KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 50(6), 684-693, 2017

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 50(6),684-693,2017

다랑어(*Thunnus*) 추출물 중의 Histidine 함유 저분자 펩타이드 및 산화촉진물질 함량에 미치는 추출방법의 영향

김홍길 · 송호수[1]*

부산식품의약품안전청, [1]영산대학교 서양조리학과

Effects of Extraction Methods on Histidine-containing Low-molecular Weight Peptides and Pro-oxidants Contents in Tuna *Thunnus* Extracts

Hong-Kil Kim and Ho-Su Song[1]*

Busan Regional Office of Food and Drug Safety, Busan 47366, Korea
[1]Department of Western Cuisine & Culinary Arts, Youngsan University, Busan 48015, Korea

We investigated methods for extracting histidine-containing low-molecular-weight (LMW) peptides such as anserine, carnosine and histidine from the edible meat of tuna byproducts. Extracts were treated by several methods including heat treatment (80℃, 10 min), DOWEX ion exchange (IEC), ultrafiltration (UF), and carboxymethyl (CM)-cellulose column chromatography (IEC+CMC); then the levels of protein, total iron, histidine, carnosine, and anserine were measured. Extracts treated with IEC+CMC using CM-cellulose were analyzed for total iron, protein, histidine, and anserine content, which were 6.27±0.26 mg/mL, 5.20±0.21 μg/mL, 0.80 mg/mL, 0.208 mg/mL, and 4.40 mg/mL, respectively, in yellowfin tuna; and 9.05±0.82 mg/mL, 4.06±0.20 μg /mL, 1.62 mg/mL, 0.012 mg/mL, and 7.28 mg/mL in bigeye tuna. By comparison in IEC-UF treated extracts, protein, total iron, and histidine content decreased by 43%, 73%, and 27% in yellowfin and 0.4%, 54%, and 23% in bigeye tuna, wheres carnosine and anserine content increased by 22% and 17%, respectively. Freeze-dried (FD) extracts exhibited similar trends as non-dried extracts, i.e., dipeptide content increased with purification steps, whereas pro-oxidant (total iron and protein) content decreased. IEC+CMC treated FD extracts had the highest anserine, content, and the greatest reductuion in pro-oxidants.

Key words: Tuna *Thunnus*, Histidine, Dipeptide, Protein purification, Ion exchange chromatography

서 론

Histidine 함유 저분자 peptide의 추출에 있어 수용성 근육 추출물에는 철과 헴을 함유한 dipeptide가 일정량 존재하고 있으며, 비단백질과 결합된 철, 즉 저분자량의 철은 superoxide anion, H_2O_2·OH을 만들 수 있고, 이것이 지방산화를 촉진시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Decker, 1990; Kanner et al., 1991; Chan, 1993; Stefanie et al., 2010). 효과적인 천연항산화제를 얻기 위해서는 dipeptide의 농도는 높이 유지하면서 산화촉진물로 작용할 수 있는 저분자량의 철 화합물이나 단백질의 함량은 낮출 수 있는 기술의 개발이 필요 하다고 보고하였다(Chan et al., 1993; Bussayarat, 2005).

어류의 근육에는 고농도의 유리 histidine과 이에 유래된 dipeptide를 포함하며(Crush, 1970), 그 중 가장 많은 것은 carnosine과 anserine이다(Koizumi et al., 1983; Abe, 1991; Abe, 2000; Wu, et al., 2003). Carnosine은 β-alanine과 L-histidine, anserine은 β-alanine과 π-methyl-histidine이 peptide 결합을 이루고 있는 dipeptide 화합물이며, carnosine의 methylation을 유도한 methyl-carnosine이 anserine이다(Shinichi et al., 2014). 이러한 화합물들은 그 구조가 유사한 것 이외에도 유사한 생리 활성을 나타낸다. 기능성 저분자 peptide에 대한 연구에 있어서 돼지 골격근 추출물에 함유된 기능성 저분자 peptide의 검색에 대한 연구(Gopalakrishnan,1999), 닭 가슴살에서 CBEX™ (Chicken Breast Extract) carnosine과 anserine 함유 추출물의 안정성 평가에 관한 연구는 이루어 진 바 있으며(Sato et al., 2007), 수산 가공부산물인 가다랑어 자숙액을 대

https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0684

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

Korean J Fish Aquat Sci 50(6) **684-693,** December **2017**

Received 24 July 2017; **Revised** 31 August 2017; **Accepted** 24 October 2017

***Corresponding author:** Tel: +82. 51. 540. 7142 Fax: +82. 51. 540. 7137

E-mail address: hssong@ysu.ac.kr

상으로 histidine 함유 저분자 펩타이드의 추출가능성에 대한 보고는 있지만(Cheong, 2007), 수산어류를 대상으로 효율적인 기능성 peptide 추출과 관련 제품을 개발한 사례는 아직 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 histidine 함유 저분자 peptide인 anserine과 carnosine의 함량은 유지하면서 산화촉진물로 작용할 수 있는 고분자량의 단백질이나 철 화합물의 함량은 감소시킬 수 있는 효과적인 추출방법을 검토하고자 잔 뼈 등이 많아 비 가식 부위로 분류되는 황다랑어와 눈다랑어 가슴살로 부터 가열처리 및 이온교환법과 한외여과방법을 이용한 분자량 조절 방법으로 추출한 후, histidine 함유 저분자 화합물 함량 및 산화촉진물질의 함량을 비교하고, 미 이용 수산가공 부산물의 고부가가치의 기능성 식품소재로써의 이용가능성 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 연구에 사용한 눈다랑어(*Thunnus obesus*)와 황다랑어(*Thunnus albacares*) 육은 ㈜서영티엔비에서 제공받아 histidine 함유 저분자 peptide의 분리정제용 시료로 사용하였다. 다랑어 육은 갈비살 부위로 10 kg 단위로 포장하여 -80℃의 심온에 저장하면서 사용하였다. Anserine과 carnosine, L-histidine, Iron stock standard, p-bromoaniline, ferrozine, DOWEX 2×8-400 Chloride 등은 Sigma chemical Co. (St. Louis. MO, USA)에서 구입하였고 그 외 모든 시약은 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

시료 전처리

Histidine 함유 저분자 peptide 추출을 위해 동결상태의 다랑어 육을 일정시간 냉수에 해동 시켜 외부의 젤라틴 성분을 제거한 후 뼈와 혈액을 제거하여 histidine 함유 저분자 peptide의 추출용 시료로 사용하였다.

일반성분 분석

일반성분 정량은 AOAC방법에 따라 수분함량은 105℃ 상압건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl법, 조지방 함량은 Soxhlet법, 조회분은 직접회화법으로 정량하였다

유리아미노산 분석

유리아미노산 함량은 Song et al. (2006)의 방법에 따라 육 10g에 5-sulfosalicylic acid 1 g을 첨가하여 제단백 시킨 후 원심분리 (3,000 *g*, 20분, 4℃)하였다. 상층액을 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 lithium citrate buffer (pH 2.2)로 희석하여 분석용 시료로 사용 하였다. 이온교환방법을 이용한 추출물은 액상 상태의 추출물을 취해 0.02 N HCl로 희석시켜 아미노산 자동 분석기 (Hitachi Amino Acid Analyzer L-8900, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

Histidine계 저분자 peptide의 추출

가열 추출

다랑어의 가열추출 처리는 Chan et al. (1993)의 방법에 따라 육 중량대비 2배의 탈이온수를(4℃) 가해 grinder (51BL30, Warning Co, USA)에서 2분간 2회 마쇄한 후 homogenizer (PH-91, Ultrasonic, Japan)로 균질화(10,000 *g*, 2분, 4회)하여 원심분리(8,000 *g*, 20분, 4℃)시켜 침전물을 제거한 후 이를 다시 80℃에서 10분간 가열처리 후 원심 분리(8,000 *g*, 10분, 4℃)하여 침전물을 제거한 후 Whatman No. 5A 필터(Whatman, London, England)로 여과 한 후 0.45 μm 필터로 재 여과하였다(Fig. 1).

이온교환 처리

이온교환 처리는 William and Stanford (1954)와 McManus (1959)의 방법에 따라 육 일정량에 2배 분량의 1% picric acid를 가하여 grinder에서 2분간 2회 마쇄한 후 homogenizer (12,000 *g*, 2분, 4회)로 균질화하여 원심분리 (10,000 *g*, 20분, 4℃)시켜 산 침전물을 제거한 후 상층 액을 DOWEX 2×8-400 (Sigma, St. Louis. USA) Chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 불용성 염과 picric acid 잔여물을 제거하였다 (Fig. 1).

한외여과 처리

각각 가열처리한 추출물과 이온교환 처리한 추출물의 분자량 조절은 한외여과 장치 stirred cell ultrafiltration (Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 이용하였다(Maikhunthod and Intarapichet, 2005). 가열 처리 및 이온교환 처리한 시료를 한외여과막 (YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)을 이용하여 분자량을 최종 500 MWCO (molecular weight cut off)이하까지 조절 하였다(Fig. 1).

CM-cellulose 크로마토그래피

한외여과장치를 이용하여 분자량을 조절한 추출액을 대상으로 철과 헴을 포함한 화합물을 제거하기 위해 CM-cellulose column (2.5×30 cm) ion chromatography를 행하였다(Chan et al., 1993). 컬럼 용적 10배의 pH 3.5 sodium phosphate buffer (1 mM)로 미리 평형된 컬럼에 추출물을 통과시킨 후 sodium phosphate buffer (pH 8.5, 10 mM)를 이용하여 2 mL/min의 유속으로 칼럼으로부터 녹여서 용출시켜 활성을 띄는 분획을 모아 TLC (thin layer chromatography)로 확인 후 분석용 시료로 사용하였다(Fig. 2).

단백질 함량 측정

각 추출조건에 따른 단백질의 함량 측정은 Anita et al. (2009)의 방법에 의거하여 biuret법으로 측정하였다. 추출물 1 mL에 biuret 시약 4 mL를 혼합하여 암소에 30분간 방치시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였으며 검량식을 작성한 후 각 추출물에

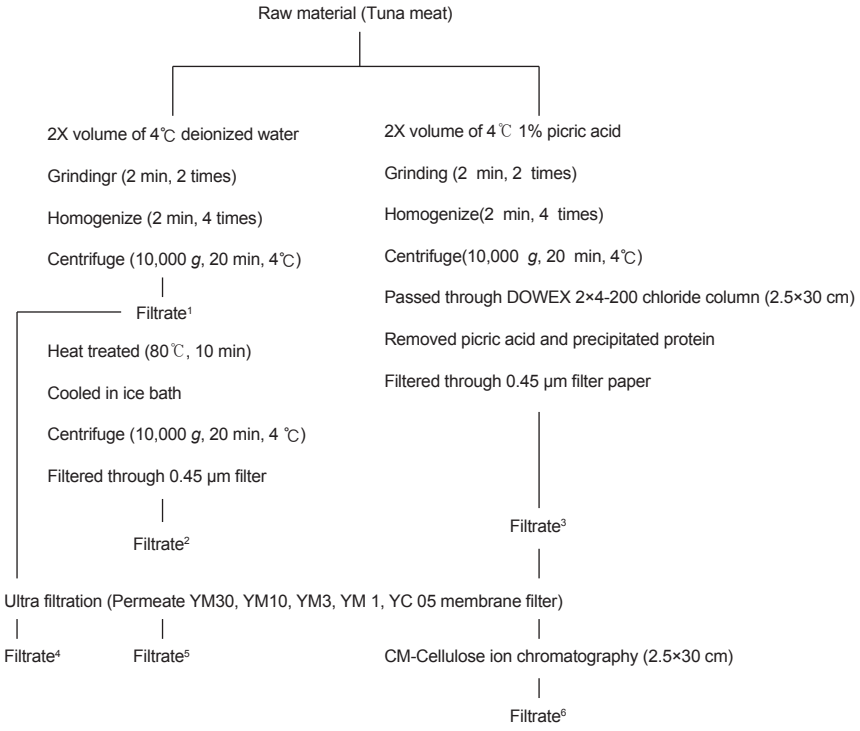

Fig. 1. Procedure for extraction of histidine containing low molecular weight peptide. [1]Filtrate, water extract (Raw); [2]Filtrate, heat extract (80℃); [3]Filtrate, ion exchange extract (IEC); [4]Filtrate, water extract permeated ultrafiltration (Raw-UF); [5]Filtrate, heat extract permeated ultrafiltration (80℃-UF); [6]Filtrate, ion exchange treated ultrafiltration and CM -Cellulose chromatography (IEC+CMC).

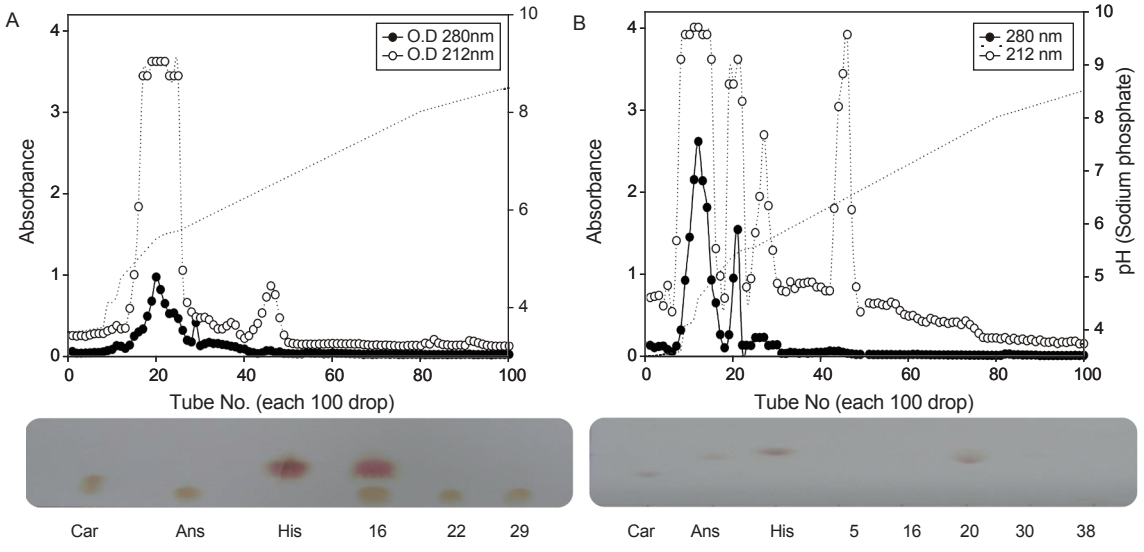

Fig. 2. Elution profile of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* IEC-UF on CM-cellulose column chromatography and activated fraction of TLC. A, Yellowfin tuna elution profile on IEC+CMC and activated fraction of TLC; B, Bigeye tuna elution profile on IEC+CMC and activated fraction of TLC. IEC-UF, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration ; TLC, thin layer chromatography; IEC+CMC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration and CMC ion exchange; Car, carnosine standard; Ans, anserine standard; His, histidine standard.

따른 단백질 함량 변화를 측정하였다.

총철 함량 측정

총철 함량의 측정은 Stookey (1970)의 방법에 따라 추출물 3 mL에 10 mM ferrozine 용액 300 μL를 첨가하고 환원시약 (2 mol HCl에 hydroxylamine hydrochloride를 1.4 mol의 농도로 제조) 450 μL를 가하여 교반 후 10분간 반응시켰다. 그리고 10 M ammonium acetate buffer (pH 9.5) 150 μL 첨가 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량식에 대입함으로서 각 추출물의 총철 함량을 측정하였다.

Histidine 함유 dipeptide 함량 측정

추출방법 및 분자량 조절에 따른 histidine 함유 저분자 peptide인 carnosine, anserine, histidine 성분의 함량변화를 알아보기 위해 아미노산 자동 분석기(Hitachi L-8900, Rigong INC., Japan)를 사용하여 생체분석법으로 분석하였다.

TLC 분석

추출 방법에 따른 단백질 물질의 정제도 확인을 위해 1차적으로 Thin layer chromatography (TLC)를 이용하여 추출물을 동정하였다. silica gel을 흡착제로 사용하였으며, n-Butanol: Acetic acid:Water (v/v/v, 4:2:1)의 혼합액을 제조하여 전개용매로 사용하였다. TLC 판을 9.5×20 cm으로 자른 뒤 밑에서 2-3 cm 되는 지점에 연필로 줄을 긋고, 점을 찍은 후 sample을 spot하여 TLC판을 전개조에 넣어 전개 하였다. 전개 후 풍건하여 전개 용매를 날려 보낸 후 1% ninhydrin을 발색제로 하여 dry oven에서 건조 후 Rf (retention factor)값을 구하였다.

HPLC 분석

각 추출조건에 따른 histidine 함유 저분자 peptide의 정성 분석 및 기타 단백질 잔여물의 변화를 살펴보기 위해 Hector et al. (1995)의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 분석하였다. 추출물 25 μL에 탈이온수 25 μL를 가한 후 50 μL $NaHCO_3$ buffer (100 mM, pH 8.3)와 200 μL의 Dabsyl-Cl 용액(4 mM)을 첨가하고 70-72℃에서 15분간 반응시킨 다음 700 μL의 Na_2HPO_4 buffer (50 mM; pH 7.0)를 첨가한 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 액을 HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, CA, USA)에 10 μL를 주입하였으며 column은 Capcell Pak C_{18} (5 μm; 4.6 mm×150 cm, Shiseido)을 사용하였다. 이동상 용매는 sodium acetate buffer (25 mM; pH 6.5)와 acetonitrile을 사용하였고 유속은 1 mL/min, column 온도는 40℃ 검출파장은 436 nm에서 분석하였다.

LC/MS를 이용한 질량 분석

최종 정제한 추출물의 질량분석은 LC/MS (API 2000, Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였다. 이동상은 Water/ACN/MeOH=35/30/35 (4 mM AF, pH 2.6)를 사용하였고, 컬럼은 Symmetry (150×3.9 mm, 5 μm, 1 mL/min)를 이용하였다.

통계 처리

실험결과의 통계처리는 one way ANOVA로 검사한 후 Duncan's multiple test로 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다. 연구 결과의 통계 처리는 SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

다랑어육의 성분 조성

황다랑어 및 눈다랑어 갈비살의 일반성분을 분석한 결과 황다랑어 및 눈다랑어의 수분함량은 각각 71.82±0.32%, 75.51±0.11%이며, 단백질은 26.06±0.04%, 23.34±0.11%로 황다랑어 갈비살의 함량이 약간 높게 나타났다. 또한, 다랑어 가슴살의 유리아미노산 함량을 분석한 결과, anserine이 황다랑어와 눈다랑어 모두 57.42%와 57.77%로 가장 많은 함량을 나타내었으며, Histidine은 24.98%와 28.93%로 높은 함량을 나타내었다.

Table 1. Protein, total iron, histidine, carnosine and anserine contents of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* extracts which had been subjected to heat and ion exchange treatment

Undried extracts		Contents				
		Protein (mg/mL)	Total iron (μg/mL)	Histidine (mg/mL)	Carnosine (mg/mL)	Anserine (mg/mL)
Yellowfin Tuna	Raw	76.19±5.39[a]	67.37±6.37[a]	4.93	0.353	5.21
	80℃	52.03±3.93[b]	16.71±1.02[d]	4.89	0.352	4.91
	IEC	25.51±0.36[c]	13.52±1.48[e]	2.00	0.158	4.94
Bigeye Tuna	Raw	79.25±4.83[a]	60.36±5.31[b]	4.23	0.092	7.80
	80℃	53.73±0.23[b]	17.29±1.40[c]	3.48	0.077	6.72
	IEC	23.89±0.43[c]	15.94±0.68[d]	3.23	0.110	6.90

Raw, represent the sample which had been extracted by water; 80℃, represent the sample which had been extracted by heated 80℃, 10min; IEC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange. Data are expressed as mean±SD (n=3).

Carnosine은 2.11%와 1.56%로 다소 낮은 편이지만 기타 아미노산에 비해 높은 함량을 나타내내어 histidine 함유 저분자 dipeptide의 추출용 시료로서 적합하다고 판단되며, 그 외에도 면역조절활성과 심혈관계질환에 관여한다고 알려진 alanine과 glycine, taurine, lysine 등의 순으로 함유되어져 있는 것으로 나타났다(결과 미제시). 이러한 결과는 가다랑어류의 유리아미노산 함량을 측정한 결과와 비슷한 결과를 나타내었다(Oh et al., 1987; Choi et al., 1996; Song et al., 2006).

추출방법에 따른 함량 변화

가열처리

Histidine 함유 저분자 dipeptide 추출 시 단백질 및 철과 같은 잔여물 제거에 많이 사용되고 있는 가열처리방법과 이온교환 처리방법에 따른 함량변화를 나타낸 결과는 Table 1과 같다. Histidine 함유 저분자 dipeptide 추출과 관련된 연구 결과를 살펴보면 돈육 추출물을 60-80℃로 가열 처리시 histidine 함유 저분자 dipeptide의 농도와 항산화능이 80℃로 가열처리 한 경우 가장 높게 나타났으며(Gopalakrishnan et al., 1999), 닭 가슴살 추출물을 60, 80, 100℃로 가열처리 시 60℃에 비해 80, 100℃가 더 높은 Histidine 함유 저분자 dipeptide의 농도를 나타내었으며(Maikhunthod and Intarapichet, 2005), 80℃와 100℃를 비교하였을 경우 Histidine 함유 저분자 dipeptide의 농도와 항산화능 모두 유의한 차이를 나타내지 않는다고 하였다. 이에 80℃로 가열처리한 경우 황다랑어와 눈다랑어의 단백질 함량은 원료육에 비해 각각 32%, 30%가 감소되었으며 철 함량은 각각 75%, 74% 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 단백질 함량의 감소는 가열 처리를 통해 단백질의 열변성이 야기되고 변성이 일어난 단백질은 구상단백질의 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 철 단백질 및 유리 철 또한 감소되는 것으로 알려져 있다(Bussayarat, 2005).

이온교환 처리

이온교환법을 이용한 추출물 중의 단백질 및 총철, 그리고 histidine 함유 저분자 dipeptide의 함량을 조사한 결과 이온교환 처리구의 경우 황다랑어와 눈다랑어의 단백질 함량은 원료육에 비해 67%, 68%의 감소를 나타내었으며 철 함량은 79%, 76%의 감소를 나타내어 가열처리구에 비해 높은 감소율을 나타내었다. 이온교환 처리구의 경우 공정 중 강산인 picric acid를 이용하여 단백질을 침전시키고 불용성 침전물을 제거시키게 되는데 이로 인해 단백질 함량이 가열처리방법에 비해 상대적으로 낮아짐에 따라 고분자 및 저분자량의 철 화합물 등의 농도가 상대적으로 낮아진 것이 원인이라 사료된다. 또한 가열처리와 이온교환처리에 따른 histidine, carnosine, anserine의 함량 변화를 살펴보면 원료육에 비해 가열처리구와 이온교환 처리구 모두 약간의 감소가 있었으나 이온교환 처리구의 경우 가열처리구에 비해 carnosine, anserine의 함량은 비슷한 반면에

Table 2. The effect of ultrafiltration on pro-oxidants and histidine containing dipeptides contents of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* extracts with different treatments

Undried extracts		Contents				
		Protein (mg/mL)	Total iron (μg/mL)	Histidine (mg/mL)	Carnosine (mg/mL)	Anserine (mg/mL)
Yellowfin tuna	Raw-3000	26.51±1.05^{b}	28.56±1.37^{a}	4.75	0.330	4.95
	Raw-500	16.90±1.11^{d}	18.62±1.20^{b}	3.95	0.276	4.15
	80℃-3000	23.69±0.92^{c}	15.30±0.36^{cd}	4.36	0.311	4.26
	80℃-500	15.37±0.74^{d}	10.52±0.51^{fg}	2.82	0.062	3.56
	IEC-3000	13.01±0.35^{e}	11.92±0.40^{e}	1.75	0.151	4.68
	IEC-500	10.93±0.30^{f}	9.48±0.27^{gh}	1.09	0.170	3.75
Bigeye tuna	Raw-3000	34.17±2.06^{a}	29.02±1.45^{a}	4.10	0.086	7.78
	Raw-500	16.90±1.11^{d}	18.97±1.53^{b}	3.89	0.090	7.04
	80℃-3000	24.04±0.33^{c}	19.15±0.52^{c}	3.10	0.088	6.52
	80℃-500	15.40±1.93^{d}	10.95±0.71^{ef}	2.84	0.112	5.32
	IEC-3000	13.27±0.33^{e}	14.29±0.52^{d}	2.40	0.086	6.73
	IEC-500	9.09±0.13^{f}	8.87±1.25^{h}	2.10	0.077	5.53

Raw-3000, represent the sample which had been permeate ultrafiltration (3,000 MWCO); Raw-500, represent the sample which had been permeate ultrafiltration (500 MWCO); 80℃-UF, represent the sample which had been extracted by heated 80℃, 10min and permeate ultrafiltration; IEC-UF, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration. Data are expressed as mean±SD (n=3).

histidine의 감소가 더욱 큰 것으로 조사되었다(Table 1).

한외여과 처리

각 추출물의 분자량 조절에 따른 변화를 살펴보기 위해 원료육과 가열처리, 이온교환 처리를 한 추출물을 한외여과를 이용하여 3,000, 500 MWCO (YM3, YC05) 까지 각각 분자량을 조절하여 추출물 중에 함유된 단백질, 철, histidine, carnosine, anserine의 함량변화를 측정하였다(Table 2). 단백질 함량은 한외여과시(3,000, 500 MWCO), 원료육에 비해 각각 황다랑어 65%, 77% 눈다랑어 57%, 78% 감소하였고 가열처리와 한외여과를 병행한 경우, 황다랑어 69%, 80%, 눈다랑어 70%, 80% 감소하였다. 또한 이온교환과 한외여과를 병행한 경우에는 황다랑어가 83%, 86%, 눈다랑어가 83%, 89% 가량 감소하였다. 철 함량의 변화는 원료육에 비해 각각 황다랑어 57%, 72%로 눈다랑어 52%, 69% 감소하였으며, 가열처리와 한외여과를 병행한 경우, 황다랑어 77%, 87%, 눈다랑어 68%, 81% 감소하였고, 이온교환과 한외여과를 병행한 경우에는 황다랑어 75%, 86%, 눈다랑어 76%, 85% 가량 감소하였다.

Histidine의 함량의 변화는 가열처리 없이 한외여과방법만으로 처리한 경우 특이적인 변화가 없는 반면에 가열처리와 한외여과(500 MWCO)를 병행한 경우에는 황다랑어, 눈다랑어 각각 43%, 33% 감소하였고, 이온교환과 한외여과를 병행한 경우에는 78%와 50%로 감소하였다. 또한, carnosine은 anserine과 histidine의 함량에 비해 상대적으로 낮게 나타났으며, 원료육에 비해 한외여과방법과 가열처리방법, 이온교환법을 병행하였을 때 감소되는 결과를 나타내었다. anserine의 함량은 원료육의 한외여과구는 3,000, 500 MWCO시에 원료육에 비해 각각 황다랑어 5%, 20%, 눈다랑어 0.3%, 10% 감소하였고, 가열처리방법과 한외여과방법을 병행한 경우, 황다랑어 18%, 32%, 눈다랑어 16%, 32% 감소하였으며, 이온교환방법과 한외여과방법을 병행한 경우, 황다랑어 10%, 28%, 눈다랑어 14%, 30%

Table 3. Protein, total iron, histidine, carnosine and anserine contents of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* extracts which had been CM-cellulose (IEC+CMC) treatment

Undried extracts		Contents				
		Protein (mg/mL)	Total iron (μg/mL)	Histidine (mg/mL)	Carnosine (mg/mL)	Anserine (mg/mL)
Yellowfin tuna	IEC+CMC	6.27±0.26^{b}	5.20±0.21^{a}	0.80	0.208	4.40
Bigeye tuna	IEC+CMC	9.05±0.82^{a}	4.06±0.20^{b}	1.62	0.012	7.28

IEC+CMC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration and CMC ion exchange; CMC, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(CM-cellulese). Data are expressed as mean±SD (n=3).

Table 4. Protein, total iron, histidine, carnosine and anserine contents of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* freeze-dried extracts which had been subjected to several treatment

Freeze-dried extracts		Contents				
		Protein (mg/g)	Total iron (μg/g)	Histidine (mg/g)	Carnosine (mg/g)	Anserine (mg/g)
Yellowfin tuna	Raw	179.61±6.52^{a}	275.89±14.46^{a}	27.07	2.21	33.33
	UF	95.05±1.74^{c}	115.55±5.80^{c}	23.65	1.82	31.95
	80℃-UF	70.86±1.56^{d}	95.53±3.98^{cde}	23.38	1.19	32.85
	IEC-UF	66.83±1.95^{d}	77.35±0.91^{de}	21.78	1.37	39.19
	IEC+CMC	56.83±1.95^{e}	27.35±1.42^{f}	5.77	0.93	40.83
Bigeye tuna	Raw	170.97±7.38^{b}	225.83±12.25^{b}	15.66	1.63	25.28
	UF	101.66±3.16^{c}	101.06±7.96^{cd}	13.56	1.48	29.25
	80℃-UF	71.87±2.80^{d}	79.46±4.37^{de}	8.79	1.46	44.52
	IEC-UF	68.13±1.80^{d}	70.50±4.66^{e}	6.80	0.82	52.01
	IEC+CMC	58.13±1.64^{e}	26.42±2.25^{f}	3.53	ND	51.79

Raw, represent the sample which had been freeze dried raw material; Raw-UF, represent the sample which had been permeate ultrafiltration; 80℃-UF, represent the sample which had been extracted by heated 80℃, 10min and permeate ultrafiltration; IEC-UF, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration; IEC+CMC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration and CMC ion exchange; CMC, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(CM-cellulese). Data are expressed as mean±SD (n=3).

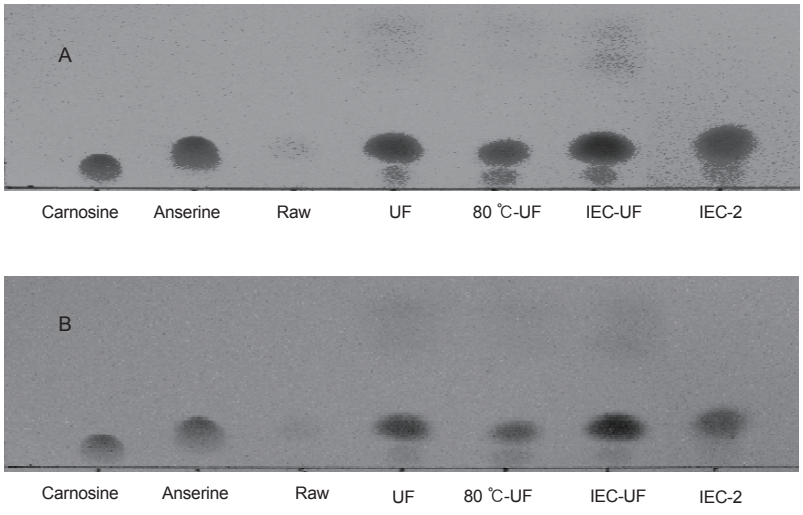

Fig. 3. Carnosine and anserine and tuna freeze dried (FD)-extracts on TLC. A, freeze dried extracts of yellowfin tuna *Thunnus albacares*; B, freeze dried extracts of bigeye tuna *Thunnus obesus*; UF, represent the sample without heated treatment and permeate ultrafiltration(UF); 80℃-UF, represent the sample which had been extracted by heating to 80℃ for 10 min and UF; IEC-UF, represent the sample which had been extracted by ion ex-change chromatography (Dowex 2×8) and UF; IEC-2, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration and CMC ion exchange ; TLC, thin layer chromatography.

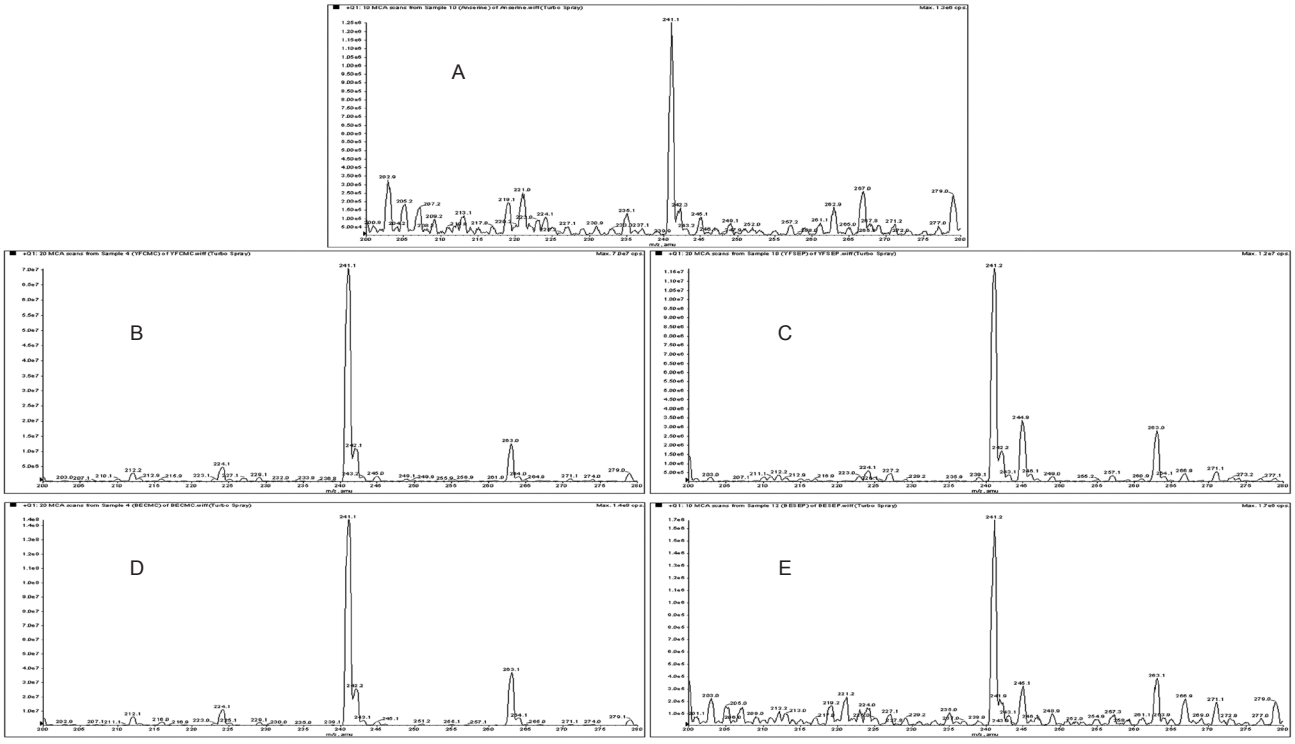

Fig. 4. HPLC chromatogram of yellowfin *Thunnus albacares* and bigeye tuna *Thunnus obesus* extracts. A, Yellowfin tuna extracts; B, Bigeye tuna extracts; ans, anserine standard; UF, represent the sample which had been freeze dried raw material ; IEC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange ; IEC-UF, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration ; IEC+CMC, represent the sample which had been extracted by DOWEX 2×8 ion exchange and permeate ultrafiltration and CMC ion exchange. .

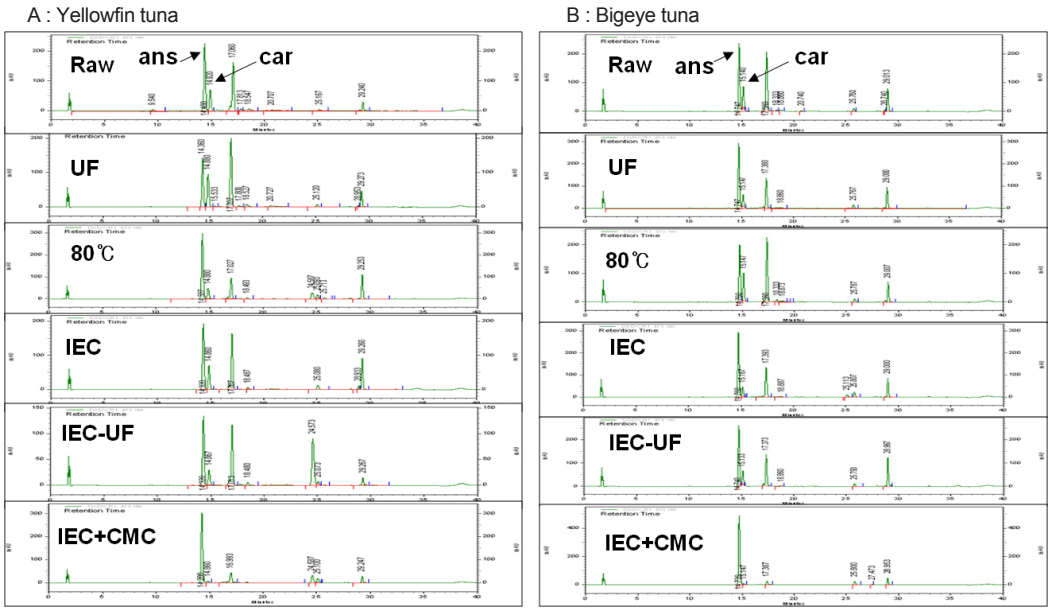

Fig. 5. LC/MS chromatogram of anserine standard and tuna extracts. A, anserine standard; B, yellowfin tuna *Thunnus albacares*; extracted by CM-cellulose ion exchange; C, yellowfin tuna freeze-dried extracted by CM-cellulose ion exchange; D, bigeye tuna *Thunnus obesus*; extracted by CM-cellulose ion exchange; E, bigeye tuna freeze-dried extracted by CM-cellulose ion exchange.

가량 감소하였다. 한외여과방법을 통한 분자량의 조절 시 모든 처리구에서 3,000 MWCO에서 500 MWCO까지 histidine, carnosine, anserine 모두가 비슷하거나 약간의 감소하는 경향을 나타내었으나, 철과 단백질의 함량은 크게 감소하는 결과를 나타내었다. William et al. (1954)은 투석이나 한외여과와 picric acid의 사용으로 아미노산의 큰 손실 없이 단백질을 효과적으로 제거할 수 있다고 하였으며 dipeptide의 함량은 가열처리와 비교하여 그 감소가 적다(Song et al., 2006)는 결과와 일치하였다.

CM-cellulose 크로마토그래피에 따른 함량 변화

Chan et al. (1993)은 단백질과 같은 고분자 전해질에 대해 교환 용량이 크고, 변성을 최소 할 수 있는 CM-cellulose를 이용한 이온교환을 통해 heme 화합물과 미네랄 성분을 효과적으로 제거할 수 있다고 하였으며, 이에 단백질과 histidine의 함량은 낮으면서 histidine 함유 dipeptide의 비율이 상대적으로 높은 이온교환과 한외여과(500 MWCO)를 병행한 추출물을 대상으로 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 처리를 통하여 분획한 추출물(IEC+CMC) 중에 함유된 단백질, 철, histidine, carnosine, anserine의 함량변화를 살펴보았다(Table 3). 이온교환과 한외여과를 병행한 추출물에 비해 2차 이온교환 추출물이 단백질과 총철, histidine의 함량이 황다랑어가 각각 43%, 73%, 27%, 눈다랑어 0.4%, 54%, 23% 감소된 반면에, carnosine과 anserine의 함량은 황다랑어가 22%, 17% 증가하였으며, 눈다랑어 경우 carnosine은 약간의 감소가 있었으나, anserine은 32% 가량 증가하였다.

동결건조에 따른 함량 변화

동결건조를 통하여 건조물 중에 함유된 단백질, 철, histidine, carnosine, anserine의 함량변화를 측정하였다(Table 4). 황다랑어, 눈다랑어 모두 한외여과방법을 통해 원료육에 비해 각각 47%, 41%의 단백질 함량의 감소를 나타내었으며, 가열처리방법과 한외여과방법을 병행한 경우 60%, 58%, 이온교환방법과 한외여과방법을 병행한 경우 63%, 60%, 2차 이온교환 처리구가 68%, 66%의 단백질 함량의 감소를 나타내었다. 철 함량은 황다랑어, 눈다랑어 각각 원료육에 비하여 한외여과처리가 58%, 55%, 가열처리와 한외여과를 병행하였을 때 66%, 65%, 이온교환과 한외여과를 병행하였을 때 72%, 69%, 2차 이온교환 처리가 90%, 88%의 철 함량을 감소시켰다. Histidine은 황다랑어, 눈다랑어 동결물 중 2차 이온교환 처리가 원료육에 비해 각각 79%, 78%로 확연히 감소되었으며, carnosine의 경우 원료육에 비해 각 처리구가 모두 감소되는 결과를 나타냈다. Anserine의 함량은 황다랑어 한외여과처리와 가열처리와 한외여과를 병행한 동결물에서 약간의 감소가 있을 뿐, 이온교환과 한외여과 처리구, 2차 이온교환 모두 18%, 23% 증가하였으며, 눈다랑어 동결건조물에서는 한외여과, 가열처리와 한외여과처리구가 각각 16%, 76% 증가 하였고, 이온교환과 한외여과 병행처리와 2차 이온교환처리 모두 2.1배 증가하는 결과를 보였

다. CM-cellulose 처리구가 철 함량은 가장 낮으면서 동결건조 시 총철 함량에 대한 dipeptide의 비율이 가장 높은 함량으로 나타났다.

TLC를 이용한 추출물의 동정

합성 carnosine과 anserine 그리고 동결 건조한 다랑어 추출물을 5 mg/mL의 동일 농도로 silica gel을 이용하여 spot한 결과를 나타내었다(Fig. 3). Carnosine과 anserine의 Rf값은 각각 0.096과 0.13으로 나타났으며, 동결건조물에서도 동일한 Rf값을 나타내었다. 황다랑어, 눈다랑어 모두 원료육을 동결건조 하였을 때 희미하게 발색된 것이 한외여과, 가열처리 한외여과, 이온교환 한외여과, 2차 이온교환을 거치면서 histidine 함유 dipeptide가 선명하게 발색되어 농도가 증가됨을 나타내었다.

HPLC 분석

HPLC를 이용하여 각 추출 방법에 따른 변화를 Fig. 4에 나타내었다. HPLC 분석 결과 표준물질인 anserine과 carnosine은 14분과 15분대에서 peak가 나타남을 확인 할 수 있었다. 황다랑어, 눈다랑어 원액의 경우 14분과 15분 영역에서 anserine과 carnosine의 peak가 확인되었으나 다소 분자량이 큰 것으로 추정되는 peak들이 17-18분대와 29분대 영역에서 나타났다. 한외여과를 거치면서 주요 peak를 제외한 기타 peak들의 감소가 나타났으며, 가열처리와 한외여과를 병행하였을 때, 17-18분대 사이에 존재하던 다수의 peak가 감소 하였는데 이는 한외여과처리를 통해 분자량을 조절하였기 때문에 단백질 잔여물의 감소에 의한 것으로 사료된다. 이온교환처리와 한외여과처리를 병행한 경우 17-18분대 사이에 존재하던 peak의 감소가 나타났으며, CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 하였을 때 황다랑어와 눈다랑어 모두 anserine의 peak를 제외하고 다른 잔기의 사라짐을 나타냈다. 이는 2차 이온교환을 하면서 활성을 띄는 분획을 받으면서 다랑어의 대부분을 차지하는 anserine을 위주로 분획하여 anserine을 제외한 다른 단백질의 감소를 나타낸 것으로 사료된다.

LC/MS를 이용한 질량분석

LC/MS를 이용하여 다랑어에서 추출한 anserine이 표준물질인 합성 anserine과 동일 물질인지를 확인하기 위해 분석한 결과는 다음과 같다. LC/MS를 이용하여 표준물질 anserine과 본 실험에서 추출한 anserine의 분자량을 확인한 결과(Fig. 5) 시료 모두 동일한 분자량(M.w 240)을 가진 물질임이 확인되었으며, 또한, 분자량 260대의 물질도 미량 존재하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 기존의 histidine 함유 dipeptide의 추출방법인 가열처리와 한외여과를 병행하는 방법보다 이온교환과 한외여과를 병행하는 추출방법과 CM-cellulose를 이용한 2차 이온교환을 하는 방법이 histidine 함유 dipeptide의 농도를 높게 유지하면서 산화촉진물의 제거에 효율적인 방법이라 판단된다.

사 사

이 연구는 2017년 영산대학교 교내연구비의 지원을 받아 수행되었음.

References

Anita Gr, Ewa K and Wieslawa G. 2009. Determination of Serum Proteins in the Presence of Dextran by means of the Biuret Reaction. Transfus Med Hemother 4, 48-50. https://doi.org/10.1159/000219790.

AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th ed., Association of official analytical chemists, Washington D.C., U.S.A., 69-74.

Abe H and Okuma E. 1991. Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle. Nippone Suisan Gakkaishi 57, 2101-2107. https://doi.org/10.2331/suisan.57.2101.

Abe H. 2000. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. Biochemistry 65, 757-765.

Bussayarat M and Intarapichet KO. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. Meat Sci 71, 364-374. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.017.

Chan KM, Decker EA and Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occuring antioxidant in beef muscle. J Food Sci 58, 1-7. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03199.x.

Cheong HS. 2007. Antioxidants effects of histidine containing low molecular weight peptide isolated form *skipjack* boiled extract. Korean J Food Cookery Sci 23, 221-226.

Choi YJ, Kim IS, Lee KW, Kim GB, Lee NG and Cho YJ, 1996. Available components of cooking drips, dark muscle, head and raw vicera from skipjack. Korean J Fish Sci 29, 701-708.

Crush KG. 1970. Carnosine and related substaces in animal tissues. Comp. Binchem Physiol 34, 3-30. https://doi.org/10.1016/0010-406x(70)90049-6

Decker EA and Faraji H. 1990. Inhibition of lipid oxidation by carnosine. J Am Oil Chem Soc 6, 650-652. https://doi.org/10.1007/bf02540416.

Gopalakrishnan J, Decker EA and Means WJ, 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. Meat Sci 52, 101-110. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00154-5.

Hector G, Nelson B and Gladys PR. 1995. Improved rapid method for the isolation, purification and identification of collagen glycosides. J Chromatography, 732, 385-389. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01296-6.

Kanner JS, Harel and Jaffe R. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. J Agric Food Chem 39, 1017-

1024. https://doi.org/10.1021/jf00006a002.
Koizumi C, Ohshima T and Wada S. 1983. Inhibitory effect of bigeye tuna meat extract on sodium chlorite-catalyzed oxidation of linoleate. Bull of Jap Soc of Sci Fish 50, 275-280. https://doi.org/10.2331/suisan.50.275.
Maikhunthod B and Intarapichet KO. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. Meat Sci 71, 364-374. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.017.
McManus IR. 1959. The metabolism of anserine and carnosine in nomal and vitamin E-deficient rabbits. J Biol Chem 235, 1398-1403.
Oh KS, Lee EH, Kim MC and Lee KH. 1987. Antioxidative activities of skipjack meat extract. Bull Kor Fish Soc 20, 441-446.
Stefanie G, Madlen Z, Ilka K, Fritz M and Matthias B. 2010. The bioactive dipeptide anserine is transported by human proton-coupled peptide transporters. Eur J Biochem 277, 790-795. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07528.x.
Sato M, Karasawa N, Shimizu M, Morimatsu F and Yamada R. 2007. Safety evaluation of chicken breast extract containing carnosine and anserine. Food Chem Toxicol 46, 480-489. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.020.
Song HS, Lee KT and Kang OJ. 2006. Effects of extraction method on the carnosine, protein, and iron contents of eel (Anguilla japonica) extracts. Korean J Fish Sci 39, 384-390. https://doi.org/10.5657/kfas.2006.39.5.384.
Shinichi K, Genya W, Masatoshi K, Motoni K and Shinobu F. 2014, Effect of dietary histidine on contents of carnosine and anserine in muscles of broilers. Anim Sci J 86, 541-546. https://doi.org/10.1111/asj.12322.
Stookey LL. 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. Anal Chem 42, 779-781.
William HS and Stanford M, 1954. The free amino acid of human blood plasma. J Biol Chem 206, 915-926.
Wu HC, Shiau CY, Chen HM and Chiou TK. 2003. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. J Food Drug Anal 11, 148-153.