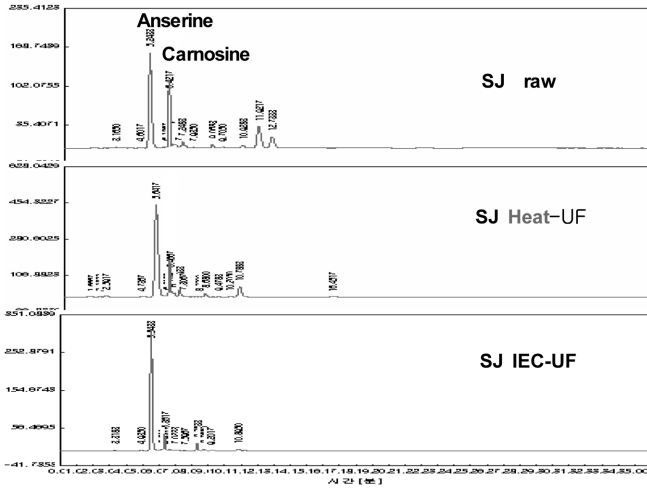


Fig. 7. HPLC chromatogram of *Skipjack* tuna boiled extract.
 SJ raw : *Skipjack* tuna boiled extract
 SJ heat-UF : *Skipjack* tuna boiled extract treated by heated(80°C, 10 min) and permeate ultrafiltration
 SJ IEC-UF : *Skipjack* tuna boiled extract treated by Dowex 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

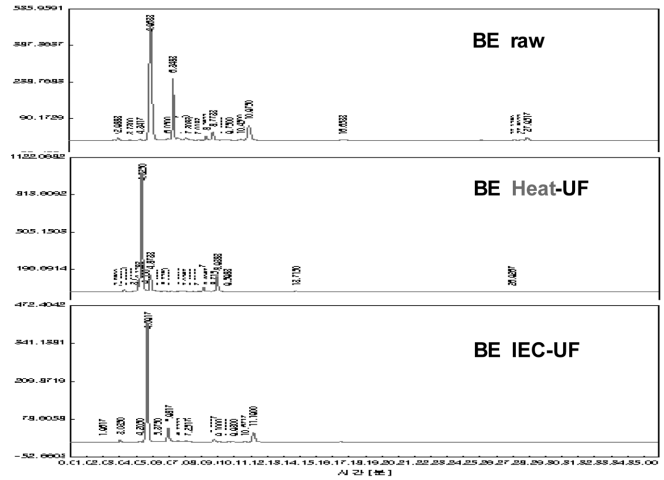


Fig. 9. HPLC chromatogram of *Bigeye* tuna boiled extract.
 BE raw : *Bigeye* tuna boiled extract
 BE heat-UF : *Bigeye* tuna boiled extract treated by heated(80°C, 10 min) and permeate ultrafiltration
 BE IEC-UF : *Bigeye* tuna boiled extract treated by Dowex 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

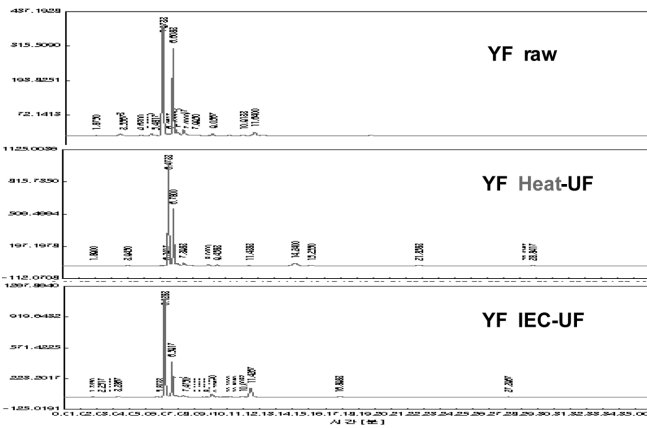


Fig. 8. HPLC chromatogram of *Yellowfin* tuna boiled extract.
 YF raw : *Yellowfin* tuna boiled extract
 YF heat-UF : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by heated(80°C, 10 min) and permeate ultrafiltration
 YF IEC-UF : *Yellowfin* tuna boiled extract treated by Dowex 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration

3) 유리 아미노산 분석

자숙액 원액과 이온교환과 한외여과를 병행한 추출물을 아미노산 분석기를 이용하여 분석하였다(Table 4). 자숙액 원액에 비하여 이온교환과 한외여과를 병행한 경우 모두 히스티딘계 저분자 펩타이드의 함량이 증가하였다. 이온교환과 한외여과처리를 병행한 가다랑어의 경우 anserine이 전체 유리아미노산 조성의 약 50%를 나타내었다. carnosine 약 12%, histidine 약 19%로 나타났으며, 황다랑어의 경우 anserine 약 42%, carnosin 약 10%, histidine 약 28%로 나타났으며, 눈다랑어의 경우 anserine이 약 56%, carnosine 약 1%, histidine 약 21%로 세 가지의 유리아미노산이 전

체의 80~85% 가량을 차지하는 것으로 나타났다. 이온교환 한외여과구의 가다랑어와 황다랑어는 carnosine을 다량 함유하는 반면에 눈다랑어는 carnosine함량은 적고 anserine을 대부분으로 함유하는 것으로 나타났다. 이 외에도 taurine과 alanine, glycine 등의 아미노산을 주 구성으로 함유하고 있었다. Choi YJ 등(1996)의하면 참치의 경우 histidine이 anserine의 약 2배 정도로 함유하고 있다고 보고하였으나 자숙액을 이용하여 이온교환과 한외여과를 병행한 결과 anserine이 histidine 함량보다 2배 이상 높아진 것을 나타냈다. Oh KS 등(1987)에 의한 가다랑어 자숙액을 염산으로 가수분해 시킨 추출물과 유사한 결과를 나타내었으며, 함량을 비교 하였을 때, carnosine과 anserine 모두 2배 이상의 함량을 나타내었다.

Table 4. Comparison of histidine containing low molecular peptide in the *Skipjack*, *Yellowfin* and *Bigeye* tuna boiled extracts and treated by IEC-UF (mg/100g)

| | <i>Skipjack</i> | | <i>Yellowfin</i> | | <i>Bigeye</i> | |
|-----------|-----------------|--------|------------------|--------|---------------|--------|
| | Raw | IEC-UF | Raw | IEC-UF | Raw | IEC-UF |
| Anserine | 153.77 | 796.94 | 149.91 | 517.24 | 168.36 | 744.96 |
| Carnosine | 43.40 | 195.46 | 12.63 | 127.64 | 4.92 | 16.14 |
| Histidine | 66.40 | 321.25 | 96.42 | 340.36 | 64.83 | 287.09 |

5. 히스티딘계 저분자 펩타이드의 항산화능 평가

1) DPPH 라디칼 제거능

천연항산화제로써의 효능을 살펴보기 위해 DPPH 라디칼의 소거능을 실험하여 Table 5에 나타내었다. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 이용하여 라디칼 소거능을 살펴

Table 5. Scavenging effect* of Tuna boiled extracts on 0.2 mM DPPH radical (%)

| Treatment | Skipjack | | Yellowfin | | Bigeye | |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Dark | Ordinary | Dark | Ordinary | Dark | Ordinary |
| Heating | 16.18±0.63 | 38.56±4.66 | 13.09±3.12 | 10.96±2.78 | 34.41±0.15 | 11.95±0.88 |
| IEC | 31.05±1.30 | 42.82±0.58 | 17.40±0.97 | 37.57±2.33 | 41.10±1.94 | 46.00±2.76 |
| Heat-UF | 49.67±0.84 | 42.97±0.18 | 43.02±2.59 | 45.10±2.81 | 50.30±0.32 | 54.06±2.18 |
| IEC-UF | 51.97±1.68 | 61.61±0.98 | 40.85±0.92 | 51.54±1.40 | 51.21±0.83 | 52.50±1.45 |

*Absorbance at 517nm.

Data expressed as mean ± standard deviation(n=3)

The scavenging effect of 1mM ascorbic acid and 1mM BHT are 57.95% and 74.71% respectively

Table 6. Reducing power* of Tuna boiled extracts

| Treatment | Skipjack | | Yellowfin | | Bigeye | |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Dark | Ordinary | Dark | Ordinary | Dark | Ordinary |
| Heating | 0.456±0.029 | 0.504±0.009 | 0.538±0.009 | 0.607±0.017 | 0.570±0.017 | 0.616±0.109 |
| IEC | 0.517±0.010 | 0.532±0.012 | 0.522±0.012 | 0.482±0.007 | 0.550±0.016 | 0.657±0.012 |
| Heat-UF | 0.575±0.030 | 0.569±0.003 | 0.496±0.010 | 0.615±1.167 | 0.604±0.017 | 0.720±0.028 |
| IEC-UF | 0.561±0.006 | 0.622±0.012 | 0.608±0.019 | 0.633±0.007 | 0.631±0.012 | 0.733±0.026 |

*Absorbance at 700nm.

Data expressed as mean ± standard deviation(n=3)

The Reducing power of 1mM ascorbic acid and 1mM BHT are 1.165 and 1.275 respectively

본 결과 가열처리를 한 시험구에서 보다 이온교환처리를 한 경우가 모두 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며, 혈합육에 비해 보통육에서 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. 가열처리와 한외여과를 병행한 구과 이온교환과 한외여과를 병행한 구에서 모두 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. 항산화제로 알려진 ascorbic acid의 1 mM 농도와 비슷한 라디칼 소거능을 나타내었으며 합성 항산화제로 알려진 BHT의 1 mM 농도보다 약간 낮은 소거능을 나타냈다. 이상의 결과를 살펴볼 때 수산가공부산물인 자숙액에서 추출한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화능은 실험결과 상당히 우수한 것으로 사료되어지며 미 이용 폐자원을 이용한 고부가가치의 기능성 물질 추출의 원료로써의 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어진다.

2) 환원력 측정

참치 자숙액의 보통육과 혈합육을 이용하여 환원력을 비교한 결과를 Table 6에 나타내었다. 가열처리와 이온교환을 단독으로 한 경우 보다 한외여과를 병행한 시험구에서 높은 환원력을 나타내었으며, 혈합육에 비해 보통육에서 높은 값을 나타내었다. Wu HC 등(2002)에 의하면 환원력은 anserine과 carnosine, histidine이 깊이 관여하며, 농도가 증가할수록 증가한다고 하였으며, 가열처리와 한외여과를 병행한 것 보다 이온교환과 한외여과를 병행한 경우가 이러한 히스티딘계 디펩타이드의 함량이 높아 환원력의 결과가 높게 나타났다는 것을 나타낸다. 또한 이러한 자숙액 유래 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 경우 매우 강력한 수용성 성질을 가지고 있기 때문에 기능성 음료로써의 개발도 유용할 것으로 사료되어 진다.

IV. 요약 및 결론

참치 자숙액으로 부터 히스티딘계 저분자 펩타이드를 분리하고, 고부가가치의 기능성 식품소재로의 이용가능성을 타진할 목적으로 추출방법에 따른 함량의 변화와 이용가능성을 조사하였다. 참치 중에서 주로 이용되는 가다랑어와 황다랑어, 눈다랑어를 혈합육과 보통육의 자숙액으로 나누어 조사한 결과 보통육이 혈합육에 비해서 높은 함량을 나타내었다. 가열처리와 이온교환 처리를 비교한 결과 이온교환 처리를 한 경우가 단백질과 철 화합물의 함량은 낮은 반면 디펩티드의 함량은 높게 나타났으며, 한외여과를 병행하였을 경우 단백질과 철 화합물은 더욱 감소하는 반면 디펩티드의 함량은 증가하는 것을 나타냈다. SDS 전기영동을 실시한 결과 비가열처리구의 고분자 물질의 밴드가 한외여과를 거치면서 사라졌으며, 3.5 kDa 이상의 단백질이 없음을 확인 할 수 있었다. HPLC를 이용하여 측정된 가열처리와 이온교환모두 한외여과 처리를 한 경우 원 시료에 비해서 7~12분대에 나타나던 다수의 peak가 제거되거나 상쇄되는 결과를 나타내었는데 이는 본 실험에서 기능성 저분자 펩타이드의 회수를 위해 사용한 한외여과 처리가 분리정제에 있어서 효율적인 방법으로 사료되어 진다. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 이용하여 라디칼 소거능을 살펴본 결과 가열처리를 한 시험구에서 보다 이온교환처리를 한 경우가 모두 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며, 혈합육에 비해 보통육에서 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. 가열처리와 한외여과를 병행한 구과 이온교환과 한외여과를 병행한 구에서 모두 높은 라디칼 소거능을 나타냈다.

환원력을 비교한 결과 가열처리와 이온교환을 단독으로 한 경우 보다 한외여과를 병행한 시험구에서 높은 환원력을 나타내었으며, 혈합육에 비해 보통육에서 높은 값을 나타내었다.

V. 감사의 글

본 연구는 2008학년도 경남대학교 학술연구장려금에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Chan KM, Decker EA, Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* 58(1) : 1-7

Choi YJ, Kim IS, Lee KW, Kim GB, Lee NG, Cho YJ. 1996. Available components of cooking drips, dark muscle, head and raw viscera from *skipjack*. *J Korean Fish. Soc.* 29(5): 701-708

Decker EA, Crum AD. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Science* 34(7):245-253

Decker EA, Faraji H. 1990. Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *J Am. Oil. Chem Soc* 6(10):650-652

Gopalakrishnan J, Decker EA, Means WJ. 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Science* 52(1):101-110

Hector G, Nelson B, Gladys PR. 1995. Improved rapid method for the isolation, purification and identification of collagen glycosides. *J chromatography* 732(2):385-389

Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Age Develop* 122(1):1431-1445

Intarapichet OK, Maikhunthod B. 2005. Genotype and gender difference in carnosine extracts and antioxidant activities of chicken breast and thigh meats. *Meat Science* 71(4):634-642

Kanner J, Harel S, Jaffe R. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J Agric Food Chem* 39(4):1017-1024

Kim WS. 2003. Antioxidant activity and safety evaluation of carnosine, anserine and homocarnosine isolated from spent hen. Doctorate thesis. The Duksung women's university of Korea. pp 16-22

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-686

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biological Chemistry* 193(2):265-275

Maikhunthod B, Intarapichet KO. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Sci* 71(2):364-374

McManus IR. 1957. Some metabolic precursors of the N-1-methyl group of anserine in the rat. *J Biological Chemistry* 225(1): 325-334

Oh KS, Lee EH, Kim MC, Lee KH. 1987. Antioxidative activities of *skipjack* meat extract. *Bull Korean Fish Soc* 20(5):441-446

Oyaizu M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35(1): 771-775

Parker JR. 1966. Spectrophotometric Determination of Carnosine and Anserine in Muscle. *Anal Chem* 38(10):1359-1362

Spackman DH, Stein WH, Moore S. 1958. Automatic recoding apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* 30(1):1190-1206

Stookey LL. 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 42(7):779-781

Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chemistry* 40(1): 945-948

William HS, Stanford M. 1954. The free amino acid of human blood plasma. *J Biological Chemistry* 206(1):915-926

Wu HC, Shiau CY, Chen HM, Chiou TK. 2002. Antioxidant activity of carnosine anserine some free amino acids and their combination. *J Food Drug analysis* 11(2):148-153

Yeagans GS, Seidler NW. 2003. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *Biochem. and Biophysic. Research Communica* 300(1):75-80

2008년 1월 31일 접수; 2008년 5월 28일 심사(수정); 2008년 5월 28일 채택