

연어(*Oncorhynchus keta*) 추출 anserine의 항산화 효과

민혜옥¹ · 송호수^{2*}

¹식품의약품안전처 식품안전정책국 건강기능식품정책과,
²영산대학교 서양조리학과

Antioxidant Effect of Anserine Extracted from Salmon (*Oncorhynchus keta*)

Hye-Ok Min and Ho-Su Song^{1*}

Ministry of Food and Drug Safety Food Safety Policy Bureau Health Functional Food Policy Division
¹Department of Western Cuisine and Culinary Arts, Youngsan University, Busan, Korea

(Received July 12, 2019/Revised July 15, 2019/Accepted July 17, 2019)

ABSTRACT - Ion-exchange chromatography and ultrafiltration were used to extract anserine from salmon (*Oncorhynchus keta*). The salmon anserine showed DPPH radical scavenging activity in the range of 7.30% to 31.05% in a dose-dependent manner. This reducing power of salmon anserine also increased as the concentration increased. Metal chelate activity, superoxide dismutase - like activity, and thiobarbituric acid reactive substances assay showed similar results. The anserine also suppressed the increment of the peroxide value and linoleic acid during storage periods. These results suggest that salmon anserine might be useful as a natural antioxidant in various foodstuffs.

Key words : Salmon(*Oncorhynchus keta*), Anserine, Functional properties, Natural antioxidant

Anserine은 β -alanine과 1-methylhistidine이 결합한 히스틴딘계 저분자 펩타이드로 거위 근육에서 처음으로 발견되었다¹⁾. Anserine은 특히 연어, 다랑어, 가다랑어와 같은 회유성 어류의 백색육에 많이 존재하며^{2,4)} 조류, 파충류에서도 다량으로 함유되어 있는 것으로 보고 되었다⁵⁾.

주로 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 추출은 축육 및 가공육을 대상으로 이루어져 왔으며 이러한 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 자유라디칼 소거능과 지질산화 억제능 등 항산화능에 대해 보고된 바 있다⁶⁾.

산화란 물리적 또는 화학적 요인에 의해 한 화학종이 전자를 잃거나 공유결합에서 자기보다 전자를 당기는 힘이 강한 화학종과 결합하여 일어나는 반응으로 식품에서는 당질, 단백질, 지방질 등과 같은 성분의 산화에 의한 품질 열화가 대표적이며, 사람에게는 생체 내 성분의 산화에 의한 노화에 깊이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다. 항산화제는 이러한 산화를 방지하거나 지연시키는 능력을 가진 화합물을 총칭하는 것으로 산화의 원인물질과

우선적으로 반응함으로써 다른 화합물의 산화를 방지하는 역할을 한다⁷⁾. 항산화제에 대한 연구는 과산화 라디칼을 소거하는 효소인 SOD의 발견을 계기로 이것의 활성산소 발생억제 및 생물독성 방어 또는 소거기구 등에 대해 관심을 가지게 되면서 본격적으로 진행되었다⁸⁾.

식품 과학 분야에서 항산화제는 주로 유지의 산화억제 또는 지연을 위하여 사용하는 물질이라는 의미가 강하였으나⁹⁾ 최근 항산화제에 의한 산화억제 또는 지연기능이 생체 내에서도 발현된다는 사실이 알려지면서 항산화제는 이제 식품의 품질보존 차원을 넘어 노화 억제 및 질병 치료제라는 측면에서 접근하는 연구로 전환되고 있는 실정이다¹⁰⁾.

대표적 합성 항산화제로 알려진 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone (TBHQ) 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 많이 사용되어져 왔으나, 발암성 및 독성 등의 안전성에 대한 문제가 제기되고 있다^{11,12)}. 따라서 최근 20여 년간 인체에 무해한 새로운 항산화제의 개발을 위해 인간이 오랫동안 섭취해왔던 동식물로부터 항산화 효과가 있는 천연물질을 분리하여 이를 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다^{13,14)}.

천연항산화제 중에서 carotenoid, anthocyanin, α -

*Correspondence to: Ho-Su Song, Department of Western Cuisine and Culinary Arts, Youngsan University, Busan 48015, Korea
Tel: +82-51-540-7142, Fax: +82-51-540-7137
E-mail:hssong@ysu.ac.kr

tocopherol, vitamin C 및 flavonoid 등은 대표적인 식물성 항산화제이며^{15,16)}, 이들 식물성 항산화제의 경우 항산화 효과는 높지 않은 반면 가격이 비싸고, 특유의 향과 색을 가지고 있어 산업적 이용에 제약을 받고 있다¹⁷⁾. 동물성 항산화제로는 주로 가축이나 가금류의 근육을 원료로 하여 추출한 저분자 펩타이드가 관심을 끌고 있고, 이들의 항산화 효과에 대한 연구가 최근 매우 활발하게 진행되고 있다¹⁸⁻²¹⁾. 그러나 해양생물자원을 원료로 한 항산화제의 검색이나 추출 그리고 항산화 효과에 대한 연구는 미미한 실정이며, 수산가공 부산물을 이용한 기능성 펩타이드 개발에 관한 연구가 시도된 바 있으나 아직 초기 단계에 있다고 할 수 있다²²⁻²⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 천연항산화제로써의 가능성을 알아보기 위해 연어에서 추출한 anserine을 대상으로 기능성을 검토하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서 사용한 한국산 연어(*Oncorhynchus Keta*, East coast, Gangneung)는 평균 길이 62.80±4.89 cm, 둘레 30.85±2.52 cm, 무게 2.28±0.42 kg로 -80°C에 동결하여 사용하였다. Anserine과 N-methyl-L-histidine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene은 Tokyo Kasei Kogyo Co.(Kanto, Tokyo, Japan)에서 구입하였고 그 외의 모든 시약은 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

Anserine 추출

1차 이온교환처리

Suyama 등²⁵⁾의 방법에 따라 연어 육 일정량에 2배 분량의 1% picric acid를 첨가하여 마쇄한 후 homogenizer (PH-91, SMT Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 균질화시켜 원심분리 (8,000×g, 30 min, 4°C) 하였다. 이를 Whatman No. 5A 필터로 여과하여 침전물을 제거하였다. 그리고 Dowex 1×8 (Sigma, St. Louis, USA) chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 이온교환 함으로써 picric acid로부터 유리시켰다.

한외여과처리

1% picric acid를 이용하여 1차 이온교환 처리한 추출물을 Bussayarat와 Kanokorn¹⁴⁾의 방법에 따라 한외여과장치 stirred cell ultrafiltration (Amicon Co., Beverly, MA, USA) 장치를 이용하여 50 psi에서 한외여과 하였다. 한외여과막 (YM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)을 이

용하여 분자량을 최종 500 MWCO (molecular weight cut off)이하로 조절하였다.

2차 이온교환처리

1차 이온교환처리 및 한외여과처리한 추출물을 Chan 등²⁶⁾의 방법에 따라 CM-cellulose column (2.5×40 cm)을 이용하여 이온교환크로마토그래피를 하였다. 먼저 1 mM sodium phosphate buffer (pH 3.5)를 흘려 평형화시킨 뒤 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.5)도 동일한 방법으로 충분히 흘려주어 안정화시킨 후 추출액을 칼럼에 주입시켜 분당 2 mL씩 분취 받았으며 표품인 anserine이 최대 흡광도 수치를 나타내는 212 nm에서 흡광도를 측정하여 높은 값을 나타내는 분취물을 모아 실험용 시료로 사용하였다..

DPPH 라디칼 소거능

연어로부터 추출한 anserine의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 확인하기 위해 Wu 등²⁷⁾의 방법에 따라 실험하였다. 공시험구의 시료는 탈이온수를 사용하였으며 1.5 mL의 각각의 시료에 0.1 mM DPPH용액 1.5 mL를 첨가한 후 혼합물을 교반 후 실온에서 30분간 정치시킨 후 자외선 분광계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Radical scavenging activiti}(\%) \\ & = \frac{\text{Blank absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Blank absorbance}} \times 100 \end{aligned}$$

환원력

환원력은 Oyaizu²⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. 대조구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 시료 2 mL에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 2 mL와 1% potassium ferricyanide 2 mL를 첨가한 후 혼합물을 50°C에서 20분간 배양시키고 2 mL의 10% trichloroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가했다. 배양된 반응물 2 mL에 증류수 2 mL와 0.4 mL의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가하여 10분후에 자외선분광계를 이용해서 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

금속킬레이트능

Decker 등²⁹⁾의 방법에 따라 시료용액 1 mL에 탈이온수 3.7 mL를 혼합시킨 후 2 mM FeCl₂ 0.1 mL과 5 mM Ferrozine 0.2 mL를 넣어 반응시켜 10분 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 방법으로 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Metal chelating effect}(\%) \\ & = \frac{\text{Blank absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Blank absorbance}} \times 100(\%) \end{aligned}$$

Superoxide dismutase 유사활성

SOD 유사활성측정은 Marklund³⁰⁾ 방법에 따라 농도별로 제조한 각 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer (50 mM tris+10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 mL와 7.2×10^{-3} M pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl (1 mL)로 반응을 정지시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 시험용액 대신 탈이온수를 첨가하여 다음 계산식에 따라 SOD 유사활성(%)을 계산하였다.

$$\text{SOD like activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 시험구의 흡광도 B: 대조구의 흡광도

과산화물가

과산화물가(POV)는 AOAC³¹⁾법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM linoleic acid (95% EtOH)와 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 pH를 7.0으로 조절하여 linoleic acid 10, 유화제 1의 비율로 제조하였으며 추출물은 linoleic acid를 기준으로 1%를 첨가한 액을 시험용액으로 하였다. 산화를 촉진시키기 위해 50°C, 암소에서 7일간 저장하면서 과산화물 생성의 경시적인 변화를 측정하였다. 시험용액 1 g을 취하여 유기용매(chloroform : acetic acid = 2:3) 35 mL를 가하여 용해한 후 KI 포화용액 1 mL를 가하여 약 1분간 강하게 진탕한 다음 5분간 암소에 방치한 후 증류수 75 mL를 가하여 1분간 진탕시키고 1% 전분 용액 1 mL를 지시약으로 하여 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하였다. 따로 공시험을 하여 보정하고 다음 식에 따라 과산화물가를 산출하였다.

$$\text{POV (meq/kg)} = \frac{(T_1 - T_0) \times F \times N \times 1000}{S}$$

T_1 : 시료의 적정값(mL) T_0 : Blank의 적정값(mL)

F : Factor(=1)

N : Na_2SO_3 의 노르말 농도

S : 시료의 양(g)

Thiobarbituric reactive substances 생성 억제능

TBARS는 Mitsuda³²⁾와 Sidwell³³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 시료 2 mL에 35% TCA (trichloroacetic acid)용액 1 mL와 0.75% TBA (thiobarbituric acid)시약 2 mL를 가하여 혼합한 후 90°C에서 40분동안 반응시킨 다음 냉각시키고 acetic acid 1 mL, chloroform 2 mL를 가한 뒤 8,000×g에서 3분간 원심분리하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 탈이온수로 공시험하여 보정하고 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 하여 다음 식에 따라 대조구에 대한 TBARS 생성 억제 능력(%)을 산출하였다.

$$\text{Inhibition of TBARS (\%)} = \left[1 - \frac{A}{B}\right] \times 100$$

A : 시험구의 흡광도 B : 대조구의 흡광도

통계분석

실험결과와 통계처리는 3회 반복 실험한 자료를 Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에 의해 분석하였으며, 조사 항목들 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법으로 $P < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

Results and Discussion

연어 추출 anserine의 DPPH 라디칼 소거능

연어 추출 anserine의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결

Table 1. Scavenging activity (%)^{*} of free amino acids, antioxidants, anserine and freeze dried salmon anserine on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical under different concentrations

Sample	Concentration(mg/mL)				
	0.5	1	2	3	4
Taurine	- ^{***}	-	1.34±0.19 ^{f**}	2.01±0.43 ^g	3.74±0.15 ^g
β-Alanine	-	-	1.59±0.27 ^f	4.81±0.34 ^f	5.16±0.45 ^f
1-Methylhistidine	4.75±0.19 ^e	5.38±0.09 ^e	7.08±0.85 ^e	8.54±0.34 ^e	9.12±0.90 ^e
Anserine	9.30±0.65 ^c	10.06±0.60 ^d	15.75±0.46 ^d	21.99±0.50 ^d	28.23±0.24 ^d
IEC-B	7.30±1.13 ^d	13.25±0.38 ^c	21.25±0.46 ^c	25.40±0.13 ^c	31.05±0.17 ^c
Ascorbic acid	38.63±1.76 ^b	47.41±2.69 ^b	59.99±1.87 ^b	61.66±0.85 ^b	63.77±1.78 ^b
BHT	74.29±1.06 ^a	76.07±0.88 ^a	79.91±0.52 ^a	81.18±0.65 ^a	82.86±0.39 ^a

^{*} The results are shown as [(Blank absorbance-Sample absorbance)/Blank absorbance]×100%.

^{**} Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3).

Means within a measurement with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

^{***} Not detectable

IEC-B : Ion exchange chromatography (Dowex 1×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromatography (CM-cellulose) treated.

과는 Table 1에 나타났다. 대조구로는 시중에서 판매되고 있는 합성 anserine과 anserine을 이루는 β -alanine, 1-methylhistidine, 항산화제로는 ascorbic acid와 BHT를 사용하였으며 1차 이온교환 및 한외여과 처리 후 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환 처리한 추출물(IEC-B)을 이용하여 실험하였다. 그 결과 모든 실험구에서 농도 증가에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며 1-methylhistidine과 β -alanine의 경우 0.5 mg/mL, 1 mg/mL의 농도에서는 라디칼 소거능이 나타나지 않았으나 그 이상의 농도에서 약간의 라디칼 소거능을 나타냈다. BHT, ascorbic acid는 농도 증가에 따라 각각 74.29~82.86%, 38.63~63.77%로 증가하였는데 BHT의 경우 농도 증가에 비해 라디칼 소거능이 크게 증가되지 않았다. Anserine, 1-methylhistidine과 연어 2차 이온교환 추출물인 IEC-B 추출물 또한 농도 증가에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며 ascorbic acid와 BHT 라디칼 소거능의 약 48.69%, 37.47%를 나타냈으며 시중에서 판매중인 anserine 제품보다 약간 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. Anserine의 hydroxyl radical 제거능력은 histidine 잔기의 측쇄로부터 수소를 공여하는 역할로부터 비롯된다고 보고된 바 있다³⁴). 최근에는 ESR (electron spin resonance)연구를 통해 anserine의 hydroxyl radical 불활성화 능력이 확인된 바 있다³⁵). 이러한 anserine의 전자공여능은 식품 중에서는 지방산화 억제제를 위한 목적으로 인체 중에서는 노화를 억제시키는 작용으로 이용될 가능성을 제시한다.

연어추출 anserine의 환원력 측정

일반적으로 환원력은 산화된 물질을 다시 환원시키는 능력을 말하며 항산화활성이 있는 물질의 환원물이 Fe^{3+} /ferricyanide 복합체를 ferrous형태로 환원시켜 나타난 색의 정도를 700 nm에서 측정하는 원리³⁶)로 흡광도 수치가 높을수록 높은 환원력을 가진다³⁷). 연어 추출 anserine이 환

원력을 가지는지 확인하기 위해 각각의 대조구와 추출물의 환원력을 측정하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 전체적으로 농도 증가에 따라 환원력 또한 증가하였으며 ascorbic acid와 BHT가 가장 높은 환원력을 가진 것으로 나타났다. ascorbic acid와 BHT를 제외한 나머지 실험구 중 합성 anserine과 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물이 유사한 환원력을 가진 것으로 나타났다. 또한 anserine의 구성 아미노산인 β -alanine과 1-methylhistidine은 약간의 환원력을 나타냈다. Wu 등⁶)은 디펩타이드와 유리아미노산의 환원력을 실험한 결과 anserine이 가장 높은 환원력을 나타냈다고 보고하였고, 이러한 결과는 유리라디칼을 좀 더 안정적인 생산물과 종결 라디칼 체인 반응으로 전환시킬 수 있을 것이라 사료된다.

연어추출 anserine의 금속 킬레이트능 활성

철은 호흡과 산소 운반, 그리고 여러 효소 활성화에 꼭 필요한 성분이나 전이금속으로 원자의 최외각 껍질에서 불안정한 양이온을 만들며 극도로 반응성이 높다. 생체 내에서 $Fe^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}+OH+OH$ 와 같은 Fenton 반응을 통해 세포의 지질 및 단백질 산화를 촉매하고 식품의 가공 및 저장 중에 지방질의 산화를 촉매시킨다^{37,38}). 산화를 촉진시키는 금속과 결합해 고리를 형성하여 금속을 봉쇄하는 것은 항산화 메카니즘 중의 하나이다. 따라서 연어 추출 anserine의 금속 봉쇄력을 확인하고자 금속 킬레이트능 실험을 하였다. 실험 결과 모든 실험구의 농도 증가에 따라 전체적으로 금속 킬레이트능이 증가하였으며 각 농도대에서 BHT가 32.82~79.46%로 가장 높은 금속 킬레이트능을 나타냈다(Table 3). 또한 anserine과 ascorbic acid, 연어 추출 anserine인 IEC-B의 금속 킬레이트능은 유의적인 차이가 없었으며 β -alanine, 1-methylhistidine에 비해 높은 킬레이트능을 나타냈다.

Table 2. Reducing power** of free amino acids, antioxidants, anserine and freeze dried salmon anserine under different concentrations

Sample	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2	3	4
Taurine	0.025±0.002 ^a	0.029±0.002 ^c	0.028±0.001 ^c	0.029±0.002 ^c	0.032±0.001 ^c
β -Alanine	0.023±0.002 ^c	0.026±0.001 ^c	0.028±0.002 ^c	0.028±0.003 ^c	0.028±0.002 ^c
1-Methylhistidine	0.029±0.002 ^d	0.033±0.001 ^d	0.036±0.001 ^d	0.038±0.001 ^d	0.043±0.002 ^d
Anserine	0.031±0.003 ^d	0.059±0.001 ^c	0.090±0.004 ^c	0.112±0.001 ^c	0.136±0.001 ^c
IEC-B	0.053±0.008 ^c	0.061±0.001 ^c	0.086±0.003 ^c	0.110±0.002 ^c	0.134±0.002 ^c
Ascorbic acid	2.533±0.019 ^b	2.606±0.017 ^b	2.659±0.024 ^b	2.757±0.013 ^b	2.912±0.174 ^b
BHT	2.868±0.058 ^a	3.311±0.072 ^a	3.612±0.174 ^a	3.913±0.045 ^a	4.000±0.184 ^a

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

Means within a measurement with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

** Absorbance value at 700 nm. The reducing power of control group is 0.021.

IEC-B : Ion exchange chromatography (Dowex 1×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromatography (CM-cellulose) treated.

Table 3. Chelating activity(%)** of free amino acids, antioxidants, anserine and freeze dried salmon anserine under different concentrations

Sample	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2	3	4
Taurine	1.33±0.32 ^{e*}	2.71±0.34 ^f	4.76±0.65 ^f	7.10±0.34 ^e	8.91±0.29 ^d
β-Alanine	4.20±0.64 ^f	16.59±1.06 ^e	25.74±1.00 ^e	38.15±0.39 ^e	39.36±0.58 ^c
1-Methylhistidine	12.34±0.12 ^e	14.25±1.21 ^e	26.17±0.79 ^e	30.13±0.54 ^f	38.26±0.31 ^c
Anserine	14.17±0.24 ^d	23.07±0.06 ^d	44.22±0.18 ^c	54.60±0.50 ^c	66.32±0.52 ^b
IEC-B	18.28±0.18 ^c	27.21±0.57 ^c	38.93±0.08 ^d	47.24±0.90 ^d	65.04±0.16 ^b
Ascorbic acid	20.45±0.02 ^b	37.84±1.21 ^b	48.25±0.39 ^b	59.24±0.17 ^b	65.77±0.29 ^b
BHT	32.82±1.18 ^a	52.31±1.70 ^a	61.24±0.54 ^a	74.29±0.25 ^a	79.46±1.04 ^a

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

Means within a measurement with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

** The results are shown as $\left(\frac{\text{blank A} - \text{Sample A}}{\text{blank A}}\right) \times 100$.

IEC-B : Ion exchange chromatography (Dowex 1×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromatography (CM-cellulose) treated.

Table 4. SOD like activity(%)** of free amino acids, anti-oxidants, anserine and freeze dried salmon anserine under different concentrations

Sample	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2	3	4
Taurine	22.89±0.16 ^{c*}	23.96±0.45 ^c	30.34±0.87 ^c	34.35±0.42 ^c	39.15±0.71 ^d
β-alanine	10.50±0.24 ^e	12.54±0.41 ^f	15.13±0.08 ^e	19.39±0.62 ^e	22.77±0.24 ^e
1-Methylhistidine	8.47±0.74 ^f	9.15±0.21 ^g	10.64±0.26 ^f	12.85±0.18 ^f	17.93±0.57 ^f
Anserine	15.61±0.18 ^d	20.04±0.17 ^d	29.71±0.76 ^c	35.74±0.25 ^c	40.13±0.44 ^c
IEC-B	10.68±0.41 ^e	14.21±0.25 ^e	21.47±0.12 ^d	30.15±0.56 ^d	41.28±0.21 ^c
Ascorbic acid	30.39±0.35 ^a	49.40±0.75 ^a	62.08±0.24 ^a	73.84±1.42 ^a	80.41±0.49 ^a
BHT	26.71±0.94 ^b	38.41±0.24 ^b	50.11±0.41 ^b	62.31±0.95 ^b	71.07±0.69 ^b

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

Means within a measurement with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

** The results are shown as $\left(\frac{\text{blank A} - \text{Sample A}}{\text{blank A}}\right) \times 100$.

IEC-B : Ion exchange chromatography (Dowex 1×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromatography (CM-cellulose) treated.

Stoch 등³⁹⁾은 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 와 같은 전이금속 이온이 불포화 지방을 산화시키는 반응성 산소종의 발생을 촉진시키며 가수분해물 펩타이드의 킬레이트능이 지질산화를 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 이 실험을 통해 연어 추출물이 Fe^{2+} 와 결합능력을 지닌 것을 확인하였으며 지질 및 단백질 산화를 억제시킬 수 있을 것이라 사료된다.

연어추출 anserine의 Superoxide dismutase 유사활성

Superoxide dismutase (SOD)는 superoxide radical (O_2^-)을 산소로 산화시키는($\text{O}_2^- + \text{HO}_2^- \rightarrow 3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) 천연항산화제로 알려져 있으며 산소를 소비하는 기관에 존재하면서 superoxide anion radical의 손상효과를 보호하는 역할을 수행한다⁴⁰⁾. 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물, 그리고 6가지 비교구를 대상으로 농도별 SOD 유사활성을 조

사한 결과는 Table 4와 같다. 6개의 비교구 중 ascorbic acid, BHT가 30.39~80.41%, 26.71~71.07%로 높은 활성을 나타냈으며 연어로부터 추출한 IEC-B의 경우 ascorbic acid와 BHT보다 낮은 활성을 나타냈으나 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며 합성 anserine과 유사한 활성을 나타냈다. Kim⁴¹⁾의 연구에서 또한 anserine, carnosine, homocarnosine이 BHT나 ascorbic acid보다 SOD 유사활성이 낮게 나타났지만 α -tocopherol, erythroic acid보다는 각각 9.1~14배, 1.8~6.3배 높은 활성을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 저분자 물질들이 SOD 유사활성을 지닌다는 사실이 보고되면서 새로운 물질탐색과 관련된 많은 연구가 진행 중이며 인체 내에서 추가로 생성되지 않는 SOD를 보완할 수 있으리라 사료된다.

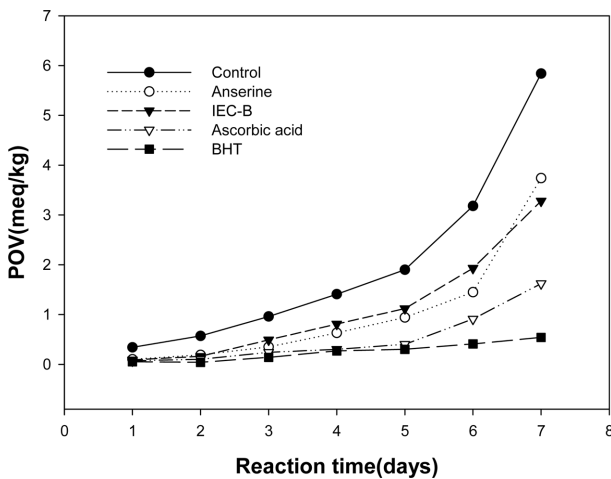


Fig. 1. Effects of anserine, freeze dried salmon anserine, ascorbic acid and BHT on peroxide value of linoleic acid stored at 50°C for 7 days.

연어추출 anserine의 과산화물가 증가 억제

합성 anserine, 연어 추출물 그리고 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 과산화물가를 측정하였다(Fig. 1). 그 결과, 저장 기간 동안 linoleic acid에 대한 대조구의 과산화물가는 큰 폭으로 증가하였으나 ascorbic acid와 BHT의 경우 비교적 안정한 항산화력을 나타냈다. 또한 합성 anserine과 연어 추출물의 경우 대조구에 비해 과산화물가의 증가를 억제시켰으며 그 효과가 유사한 경향을 나타냈다. Wu 등⁴²⁾과 Boldyrev 등⁴³⁾의 연구에서 anserine이 지방의 과산화를 억제하는 효과가 있다고 보고하였으며 본 실험에서 합성 anserine, IEC-B 실험구가 전체적으로 ascorbic acid와 BHT보다는 낮은 능력을 가지나 저장 7일째를 기준으로 봤을 때 대조구에 비해 각각 약 35.96%, 46.58%, 43.84% 감소시켰으므로 천연항산화제로서 이용이 가능할 것이라 사료된다.

연어추출 anserine의 thiobarbituric reactive substance 생성 억제능

불포화 지방산으로부터 형성된 malonaldehyde와 thiobarbituric acid를 반응시켜 형성된 적색 축합물(TBA chromogen)의 농도를 측정하는 것을 TBA가라고 한다. 일반적으로 이 측정법으로 얻어진 값을 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)라고 표현하며 지방 과산화억제와 관련된 많은 연구에서 여러 가지 시스템으로부터 TBARS 측정결과를 활용한 예가 많이 있다⁴⁴⁾.

합성 anserine과 연어 추출물, 그리고 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 TBARS 생성 변화를 Fig. 2에 나타냈다. BHT 첨가구가 가장 낮은 증가를 나타냈으며 Control에 비해 합성 anserine, IEC-B 추출물이 TBARS 생성을 억제시켰으며 그 효과는 유사하였다. 이러한 현상에 대해 Laleye

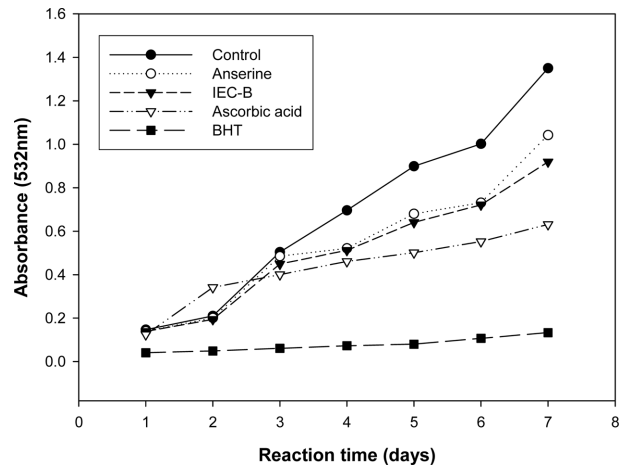


Fig. 2. Effects of anserine, freeze dried salmon anserine, ascorbic acid and BHT on TBARS (absorbance) of linoleic acid stored at 50°C for 7 days.

등⁴⁵⁾은 저장 초기 지방산화에 의해 malonaldehyde (MA)가 다량 생성되나 일정시간 후 MA 생성이 감소되거나 분해 또는 histidine 등의 아미노산과 결합하여 TBARS 값이 감소한다고 보고하였다. 본 실험에서 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물이 Control에 비해 TBARS 생성을 억제시킨 것이 MA가 histidine계 펩타이드인 anserine과 결합하여 나타난 결과라 사료되어지며 과산화물가 실험과 유사한 경향을 나타냄으로서 천연항산화제로서의 사용 가능성을 한번 더 확인해 볼 수 있었다.

국문요약

연어로부터 추출한 anserine의 항산화능 평가를 위해 1차 이온교환 후 한외여과 및 2차 이온교환 추출물인 IEC-B 실험구와 합성 anserine, β-alanine, 1-methylhistidine, taurine, ascorbic acid, BHT를 대조구로 DPPH 라디칼 소거능, 환원력, 금속 킬레이트능, SOD 유사활성 실험을 하였다. DPPH 라디칼 소거능 결과 대조구와 anserine 모두 농도 증가에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며 BHT가 가장 높은 소거능을 나타냈다. 합성 anserine은 농도 증가에 따라 9.30±0.65~28.23±0.24%를 나타냈으며 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물은 7.30±1.13~31.05±0.17%를 나타내 BHT, ascorbic acid에 비해 소거능이 낮으나 두 실험구와 비교했을 때 약 37%, 49% 정도의 소거능을 나타냈다. 환원력 또한 첨가농도에 따라 증가하였으며 BHT와 ascorbic acid가 높은 환원력을 나타냈고, 그 외 실험구 중에서는 합성 anserine과 연어 추출 anserine인 IEC-B 실험구가 높았으며 유의적으로 동일한 환원력을 나타냈다. 금속 킬레이트능은 BHT, ascorbic acid 순으로 높았으며 합성 anserine과 연어 추출 anserine의 경우 ascorbic acid와

유사한 금속 킬레이트능을 나타냈다. 또한 SOD 유사활성에서는 연어 추출 anserine이 BHT와 ascorbic acid에 비해 낮았으나 농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 합성 anserine, 연어 추출 anserine, ascorbic acid, BHT를 이용하여 과산화물가와 TBARS를 실험하였다. 저장기간 중 linoleic acid의 과산화물가는 큰 폭으로 증가한 반면 연어 추출 anserine을 첨가한 경우 과산화물가의 증가가 억제되는 경향이 나타났으며, 이는 TBARS 실험 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

Acknowledgement

이 연구는 2019년 영산대학교 교내연구비의 지원을 받아 수행되었음.

References

- Auh, J.H., Namgung, N., Shin, K.S., Park, S.W., Paik, I.K.: Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. *J. Poult Sci.* **47**, 302-309 (2010).
- Marit, A., Lief, J., Hans, G.: Quantitative high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance of anserine and lactate in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol.* **112B**, 315-321 (1995).
- Suyama, M., Suzuki, T., Nonaka, J.: Chromatographic determination of imidazole compounds in the whale meat. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* **33**, 141-146 (1967).
- Abe, H., Okuma, E.: Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle. *J. Jap. Fish Soc.* **57**, 2101-2107 (1991).
- Huang, S.C., Kuo, J.C.C.: Concentration and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub China part B Life Sci.* **24**, 193-201 (2000).
- Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M., Chiou, T.K.: Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. Food Drug Anal.* **11**, 148-153 (2003).
- Lee, K.T., Song, H.S., Park, S.M.: Antioxidant activities of carnosine, extracted from eel (*Anguilla japonica*) *J. Korean Fish Soc.* **40**, 193-200 (2007).
- McCord, J.M., Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055 (1969).
- Frankel, E.N.: Antioxidants in lipid foods and their on food quality. *Food Chem.*, **57**, 51-55 (1996).
- Giese, J.: Antioxidants : Tool for preventing lipid oxidation. *Food Technol.*, **50**, 73-81 (1996).
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T.: Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343-352 (1983).
- Branen, A.L.: Toxicological and anisole and butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, **52**, 59 (1975).
- Larson, R.A.: The antioxidants of higher plants. *phytochemistry*, **27**, 969-978 (1988).
- Partt, D.E., Hudson, B.J.F.: Natural antioxidant not exploited commercially. In: *Food Antioxidants*. Elsevier, 168-171 (1990).
- Burton, G.W.: Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutri.*, **119**, 110-116 (1989).
- Block, G., Langseth, L.: Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.*, **48**, 80-85 (1994).
- Decker, E.A., Crum, A.D.: Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat sci.*, **34**, 245-253 (1993).
- Casteels, P., Ampe, C., Tempst, P.: Antibacterial peptides from honeybees. *EMBOJ*, **9**, 2397-2391 (1989).
- Nakazato, M., Asai, J., Mitazato, M., Matsuo, H.: Isolation and identification of isletamyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. peptides*, **31**, 179-186 (1990).
- Seki, E.K., Osajima, T., Matsui, Osajima, Y.: 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 (1993).
- Kohama, Y.: Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 332-336 (1988).
- Kim, S.K., Lee, H.C., Jeon, Y.J.: Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.*, **29**, 246-255 (1996).
- Kim, S.K., Choi, Y.I., Choi, J.H.: Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **43**, 225-227 (2000).
- Nam, H.S.: Development of bioactive peptides and its market trend. *Food Ind. Nutri.*, **4**, 17-19 (1999).
- Suyama, M., Hinaro, T., Suzuki, T.: Buffering capacity of free histidine and its related dipeptides in white and dark muscle of yellowfin tuna. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 2171-2175 (1986).
- Chan, K.M., Decker, E., Means, W.J.: Extraction and activity of carnosine a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.* **58**, 1-7 (1993).
- Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M., Chiou, T.K.: Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. Food Drug Anal.* **11**, 148-153 (2003).
- Oyaizu, M.: Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *J. Jap. Fish. Soc.*, **35**, 771-775 (1988).
- Decker, E.A., Welch, B.: Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 674-677 (1990).
- Marklund, S., Marklund, G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**,

- 469-474 (1974).
31. A.O.A.C.: Official methods of analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C. USA, 777-788.(1995).
 32. Mitsuda, H., Yasumoto, K. Iwami, K.: Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo To Shikuryo.*, **19**, 210-217 (1966).
 33. Sidwell, C.G., Salwin,H., Benca, M., Mitchell, J.H., Jr.: The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **31**, 603-609 (1954).
 34. Son, J.Y., Rhim, J.H., Son, H.S.: Effect of some synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of skip jack oil. *Kor. J. Food Nutr.*, **8**, 88-92 (1995).
 35. Kazuaki, K., Yoshiharu, M., Kazuo, S.: Sepatation and physiological functions of anserine from fish extract. *Develop. in Food Sci.*, **42**, 97-105 (2004).
 36. Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K., Li, Z.: Antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extrated from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorgan. and Medic. Chem. Letters*, **16**, 2441-2445 (2006).
 37. Gordon, M.H.: The machanism of antioxidant action in vitro. In food antioxidants. Hudson BJB, ed. *Elsevier Applied Sci.*, London/New York. 1-18 (1990).
 38. Decker, E.A., Hultin, H.O.: Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. In A. J. St. Angelo (Ed.), Lipid oxidation in food (Chapter 3); ACS Symposium sereis 500, Washington, DC. *American Chemical Society* (1992).
 39. Stoch, S.J. Bagchi, D.: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Medic.*, **18**, 321-336 (1995).
 40. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.: Antioxidants in food. *CRC.*, 71-83. (2001).
 41. Kim, W.S.: Antioxidant activity and safety evaluation of carnosine, anserine and homocarnosine isolated from Spent hen. *Ph.D. Thesis, Duksung Women's University, Seoul, Korea*, 1-94 (2003).
 42. Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M., Chiou, T.K.: Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. of Food and Drug Anal.*, **11**, 148-153 (2003).
 43. Boldyrev, A.H., Ave, S., Stvolinsky, Tyulina, O.: Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species : A comparatibe study. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112**, 481-485 (1995).
 44. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.: Antioxidants in food. *CRC.*, 71-83 (2001)
 45. Laleye, L.C., Lee, B.H., Simard, R.E., Camichael, L., Holly, R.A.: Shelf life of vacuum-or nitrogen packed pastrami: effects of packaging atomspheres, temperature and duration of storage on microflora changes. *J. Food. Sci.*, **49**, 827-831 (1984).