creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

工學碩士 學位論文

연어(*Oncorhynchus keta*)로부터 Anserine의 추출 및 기능 특성 해석

2009年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

閔 惠 玉

工學碩士 學位論文

연어(*Oncorhynchus keta*)로부터 Anserine의 추출 및 기능 특성 해석

指導敎授 李 根 泰

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2009年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

閔 惠 玉

閔惠玉의 工學碩士 學位論文을 認准함

2009年 2月

主 審 水産學 博士 趙 永 濟 ㊞

委 員 農 學 博 士 李 養 鳳 ㊞

委 員 工 學 博 士 李 根 泰 ㊞

목 차

Abstract ····· 1

서 론 ····· 5

재료 및 방법 ····· 11

1. 실험재료 ····· 11

1.1. 재료 ····· 11

1.2. 시약 ····· 11

2. 실험방법 ····· 11

2.1. 연어의 성분 분석 ····· 11

2.1.1. 일반성분 분석 ····· 11

2.1.2. 유리아미노산 분석 ····· 12

2.2. 연어 anserine 추출 ····· 12

2.2.1. 가열처리 ····· 12

2.2.2. Dowex를 이용한 1차 이온교환 처리 ····· 12

2.2.3. 한외여과를 이용한 분자량 조절 ····· 15

2.2.4. Carboxymethyl cellulose를 이용한 2차 이온교환 처리 ····· 15

2.3. 추출물에 따른 함량 변화 및 정제 확인 ····· 15

2.3.1. 단백질 함량 측정 ····· 15

2.3.2. 총철 함량 측정 ····· 18

2.3.3. Anserine 함량 측정 ····· 18

2.3.4. SDS-PAGE ····· 22

2.3.5. HPLC 분석 ····· 22
2.3.6. LC/MS를 이용한 질량분석 ····· 22
2.4. 기능성 평가 ····· 24
2.4.1. DPPH 라디칼 소거능 ····· 24
2.4.2. 환원력 ····· 24
2.4.3. 금속킬레이트능 ····· 25
2.4.4. Superoxide dismutase 유사활성 ····· 25
2.4.5. 아질산염 소거능 ····· 25
2.4.6. 과산화물가 ····· 26
2.4.7. Thiobarbituric reactive substances 생성 억제능 ····· 27
2.5. 연어 anserine의 단백질 변성 억제능 측정 ····· 27
2.5.1. Carbonyl group 함량 측정 ····· 27
2.5.2. 전기영동을 통한 단백질 가교결합 형성 억제능 측정 ····· 28
3. 통계처리 ····· 28

결과 및 고찰 ····· 29
1. 연어의 성분분석 ····· 29
1.1. 일반성분 분석 ····· 27
1.2. 연어의 부위별 anserine 함량 분석 ····· 29
1.3. 유리아미노산 분석 ····· 32
2. 추출조건 및 한외여과를 통한 분자량 조절에 따른 함량 변화 ····· 32
2.1. 가열처리 ····· 34
2.2. 한외여과처리 ····· 36
2.3. 이온교환 및 한외여과처리 ····· 37
2.4. SDS-PAGE에 의한 추출물의 분자량 확인 ····· 39

2.5. 기기분석을 통한 추출물의 정성분석 ····· 39
3. 기능성 평가 ····· 43
3.1. DPPH 라디칼 소거능 ····· 43
3.2. 환원력 ····· 47
3.3. 금속킬레이트능 ····· 48
3.4. Superoxide dismutase 유사활성 ····· 51
3.5. 과산화물가 ····· 53
3.6. Thiobarbituric reactive substances 생성 억제능 ····· 53
3.7. 아질산염 소거능 ····· 56
4. 연어 추출 anserine이 단백질 변성에 미치는 영향 ····· 58
4.1. Carbonyl group 함량 측정 ····· 59
4.2. 전기영동을 통한 단백질 가교 결합 형성 억제능 확인 ····· 61

결론 및 요약 ····· 63

감사의 글 ····· 68

참 고 문 헌 ····· 69

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Extraction and Functional Properties of Anserine from Chum Salmon(*Oncorhynchus keta*)

Hye-Ok Min

Department of Food Science and Technology,
Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Antioxidantive activity of food ingredients is one of the important biofunction activities which have been recently focussed on, so lots of studies about antioxidants have been investigated. First of all, antioxidants can be divided into two groups of natural and synthetic antioxidants. Natural antioxidants are limited for industrial utilization because of expensive cost, characteristic odor and color, but synthetic antioxidants put it to good use because of its cheap price and excellent antioxidant activity. However, synthetic antioxidants have defects that give rise to such side effects as hepatomegaly, carcinogenesis possibility and others. Accordingly, lots of studies about natural antioxidants which are nontoxic and have superior antioxidant activity are in progress. Among them, low molecular peptides extracted from muscles of domestic animals and poultries impressed the people and lots of studies about their antioxidant activities are going on. However little studies on searching, extraction, antioxidative activity for the natual antioxidant which are produced from marine organism resources are investigated yet.

Anserine of dipeptide combined with β-alanine and 1-methylhistidine is reported to have antioxidant activity. A large amount of free anserine is found from white muscles of migratory marine fish such as salmon, tuna and bonito. However, only possibility about effectiveness of anserine on antioxidative activity is presented. So we think lots of studies related to the anserine should be investigated. In this work, we have studied the extraction methods of reducing the prooxidants (total iron, protein) and the evaluation for the physiological functions of anserine extracted from salmon. For development of extraction process, several methods were tested such as heat treatment (60℃, 80℃, 100℃), ion exchange chromatography (Dowex 1×8), ultrafiltration (UF) and CM-cellulose column chromatography. For the evaluation of functional activities of anserine, scavenging effect on 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical, reducing power, superoxide dismutase(SOD) like activity, inhibition of linoleic acid autoxidation, nitrite scavenging activity were measured. Another evaluation of anserine is the prevention effect against protein denaturalization which attributed to ovalbumin reacted with hypochlorite inhibition to produce advanced glycation end products through the protein glycation with carbonyl group.

The main results are shown in the below contents.

1. Among total free amino acids of salmon muscle, anserine, histidine and carnosine were 43.06%, 1.58% and 0.10% respectively, showing the highest amount of anserine. Therefore, salmon is a

good source for anserine extraction.

2. Protein, total iron and anserine contents of salmon extracts are as follows; 23.64mg/mL, 16.20μg/mL, 5.47mg/mL at non heating extracts, 7.40mg/mL, 2.32μg/mL, 5.20mg/mL at heating extraction of 60℃, 7.64mg/mL, 1.20μg/mL, 5.21mg/mL at 80℃ and 7.04mg/mL, 0.68μg/mL, 4.04mg/mL at 100℃ respectively. Contents of protein and total iron were decreased by heat treatment and ultrafiltration permeation (UFP). But anserine content slight declined by UFP. The application of primary ion exchange method (Dowex 1×8) to extracts from salmon increased up to 16% for the content of anserine. Protein and total iron contents of primary ion exchange extracts were decreased 70% and 98%, repectively, by UFP. Secondary ion exchange (CM-cellulose) treatment after primary ion exchange and UFP showed lower anserine content than primary ion exchange extracts. However, contents of impurities (protein, total iron) was lower than all other salmon extracts. Therefore, primary ion exchange, UFP and secondary ion exchange method were determinated as the best extraction process in this work.

3. The peak of anserine appeared at 13 minutes of retention time and other peaks distributed between 15~19 minutes in HPLC analysis. Heat treatment, UFP, primary ion exchange chromatography methods decreased other peaks at 15~19 minutes. Secondary ion exchange (CM-cellulose) for salmon extract removed impurities. In

addition to primary ion exchange and UFP, secondary ion exchange got rid of much more impurities in extracts. Both of standard anserine and salmon anserine from this research showed equal molecular weight by LC/MS.

4. As a result of DPPH radical scavenging activity, the activity of salmon anserine increased from 7.30% to 31.05% with concentration addition. Reducing power of salmon anserine increased as the concentration increased. Metal chelate activity, SOD like activity showed similar results. The addition of anserine suppressed increase of peroxide value for linoleic acid during storage time. TBARS experiment showed similar results. Salmon anserine inhibited the formation of carbonyl group and this tendencies increased with the concentration. The result of gel electrophoresis of cross linked protein by hypochlorite salmon anserine inhibited protein degeneration.

Finally, on the basis of these properties, salmon anserine could be applied as a natural antioxidant.

서 론

국민들의 소득과 생활수준이 높아짐에 따라 식생활의 질적 수준 또한 향상되고 있으나 식습관이 점차 서구화 되어감에 따라 과다한 영양섭취와 영양상태의 불균형으로 인해 성인병 및 각종 질병은 증가하고 있다. 이로 인해 국민들의 건강기능성 식품에 대한 관심이 늘어나고 있으며 또한 항산화제에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 인간의 질병 및 노화는 superoxide, hydroxyl, peroxyl(RO_2·), alkoxyl(RO·), hydroperoxyl(HO_2·), nitric oxide(NO·), nitrogen dioxide(NO_2·) radical 등의 산화반응에 의해 기인된다(Fang et al., 2002). 즉 이러한 라디칼은 불안정하고 반응성이 매우 강하여 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴하여 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Yu et al., 2005). 또한 식품의 가공 및 저장 중에 일어나는 유지의 산화는 식품의 품질 저하뿐 아니라 산화에 의해 생성되는 각종 산화 생성물이 세포를 손상시키거나 질병을 유발하며 노화와도 관계가 깊은 것으로 알려져 있다.

항산화제는 이러한 산화를 방지하거나 지연시키는 능력을 가진 화합물을 총칭하는 것으로 산화의 원인물질인 free radical과 반응함으로써 다른 화합물의 산화를 방지하는 역할을 한다. 그 종류는 크게 ascorbic acid, glutathione(GSH)과 같은 수용성 항산화제와 α-tocopherol, β-carotene, ubiquinone 등의 지용성 항산화제, superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소 이 3가지로 분류된다(Kim, 2004). 또한 항산화제는 천연 항산화제와 천연 항산화제를 기초로 합성 가공한 인공합성 항산화제로 구분할 수도 있다. 천연항산화제 중

carotenoid, anthocyanin, ascorbic acid, α-tocopherol과 같은 항산화제(Burton, 1989; Block, 1994)는 유지의 산화를 지연시키거나 방지하여 노화 방지에도 중요한 역할을 하나 가격이 비싸고 특유의 향과 색을 가지고 있어 산업적 이용에 제약을 받고 있다(Decker, 1993). 합성 항산화 물질의 경우 우수한 항산화능력과 낮은 가격 때문에 널리 사용되고 있으나 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), THBQ(tertiary bytylhydroquinone)등과 같은 합성 항산화제의 경우 항산화력이 강한 반면 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암성 등의 부작용이 있으며(Song et al., 2008), 열안정성이 떨어지고 유해물질이 생성되어 안정성 측면에 문제가 있어 식품이나 의약품으로 사용되지 못하게 되었다(Ito et al., 1983). 따라서 인체에 해가 없고 항산화력이 우수한 천연 항산화제의 개발을 위하여 다양한 연구가 진행되고 있으며 그 중에서도 질소화합물인 펩타이드는 그 구조나 생리작용면에서 상당히 주목을 받고 있다(Kim et al., 1996).

Anserine(Fig. 1)은 히스티딘계 저분자 펩타이드로 1929년 Ackermann et al.(1929)에 의해 거위 근육에서 처음으로 발견되었으며 조류, 파충류 그리고 어류에서도 다량으로 함유되어져 있는 것으로 보고되었다(Linneweh et al., 1929). Anserine은 특히 연어, 다랑어, 가다랑어와 같은 회유성 어류의 백색육에 많이 존재하며 이들 어류의 높은 anserine 함량은 회유성 어류의 특징인 이동성과 관련 있는 것으로 알려져 있다(Marit et al., 1995; Suyama et al., 1986; Abe et al., 1991). 이러한 anserine은 지금까지 보고된 연구에 따르면 근육의 운동시 생성된 젖산을 효과적으로 중화시키는 완충능력을 나타냈다고 했으며(Harris et al., 1990; Brown, 1981) Abe et al.(1985)와 Okuma(1991) 또한 anserine과 carnosine이 근육 세포내 완충에 기여한다고 보고하였다. 또한 Wu et al.(2003)은 합성

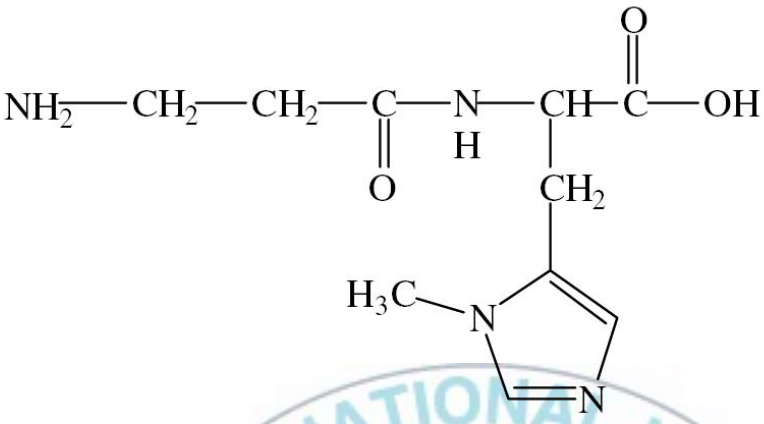

Fig. 1. Chemical structure of anserine.

carnosine 및 anserine등의 저분자 펩타이드의 항산화능과 자유라디칼 및 금속이온 제거능에 대해 보고한 바 있다. 또한 항염증 작용 및 동맥경화와 당뇨병의 치료에 저분자 펩타이드가 효과가 있을 것이라는 보고도 있다(Bucala et al., 1995; Chasovnikova et al., 1990; Gayiba, 1999). 그러나 그 효과에 대해서 가능성만을 제시하는 수준에 그치고 있으며 향후 이와 관련된 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

지금까지 주로 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 추출은 축류 및 가금류를 대상으로 이루어져 왔으며 추출시 단백질 잔여물이나 철과 같은 산화촉진 물질 등이 혼입되는 단점이 있어 이를 방지하기 위해 가열처리, 한외여과처리(Chan, 1993; Decker, 1993) 등이 보고되어져 있다. 그러나 보다 효과적인 추출방법이 필요하다고 생각되며 해양생물자원인 수산물을 이용한 연구는 현재 상대적으로 극히 미비한 실정이며 Anserine의 효율적인 추출방법 또한 아직 보고된 바가 없는 실정이다. 또한 최근 축육을 이용할 경우 구제역 및 광우병에 대한 우려로 이용가능성에 다소 제약을 받는다는 단점이 있으므로 수산물을 이용한 anserine의 추출이 필요하다고 사료된다.

수산물 중 anserine의 함량이 높다고 알려진 한국산 연어(*Oncorhynchus keta*)(Fig. 2)는 청어목 연어아목 연어속에 속하는 냉수성 고급어종으로 현재 우리나라에서의 동해안을 비롯하여 일본해 연안 일대, 그리고 그 밖에 연해주 지방 등에 분포해 있다(Jung, 1988). 연어의 어획량은 2001년부터 2003년까지 42,000톤으로 꾸준히 증가하다가 잠시 감소추세를 보이다 2006년 37,000톤으로 증가하였다(해양수산통계연보, 2007). 양양연어연구센터의 자료에 의하면 1990년도 연어로 인해 연간 4억 6500만원의 수익이 발생하면서 1997년 9억 3300만원으로 최고치에 다다랐으나 현재 연간 약 1억여 원에 그치고 있어 현재 연어로 인한

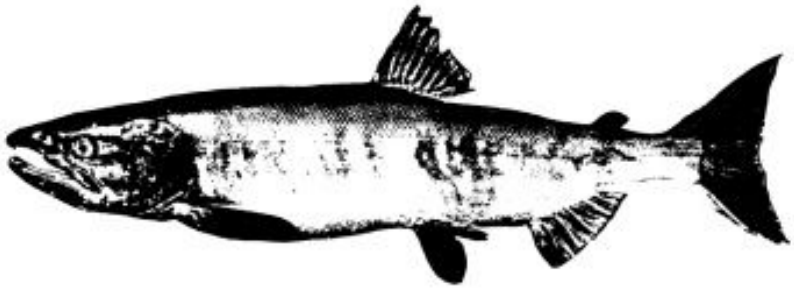

Fig. 2. Photograph of chum salmon(*Oncorhynchus keta*).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

수익창출은 미미한 수준이라고 보고하였다. 따라서 연어를 보다 효율적으로 활용할 수 있는 방법이 필요하다고 생각된다.

이에 본 연구에서는 국내에서는 시도된 바 없는 수산물을 대상으로 기능성 저분자 펩타이드 추출을 통해 수산물의 고부가가치화를 목적으로 하였으며 수산물 중 Anserine이 많이 함유되어 있는 연어를 이용하여 Anserine을 추출하였으며 기존의 추출방법과 새로운 추출방법을 비교하였다. 또한 Anserine의 기능 특성 규명을 위해 인체의 생리적 기능에 중요한 역할을 하는 자유라디칼 및 금속이온 킬레이트능, 지질 및 단백질의 산화 등에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 재료

본 실험에서는 평균 길이 62.80±4.89cm, 둘레 30.85±2.52cm, 무게 2.28±0.42kg의 한국산 연어(*Oncorhynchus Keta*, 11월, 동해안, 강릉산)를 -80℃에 보관하면서 anserine 추출을 위해 일정시간 해동시킨 후 두부와 껍질 그리고 뼈, 혈액 및 내장을 제거하여 추출용 시료로 사용하였다.

1.2. 시약

본 실험에서 사용된 anserine과 N-methyl-L-histidine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical은 Sigma Chemical Co.(St. Louis. USA)에서 구입하였으며 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene은 Tokyo Kasei Kogyo Co.에서 구입하였고 그 외의 모든 시약은 분석용등급 이상의 것을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 연어의 성분 분석

2.1.1. 일반성분 분석

일반성분은 A.O.A.C(1995) 방법에 따라 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 semimicro Kjedahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 건식회화 법으로 정량하였다.

2.1.2. 유리아미노산 분석

유리아미노산은 연어 육 5g에 5-sulfosalicylic acid 0.5g을 첨가하여 제단백 시킨 후 원심분리(3,000×g, 15min, 4℃)하였다. 상층액을 0.2μm membrane filter로 여과한 다음 lithium citrate buffer(pH 2.2)로 일정량 희석하여 이것을 분석액으로 하였다. 이온교환 추출물의 경우 액상상태의 추출물을 취하여 0.02N HCl로 희석시켜 아미노산 자동 분석기(Hitachi Amino Acid Analyzer L-8900, Hitachi Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다.

2.2. 연어 anserine 추출

2.2.1. 가열처리

연어의 가열처리는 Fig. 3와 같이 Chan et al.(1993)과 Gopalakrishnan et al.(1999)의 방법에 따라 행하였다. 육 일정량에 2배의 탈이온수(4℃)를 가하여 마쇄(60sec, 2회)한 연어육을 homogenizer (PH-91, SMT Co., Japan)를 이용하여 균질화(10,000rpm, 2min, 4회)시킨 후 원심분리(8,000×g, 30min, 4℃)하였다. 원심분리 후 Whatman No.5A 필터를 이용하여 여과를 함으로서 침전물을 제거하였고 이 액을 각각 60℃, 80℃, 100℃에서 15분동안 가열처리하여 다시 원심분리(8000×g, 20min, 4℃)시켜 Whatman No. 5A 필터를 사용하여 침전물을 제거하였다.

2.2.2. Dowex를 이용한 1차 이온교환 처리

Suyama et al.(1967)의 방법에 따라 Fig. 4와 같이 연어 육 일정량에 2배 분량의 1% picric aicd를 첨가하여 마쇄한 후 homogenizer(PH-91, SMT Co., Japan)를 이용하여 균질화시켜 원심분리(8,000×g, 30min, 4℃) 하

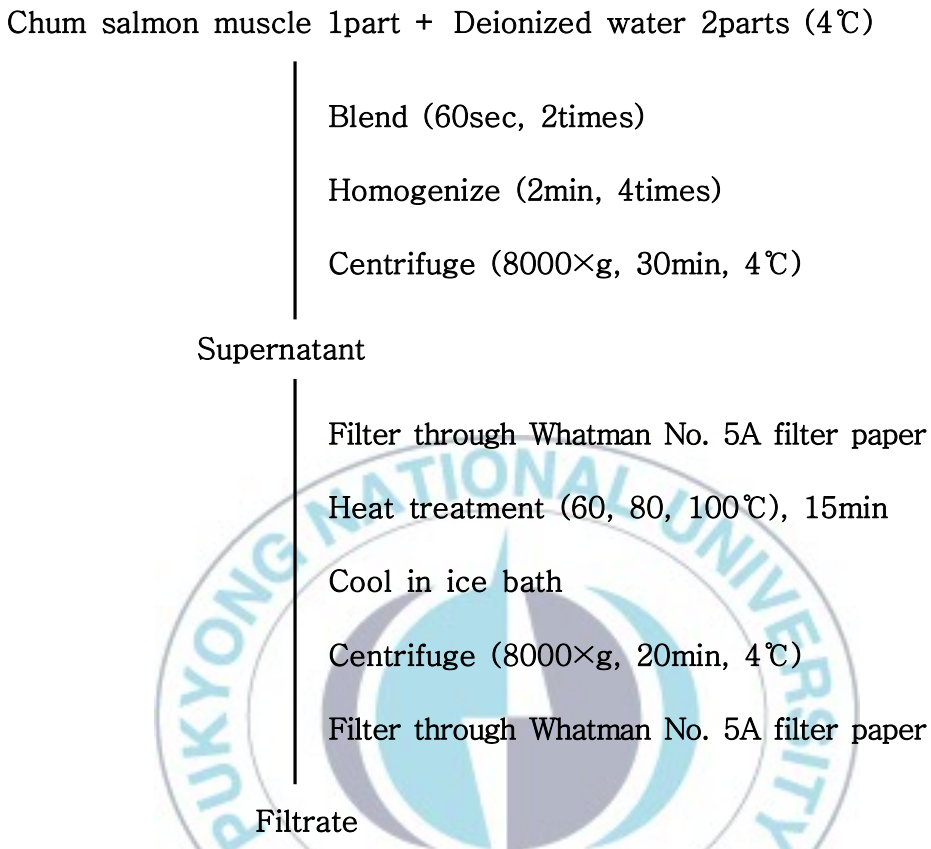

Fig. 3. Procedure for extraction of anserine from chum salmon with water and heat treatments.

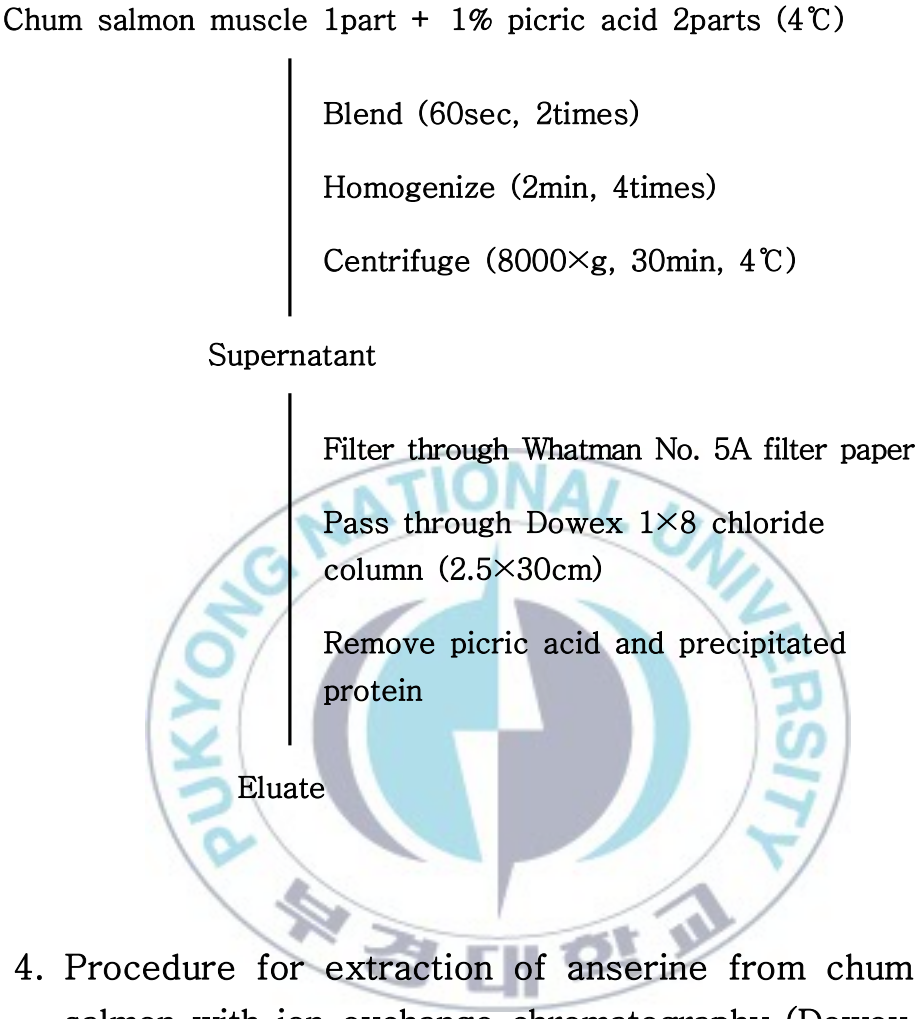

Fig. 4. Procedure for extraction of anserine from chum salmon with ion exchange chromatography (Dowex 1×8).

였다. 이를 Whatman No.5A 필터로 여과하여 침전물을 제거하였다. 그리고 Dowex 1×8 chloride column(2.5×30cm)을 이용하여 이온교환함으로써 picric acid로부터 유리시켰다.

2.2.3. 한외여과를 이용한 분자량 조절

각각 가열처리한 추출물과 1% picric acid를 이용하여 이온교환처리한 추출물을 Bussayarat et al.(2005)의 방법에 따라 Amicon Co.의 stirred cell ultrafiltration 장치를 이용하여 50psi에서 한외여과 하였다. 한외여과막(YM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)을 이용하여 분자량을 500이하로 조절하였다(Fig. 5).

2.2.4. Carboxymethyl cellulose를 이용한 2차 이온교환 처리

Chan et al.(1993)의 방법에 따라 CM-cellulose column(2.5×40cm)을 이용하여 이온교환크로마토그래피를 하였다(Fig. 5). 먼저 1mM sodium phosphate buffer(pH 3.5)를 흘려 평형화시킨 뒤 10mM sodium phosphate buffer(pH 8.5)도 동일한 방법으로 충분히 흘려주어 안정화시킨 후 추출액을 칼럼에 주입시켜 분당 2mL씩 분취받았으며 표품인 anserine이 최대 흡광도 수치를 나타내는 212nm에서 흡광도를 측정하여 높은 값을 나타내는 분취물을 모았다(Fig. 6).

2.3. 추출물에 따른 함량 변화 및 정제 확인

2.3.1. 단백질 함량 측정

각 추출조건에 따른 단백질의 함량 측정은 Allan et al.(1948)의 방법에 따라 biuret법으로 측정하였다. 추출물 1mL에 biuret 시약 4mL를

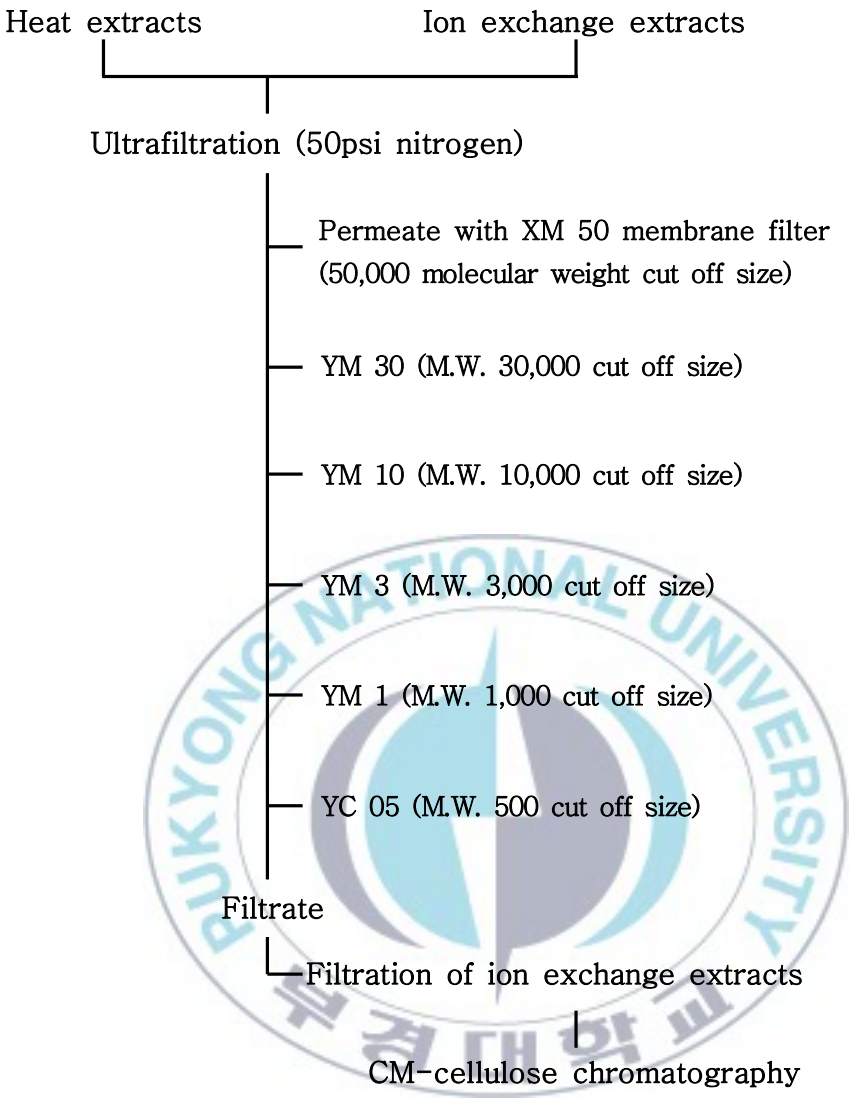

Fig. 5. Procedure of ultrafiltration of salmon anserine extracts and CM-cellulose ion exchange chromatography.

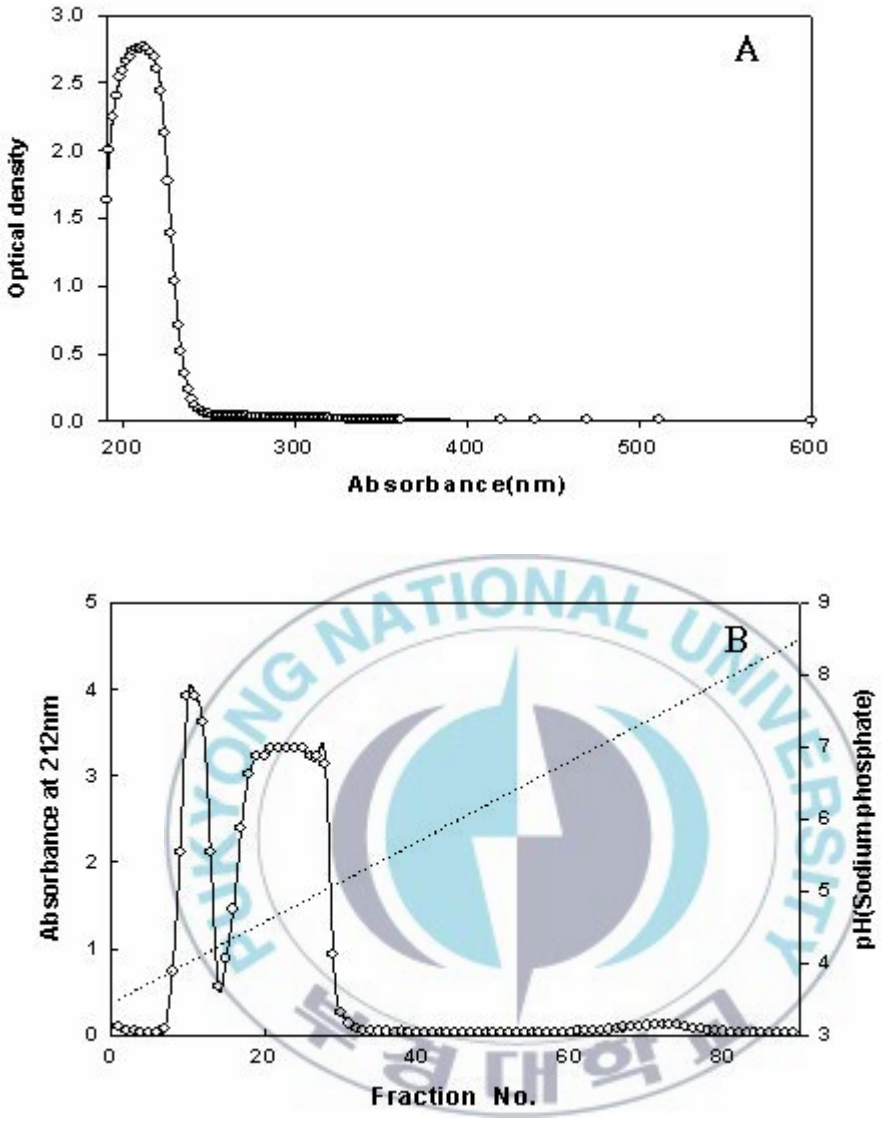

Fig. 6. CM-cellulose ion exchange chromatography of salmon anserine extracts.

A; O.D of anserine standard, B; O.D of salmon anserine extracts.

혼합하여 암소에 30분 방치시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였으며 검량식(Fig. 7)을 작성한 후 각 추출물에 따른 단백질 함량 변화를 측정하였다.

2.3.2. 총철 함량 측정

총철 함량의 측정은 Viollier et al.(2000)의 방법을 이용하여 실험하였다. 추출물 3mL에 ferrozine 용액(0.1mol/l ammonium acetate 용액을 이용하여 0.01mol/l로 제조) 300μL를 첨가하고 환원시약 (2mol HCl에 hydroxylamine hydrochloride를 1.4mol의 농도로 제조) 450μL를 가하여 교반 후 10분동안 반응시켰다. 그리고 10M ammonium acetate buffer(ammonium hydroxide 이용하여 pH 9.5조절) 150μL 첨가 후 562nm에서 흡광도를 측정하였으며 Fig. 8의 검량식에 대입함으로서 각 추출물의 총철 함량을 측정하였다.

2.3.3. Anserine 함량 측정

Anserine 함량 측정은 Charles et al.(1966)의 방법에 따라 실험하였다. 추출물 1mL에 4% $NaHCO_3$ 0.8mL와 FDNB 용액 0.2mL를 가한 후 55℃에서 30분동안 반응시키고 10N NaOH 0.1mL와 20% HCl 1mL를 혼합시켰다. 에테르 2mL를 가한 후 가온함으로서 에테르 층을 휘발시키고 430nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 anserine(Sigma Co.)을 이용하여 Fig. 9의 검량식을 작성하였으며 각 추출물에 대한 anserine 함량을 분석하였다.

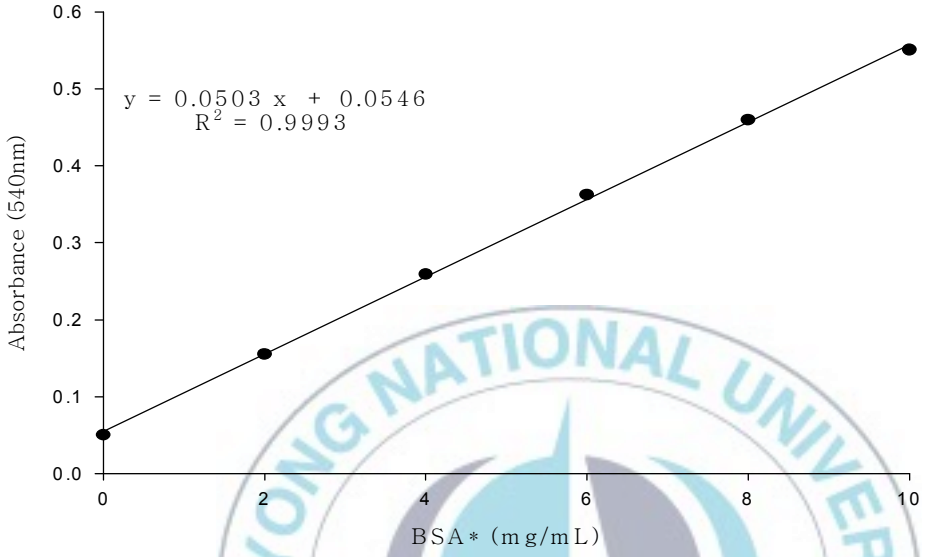

Fig. 7. Standard curve for the determination of protein concentration by biuret method.

* : Bovine serum albumin

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

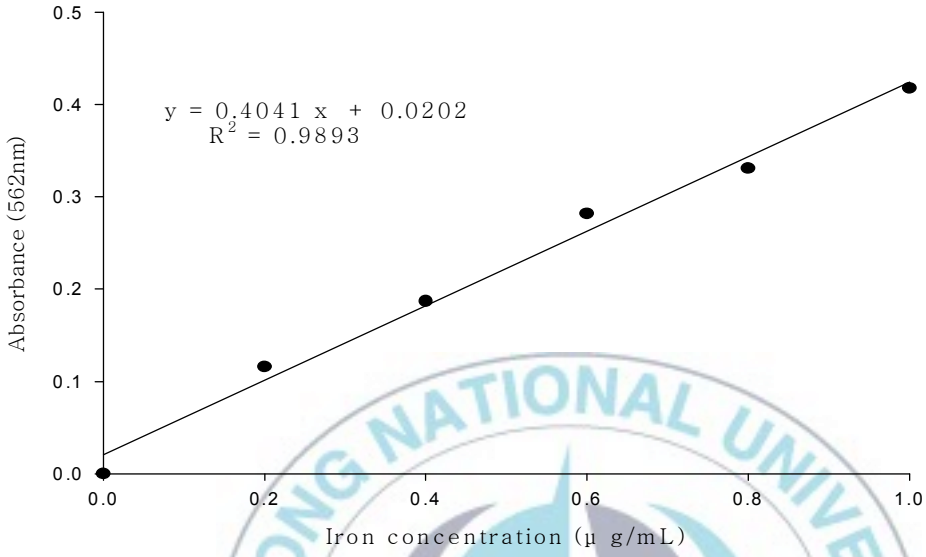

Fig. 8. Standard curve for determination of iron concentrations by ferrozine method.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

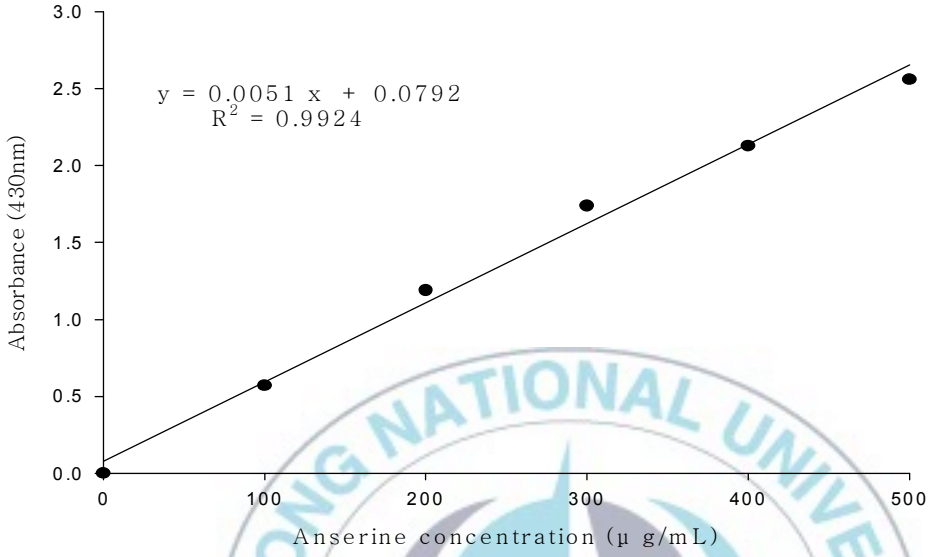

Fig. 9. Standard curve for determination of anserine concentrations.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

2.3.4. SDS-PAGE

연어 추출물 각각의 정제 정도를 알아보기 위해 SDS 전기영동을 하였다. 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 Mini-Protein 3(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 실험하였다. 20% polyacrylamide gel을 사용하였으며 시료를 각각 20μL씩 주입하고 25mM Tris-192mM glycine 완충용액(pH 8.3)을 전극액으로 사용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 SDS-gel의 염색은 Coomassie blue R-250을 사용하였으며 염색이 끝난 겔은 glacial acetic acid/MeOH/H_2O 혼합액(v/v/v=1:1:8)으로 탈색하였다.

2.3.5. HPLC 분석

각 추출조건에 따른 차이를 알아보기 위해 Song(2006)의 방법에 따라 HPLC 분석을 하였다. 추출물 25μL에 동량의 탈이온수를 첨가한 후 50μL $NaHCO_3$ buffer(100mM, pH8.3)와 4mM의 Dabsyl-Cl 용액 200μL을 혼합하여 70-72℃에서 15분 방치시켰다. 방치 후 700μL의 $NaHPO_4$ buffer (50mM, pH7.0)를 첨가하고 0.2μm membrane filter로 여과한 후 HPLC에 10μL를 주입하였다. 칼럼은 C-18(5μm, 4.6mm×25cm)을 사용하였으며 이동상 용매는 sodium acetate buffer(25mM, pH6.5)와 acetonitrile을 사용하였다. 유속은 1mL/min으로 gradient 조건은 Table 1과 같으며 칼럼의 온도는 40℃, 검출파장은 436nm로 분석하였다.

2.3.6. LC/MS를 이용한 질량분석

최종 정제한 물질을 LC/MS(API 2000, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였다. 이동상은 Water/ACN/MeOH = 35/30/35

Table 1. HPLC operation condition for anserine analysis

HPLC system	Hewlett Packard, Model 1100 series
Column	C-18 (4.6×150mm, 5μm)
Detector	UV at 436nm
Mobile phase	A : 25mM sodium acetate buffer B : acetonitrile
Temp(℃)	40℃
Flow rate	1.0mL/min
Gradient condition	
0 min	A(%) : B(%) = 85 : 15
20 min	A(%) : B(%) = 60 : 40
32 min	A(%) : B(%) = 30 : 70
34 min	A(%) : B(%) = 30 : 70
35min	A(%) : B(%) = 85 : 15

(4mM AF, pH 2.6)를 사용하였고, 컬럼은 Symmetry(150×3.9mm, 5μm, 1mL/min)를 이용하였다.

2.4. 기능성 평가

2.4.1. DPPH 라디칼 소거능

연어로부터 추출한 anserine의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능을 확인하기 위해 Wu et al.(2003)의 방법에 따라 실험하였다. 공시험구의 시료는 탈이온수를 사용하였으며 1.5mL의 각각의 시료에 0.1mM DPPH용액 1.5mL를 첨가한 후 혼합물을 교반 후 실온에서 30분간 정치시킨 후 자외선 분광계를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

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

2.4.2. 환원력

환원력은 Oyaizu(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 대조구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 시료 2mL에 0.2M phosphate buffer(pH 6.6) 2mL와 1% potassium ferricyanide 2mL를 첨가한 후 혼합물을 50℃에서 20분간 배양시키고 2mL의 10% tricholoroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가했다. 배양된 반응물 2mL에 증류수 2mL와 0.4mL의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가하여 10분후에 자외선분광계를 이용해서 700nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

2.4.3. 금속킬레이트능

Decker et al.(1990)의 방법에 따라 시료용액 1mL에 탈이온수 3.7mL을 혼합시킨 후 2mM $FeCl_2$ 0.1mL과 5mM Ferrozine 0.2mL을 넣어 반응시켜 10분 후 562nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 방법으로 계산하였다.

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

2.4.4. Superoxide dismutase 유사활성

SOD 유사활성측정은 Marklund(1974) 방법에 따라 농도별로 제조한 각 시료 0.2mL에 tris-HCl buffer(50mM tris+ 10mM EDTA, pH8.5) 3.0mL와 7.2×10^{-3}M pyrogallol 0.2mL를 가하고 25℃에서 10분간 방치 후 1N HCl(1mL)로 반응을 정지 시켜 420nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 시험용액 대신 탈이온수를 첨가하여 다음 계산식에 따라 SOD 유사활성(%)을 계산하였다.

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

A: 시험구의 흡광도　　B: 대조구의 흡광도

2.4.5. 아질산염 소거능

Gray et al.(1975)의 방법에 따라 발암성 물질인 nitrosoamine 생성의 전구체로 작용하는 아질산염의 소거능을 측정하였다. 시료 2mL에 1mM $NaNO_2$ 1mL를 넣고 0.1N HCl(pH 1.2)과 0.2M citric acid buffer로 반응 용액의 pH를 1.2, 4.2, 6.0으로 조절한 다음 반

응 용액의 부피를 10mL로 하였다. 이 용액을 37℃에서 1시간 반응시켜 얻은 반응 용개을 각각 1mL씩 취하고 2% acetic acid 5mL, Griess 시약(1% sulfanilic acid : 1% napthylamine = 1 : 1 in 30% acetic acid) 0.4mL를 가하여 잘 혼합하고 실온에서 15분간 방치 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 산출하였다.

2.4.6. 과산화물가

지방산화의 중간생성물인 과산화물가(POV)는 A.O.A.C(1995)법에 따라 측정하였다. Dong(2008)의 방법에 따라 50mM linoleic acid(95% EtOH)와 0.1M 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℃, 암소에서 7일간 저장하면서 과산화물 생성의 경시적인 변화를 측정하였다. 시험용액 1g을 취하여 유기용매(chloroform : acetic acid = 2:3) 35mL을 가하여 용해한 후 KI 포화용액 1mL를 가하여 약 1분간 강하게 진탕한 다음 5분간 암소에 방치한 후 증류수 75mL를 가하여 1분간 진탕시키고 1% 전분 용액 1mL를 지시약으로 하여 0.01N $Na_2S_2O_3$ 용액으로 적정하였다. 따로 공시험을 하여 보정하고 다음 식에 따라 과산화물가를 산출하였다.

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

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

F : Factor(≒1)　　N : Na_2SO_3의 노르말 농도

S : 시료의 양(g)

2.4.7. Thiobarbituric reactive substances 생성 억제능

TBARS는 Mitsuda(1966)와 Sidwell(1954)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 2mL에 35% TCA(trichloroacetic acid)용액 1mL와 0.75% TBA(thiobarbituriacid)시약 2mL를 가하여 혼합한 후 90℃에서 40분동안 반응시킨 다음 냉각시키고 acetic acid 1mL, chloroform 2mL을 가한 뒤 8000×g에서 3분간 원심분리하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 탈이온수로 공시험하여 보정하고 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 하여 다음 식에 따라 대조구에 대한 TBARS 생성 억제 능력(%)을 산출하였다.

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

A : 시험구의 흡광도　　B : 대조구의 흡광도

2.5. 연어 anserine의 단백질 변성 억제능 측정

2.5.1. Carbonyl group 함량 측정

단백질의 산화반응에 따른 carbonyl group의 생성율 측정은 Hipkiss (1998)의 방법에 따라 ovalbumin 10mg을 10mL의 potassium phosphate (100mM, pH7)에 용해시킨 후 일정량의 hypochlorite를 첨가하고 37℃에서 1시간동안 반응시켰으며 hypochlorite 처리한 단백질을 5% Trichloroacetic acid(TCA)로 침전시킨 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하고 침전물을 5% TCA로 2번 수세하고 일정량의 2M HCl에 다시 용해시킨 후 500μL의 10mM 2,4-DNPH를 첨가하고 37℃에서 2시간동안 반응시킨 후 동량의 2M NaOH를 첨가한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5.2. 전기영동을 통한 단백질 가교결합 형성 억제능 측정

연어로부터 추출한 anserine이 단백질 산화반응에 의해 생성되는 가교결합 및 글리케이션에 미치는 영향을 알아보기 위해 SDS 전기영동을 행하였다. 전기영동은 Mini-Protein 3(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 행하였다. 7.5% polyacrylamide gel을 사용하였으며 시료를 각각 25μL씩 well에 주입하고 25mM Tris-192mM glycine 완충용액(pH 8.3)을 전극액으로 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 SDS-gel의 염색은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였고, 염색이 끝난 겔은 glacial acetic acid/MeOH/H_2O 혼합액(v/v/v, 1:2:7)으로 탈색하였다.

3. 통계처리

실험결과의 통계처리는 SAS program을 이용하여 분산분석을 실시하였으며 조사 항목들 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법으로 $p<0.05$ 수준에서 실시하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

결과 및 고찰

1. 연어의 성분분석

1.1. 일반성분 분석

연어의 일반성분 분석결과는 Table 2와 같이 수분은 76.34±0.31%, 단백질 20.45±0.04%, 지질 3.75±1.20%, 회분 1.26±0.04%로 나타났다. 이는 한국수산물 성분표(1995)에 명시되어 있는 일반성분표와 유사한 결과를 나타냈으며 Lee(1998)의 연구결과와 수분의 경우 68.7±0.3%로 약 7%의 차이를 보였고 단백질 16.6±0.18%, 지질이 9.2±0.7%로 각각 3.85%, 5.45% 정도 차이를 나타냈으며 회분에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

1.2. 연어의 부위별 anserine 함량 분석

연어의 추출에 앞서 각 부위에 따른 anserine 함량을 분석하였다(Charles et al., 1966). 그 결과 몸통에서 5.06±0.63mg으로 가장 높게 분석되었으며 두부에서는 2.14±0.14mg, 꼬리에서는 1.70±0.23mg 함유되어 있었으며 두부와 꼬리간의 유의적인 함량 차이는 없었다(Table 3). Choi et al.(1996)은 가다랑어의 부위별 성분 분석을 한 결과 두부에 비해 몸통에 저분자 펩타이드인 histidine과 anserine, carnosine이 가장 많이 함유되어 있다고 보고하였으며 참치의 경우에도 꼬리에 비해 몸통에 anserine이 가장 많이 함유되어 있었다(Kang et al., 2000). 따라서 본 실험에서는 효율적인 anserine의 추출공정을 위하여 연어의 몸통 부위를 사용하였으며 몸통 외의 두부와 꼬리에 anserine의 존재를 확인함으로서 비록 anserine의 함량은 낮으나 연어 부산물이 anserine 추출용 시료로서 사용 가능할 것이라고 사료된다.

Table 2. Proximate composition of chum salmon

Ingredient	Content (%)
Moisture	76.34 ± 0.31*
Crude protein	20.45 ± 0.04
Crude lipid	3.75 ± 1.20
Crude ash	1.26 ± 0.04

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

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Table 3. Anserine contents in part of chum salmon

	Content (mg/mL)
Head	2.14±0.14[b*]
Body	5.06±0.63[a]
Tail	1.70±0.23[b]

* Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3).
Means within a measurement with different letters were significantly different(p <0.05).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

1.3. 유리아미노산 분석

연어육의 유리아미노산 조성은 Table 4와 같이 모두 33성분이 검출되었으며 총량은 2485.91mg으로 분석되어졌다. 각각의 유리아미노산을 살펴보면 anserine, lysine, alanine, leucine, taurine, glutamic acid 등의 순으로 많이 함유되어 있었다. 그 중에서도 anserine이 전체 유리아미노산의 약 43.06%를 차지하였으며 histidine과 carnosine은 각각 1.58%, 0.11% 함유되어 있었다. 따라서 히스티딘계 저분자 펩타이드 중 histidine과 carnosine의 함량은 낮으면서 상대적으로 anserine의 함량이 높으므로 anserine 추출용 시료로서 연어가 적합하다고 판단된다.

연어류의 근육에서 anserine이 풍부한 것은 Luckton et al.(1958)이 이미 지적한 바 있으며 Park et al.(1996)의 연구에서는 본 연구와 같은 종의 한국산 연어(*O. keta*)의 유리아미노산을 분석한 결과 724~1242mg으로 유사한 결과를 나타냈다.

Anserine은 수산 동물에서 연어 이외에도 다랑어류, 상어류, 고래류에도 많이 분포하는 것으로 알려져 있으며(Suyama et al., 1970) 육상동물 중에는 쥐, 토끼, 닭에 많이 함유되어 있다(Davey, 1960)고 보고되어 져 있다.

2. 추출조건 및 한외여과를 통한 분자량 조절에 따른 함량 변화

본 실험에서는 연어로부터의 anserine 추출을 위하여 가열처리 공정과 이온교환처리, 그리고 한외여과법을 병행하여 사용하였다. Bussayarat et al.(2005)은 추출물 중에 존재하는 총철과 총철함유 단백질과 같은 산화촉진 물질이 항산화능력에 영향을 미친다고 하였으며 이를 감소시키면서 저분자 펩타이드의 함량을 높일 수 있는 방법이 필요하다고 하였다. 이에

Table 4. Composition of free amino acids in chum salmon muscle

	Content(mg/100g)
O-Phosphoserine	5.24
Taurine	94.58
L-Threonine	53.15
L-Serine	68.47
L-Glutamic acid	90.50
L-Proline	54.52
Glycine	54.45
L-Alanine	130.75
L-Citrulline	11.68
DL-3-Aminoisobutyric acid	4.39
L-Valine	67.62
L-Cystine	9.13
L-Methionine	52.37
Cystathionine	7.83
L-Isoleucine	61.40
L-Leucine	124.34
L-Tyrosine	58.76
β-Alnaine	3.77
L-Phenylalanine	72.70
Urea	19.82
2-Aminoethanol	2.00
L-Aspartic acid	67.09
L-Ornithine	6.37
L-Lysine	153.68
L-Histidine	39.29
L-Anserine	1070.51
L-Carnosine	2.68
L-Arginine	76.12
o-Phosphoethanolamine	1.40
L-2-Aminoadipic acid	7.26
DL-2-Aminobutyric acid	6.98
4-Aminobutyric acid	1.67
DL-plus-allo-δ-Hydroxylysine	5.37
Total	2485.91

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Gopalakrishnan et al.(1999)은 가열처리와 한외여과를 통해 분자량을 조절함으로서 불용성 물질 및 단백질과 총철을 제거할 수 있다고 하였으며 Chan et al.(1993)은 이온교환을 통해서 불순물을 제거할 수 있다고 보고하였다. 그러나 지금까지 보고된 연구들은 각각 가열처리, 한외여과, 이온교환처리를 하여 그에 따른 함량 차이를 비교하였으나 본 실험에서는 가열처리와 한외여과를 통한 분자량 조절 및 이온교환처리를 병행함으로서 그에 따른 함량변화를 살펴보고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 각각 60℃, 80℃, 100℃에서의 가열처리와 이온교환, 한외여과를 이용하였으며 추출방법에 따른 단백질, 총철, anserine의 함량변화를 조사하였다.

2.1. 가열처리

가열처리에 따른 추출물의 단백질, 총철, anserine의 함량변화는 Table 5와 같다. 비가열처리구의 경우 단백질 함량, 총철함량과 anserine 함량이 각각 23.64±0.21 mg/mL, 16.20±0.09 μg/mL, 5.47±0.22 mg/mL이며 60℃ 가열처리구는 7.40±0.39 mg/mL, 2.32±0.02 μg/mL, 5.20±0.63 mg/mL, 80℃는 7.64 mg/mL, 1.20±0.12 μg/mL, 5.11±0.15 mg/mL, 100℃ 가열처리구는 7.04±0.28 mg/mL, 0.68±0.02 μg/mL, 4.04±0.31 mg/mL로 나타났다. 비가열처리구에 비해 60℃, 80℃, 100℃ 가열처리구의 단백질 함량이 각각 약 69%, 69%, 71%정도 감소되었으며 총철 함량은 약 86%, 92%, 96% 정도 감소되었다. 그리고 anserine 함량의 경우 비가열처리구에 비해 60℃와 80℃ 가열처리구가 약 7%정도 감소하였으나 80℃의 경우 비가열처리구와 유의적으로 큰 차이는 없었으며 100℃ 가열처리구는 anserine의 함량이 26% 정도 감소되는 것으로 분석되어졌다. 각 온도대에서 가열처리한 결과 100℃ 가열처리구가 총철과 단백질 등 불순물 제거

Table 5. Effects of heat treatment and permeate of ultrafiltration (UFP) on protein, iron and anserine contents in salmon extracts

Treatments	Contents		
	Protein(mg/mL)	Iron(μg/mL)	Anserine(mg/mL)
Unheated	23.64±0.21^{a*}	16.20±0.09^{a}	5.47±0.22^{a}
Unheated-1	6.00±0.64^{d}	2.94±0.06^{b}	4.46±0.26^{defg}
Unheated-2	5.42±0.13^{de}	1.60±0.07^{l}	4.35±0.56^{efg}
Unheated-3	5.22±0.12^{ef}	0.64±0.02^{gh}	4.32±0.32^{fg}
Unheated-4	4.46±0.04^{f}	0.42±0.03^{jkl}	3.09±0.08^{l}
60℃	7.40±0.39^{bc}	2.32±0.02^{c}	5.20±0.63^{defg}
60℃-1	7.50±0.23^{b}	0.48±0.02^{ijk}	4.93±0.56^{bcd}
60℃-2	5.40±0.44^{de}	0.50±0.05^{ijk}	4.67±0.60^{cdef}
60℃-3	4.98±0.28^{ef}	0.34±0.01^{l}	4.16±0.57^{gh}
60℃-4	5.16±0.31^{ef}	0.34±0.02^{m}	2.58±0.52^{j}
80℃	7.64±0.04^{b}	1.20±0.12^{e}	5.21±0.15^{ab}
80℃-1	6.76±0.20^{c}	0.94±0.02^{f}	4.15±0.21^{fg}
80℃-2	6.78±0.29^{c}	0.74±0.03^{g}	4.86±0.50^{bcde}
80℃-3	4.98±0.09^{ef}	0.52±0.02^{ij}	4.03±0.34^{gh}
80℃-4	4.48±0.28^{f}	0.30±0.01^{m}	3.26±0.24^{l}
100℃	7.04±0.28^{bc}	0.68±0.02^{gh}	4.04±0.31^{gh}
100℃-1	5.40±0.48^{de}	0.58±0.01^{hi}	5.22±0.28^{ab}
100℃-2	6.06±0.04^{d}	0.42±0.02^{jkl}	4.51±0.35^{defg}
100℃-3	4.68±0.07^{ef}	0.40±0.01^{kl}	3.78±0.28^{h}
100℃-4	4.68±0.22^{ef}	0.14±0.01^{m}	2.49±0.24^{j}

* Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3).
Means within a measurement with different letters were significantly different(p <0.05).

Untreated : represent the sample without heated treatment and water extract.
60℃, 80℃, 100℃ : represent the sample which had been water extracted by heating to 60, 80, 100℃ for 15 minutes.
UFP : Ultrafiltration permeated.
1 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 30000<)
2 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 10000<)
3 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 3000<)
4 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 500<)

에 가장 효과적이었으나 60℃, 80℃ 가열처리구에 비해 anserine 함량의 감소가 큰 것으로 나타났다. Igene et al.(1979)과 Chen et al.(1984)은 쇠고기육 추출물을 가열할 경우 총철 제거에 효과적이라 보고하였으며 Chan et al.(1993)은 60℃, 100℃ 가열처리구가 비가열처리구에 비해 총철 함량을 감소시켰다고 하였으며 Gopalakrishnan et al.(1999)또한 가열처리를 함으로서 단백질과 총철을 감소시켰다고 보고하였으며 이는 본 실험결과와 유사한 결과를 나타냈다.

2.2. 한외여과처리

가열처리 추출물의 공정을 개선하기 위하여 단계별로 한외여과처리를 함으로서 분자량을 조절하였으며 각 추출물의 단백질, 총철, anserine의 함량변화를 측정하였다(Table 5). 단계적으로 한외여과를 한 추출물이 가열처리 추출물에 비해 단백질과 총철 함량이 감소되는 경향을 나타냈으며 비가열처리구의 경우 한외여과를 함으로써 단백질의 함량이 약 81% 감소되었다. 60℃, 80℃, 100℃ 가열 및 한외여과 처리구는 가열처리구에 비해 각각 31%, 41%, 33% 정도의 단백질 함량의 감소를 나타냈다. 비가열 및 한외여과 처리구는 약 97% 정도의 총철 함량 감소를 나타냈으며 60℃, 80℃, 100℃ 한외여과 처리구에서도 한외여과를 통한 총철 함량의 감소를 확인할 수 있었다. Anserine 함량의 경우 비가열 한외여과 처리구는 약 43%의 감소를 나타냈으며 60℃, 80℃, 100℃ 가열 및 한외여과 처리구의 경우 각각 50%, 36%, 39% 정도 감소하였다. 이는 한외여과시 단백질과 같은 고분자 물질들이 anserine과 같은 저분자 물질의 여과막 통과를 방해한 것이라 생각되며 Chan et al.(1993)은 쇠고기를 이용하여 carnosine 추출시 한외여과를 행하였을 때 무처리 추출물에 비해 28% 정도 감소하였다고 하였으며 Gopalakrishnan et al.(1999)도 한외여

과 처리시 약 42% 감소하였다고 보고한 논문을 통해 본 실험과 유사한 경향을 확인하였다.

2.3. 이온교환 및 한외여과처리

이온교환법을 이용한 추출물 중의 단백질, 총철, anserine의 함량을 조사한 결과는 Table 6에 나타냈다. Dowex 1×8 수지를 이용하여 1차 이온교환을 하고 이온교환한 추출물을 이용하여 M.w 500까지 한외여과 처리를 한 후 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 행하였다. 1차 이온교환을 한 결과 단백질, 총철, anserine 함량이 각각 7.30±0.26 mg/mL, 0.46±0.01 μg/mL, 6.38±0.31 mg/mL로 분석되었다. 단백질, 총철 함량의 경우 비가열 처리구에 비해 약 69%, 98% 감소하였으나 anserine 함량의 경우 약 17% 증가하였으며 60℃, 80℃, 100℃ 가열처리구에 비해 단백질 함량은 큰 차이가 없었으나 총철 함량의 경우 80%, 61%, 32% 감소하였으며 anserine 함량은 22%, 20%, 57%의 증가를 나타냈다. 이온교환 처리한 추출물을 한외여과 했을시 단백질, 총철, anserine 함량은 각각 46%, 91%, 34% 감소하였는데 이는 비가열처리구와 가열처리구에 비해 낮은 단백질, 총철함량을 나타낸 반면 anserine 함량은 가장 높은 수치를 나타냈다. CM-cellolose를 이용한 2차 이온교환 추출물은 1차 이온교환 및 한외여과 처리 추출물에 비해 총철함량과 단백질 함량이 약 28%, 70% 낮아졌으며 anserine 함량은 약 12% 정도 감소하였으나 비가열처리나 가열처리 및 한외여과 추출물에 비해 anserine 함량이 상대적으로 높은 수준이었다. 따라서 비가열처리 추출물과 가열처리 및 한외여과 추출물에 비해 이온교환 및 한외여과 추출물이 불순물의 함량은 낮추면서 상대적으로 anserine의 함량을 높일 수 있는 추출방법이라 사료된다.

Table 6. Effects of ion exchange(IEC) and permeate of ultra-filtration(UFP) on protein, iron and anserine contents in salmon extracts

Treatments	Contents		
	Protein(mg/mL)	Iron(μg/mL)	Anserine(mg/mL)
IEC-A	7.30±0.26^{a*}	0.46±0.01^{a}	6.38±0.31^{a}
IEC-A-1	6.78±0.16^{b}	0.40±0.01^{b}	6.19±0.79^{a}
IEC-A-2	5.34±0.17^{c}	0.40±0.01^{b}	4.61±0.87^{b}
IEC-A-3	5.01±0.20^{d}	0.22±0.01^{c}	3.35±0.25^{d}
IEC-A-4	4.74±0.06^{e}	0.14±0.01^{d}	4.22±0.09^{bc}
IEC-B	3.90±0.11^{f}	0.04±0.01^{e}	3.72±0.21^{c}

* Data are expressed as meant ± standard derivation(n=3).
Means within a measurement with different letters were significantly different(p <0.05).
IEC : Ion exchange chromatography treated.
UFP : Ultrafiltration permeated.
A : Primary ion exchange chromatography(Dowex 1×8) treated.
1 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 30000<)
2 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 10000<)
3 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 3000<)
4 : Ultrafiltration (molecular weight cut off 500<)
B : Secondary ion exchange chromatography(CM-cellulose) treated.

2.4. SDS-PAGE에 의한 추출물의 분자량 확인

각 추출물의 전기영동 실험결과는 Fig. 10에 나타내었다. 비가열처리 추출물의 경우 205kDa~6.5kDa 사이에 많은 밴드가 관찰된 반면 가열처리 추출물과 한외여과 추출물의 경우 비가열처리 추출물에서 관찰되었던 밴드가 제거됨으로서 고분자량 물질이 제거된 결과를 나타냈다. 100℃ 가열 추출물에서는 6.5kDa 이하의 peptide들이 관찰되었으나 한외여과 처리 추출물에서는 밴드가 제거됨으로서 불순물의 감소를 확인할 수 있었으며 1차 이온교환 및 한외여과 처리, 2차 이온교환 처리 추출물 또한 다른 추출물에 비해 고분자량 물질이 제거된 것으로 나타났다. 즉, 전기영동 결과 비가열처리에 비해 가열처리 및 한외여과, 이온교환 처리 추출물의 밴드가 많이 감소된 것으로 보아 단백질 등의 불순물이 제거된 것을 확인할 수 있었으며 그 중에서도 이온교환과 한외여과를 병행한 추출물과 2차 이온교환 처리추출물이 가장 효과적인 방법이라 사료된다.

2.5. 기기분석을 통한 추출물의 정성분석

기기분석을 통한 추출방법 간의 차이를 비교한 결과는 다음과 같다. 먼저 HPLC를 이용하여 각 추출 조건에 따른 변화를 Fig. 11, 12.에 나타냈다. HPLC 분석 결과 표준물질인 합성 anserine의 peak는 13분대에 나타났다. 비가열처리와 가열처리 및 한외여과 처리 추출물에서 모두 13분대에 합성 anserine과 동일한 peak가 확인되었으나 다른 peak들이 15~19분대 영역에 나타난 것으로 분석되었다. 60, 80, 100℃에서 가열 후 한외여과 처리한 추출물이 비가열 추출물에 비해 peak가 감소되는 경향을 나타냈는데 이는 단백질 잔여물의 감소에 의한 것으로 생각된다. Dowex 1×8을 이용하여 1차 이온교환 처리한 추출물 또한 13분대에 anserine peak가 확인되었으며 15분대에 다른 peak가 관찰되었다. 15분대 영역의 다른 peak들은

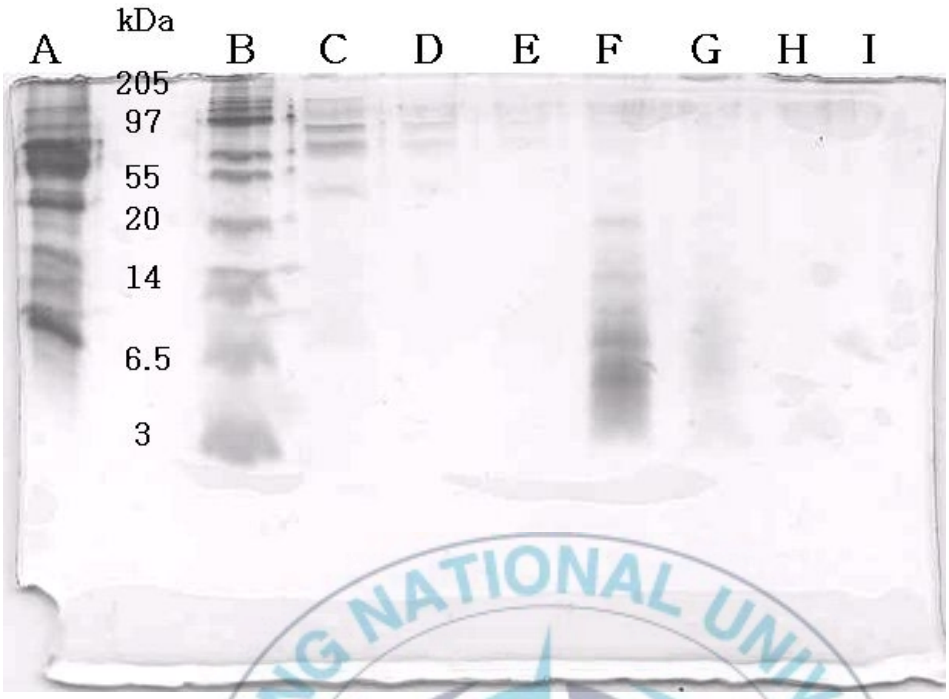

Fig. 10. SDS-PAGE patterns of each purification step of salmon extracts.

A, water extract; lane 1, B, molecular weight marker; lane 2, C, water extracted and ultrafiltration permeation(UFP) 500 cut off; lane 3, D, water extracted by heating to 60℃ and UFP 500 cut off; lane 4, E, water extracted by heating to 80℃ and UFP 500 cut off; lane 5, F, water extracted by heating to 100℃; lane 6, G, water extraced by heating to 100℃ and UFP 500 cut off; lane 7, H, Ion exchange chromatography treated with dowex 1×8 and UFP 500 cut off; lane 8, I, CM-cellulose ion exchange chromatography treated.

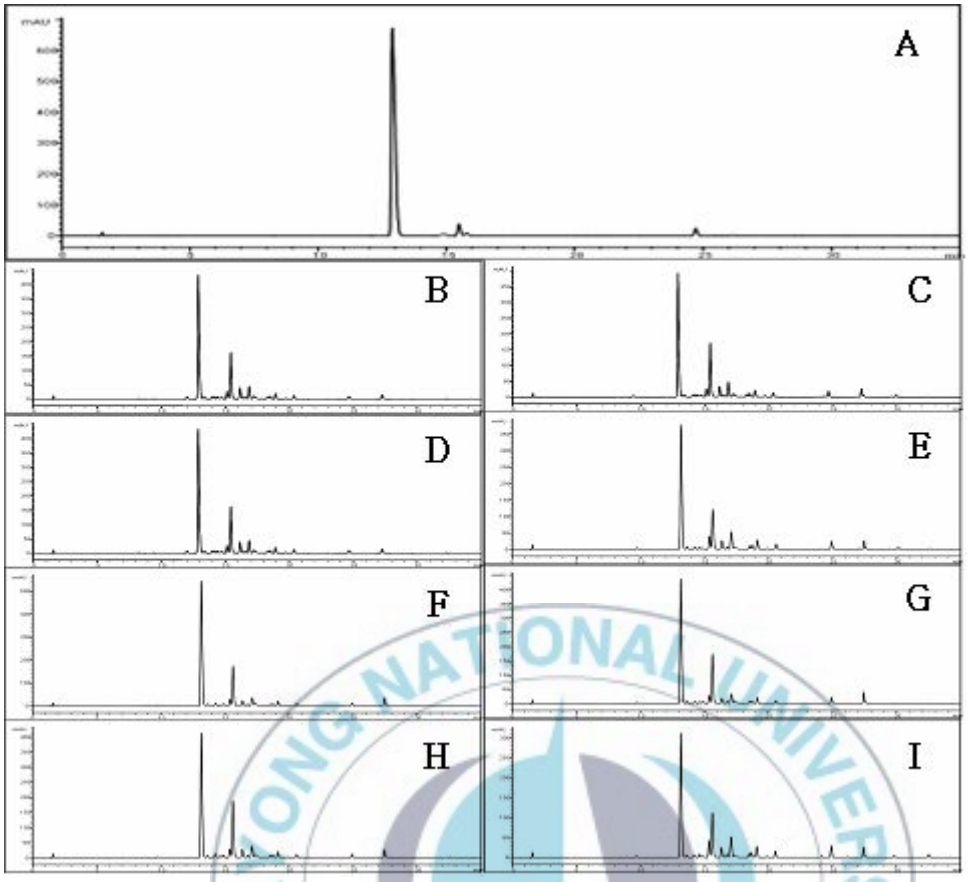

Fig. 11. HPLC chromatogram of salmon extracts

A, standard anserine; B, represent the sample without heated treatment; C, represent the sample without heated treatment and permeate ultrafiltration(UFP); D, represent the sample which had been extracted by heating to 60℃ for 15min; E, represent the sample which had been extracted by heating to 60℃ for 15min and UFP; F, represent the sample which had been extracted by heating to 80℃ for 15min; G, represent the sample which had been extracted by heating to 80℃ for 15min and UFP; H, represent the sample which had been extracted by heating to 100℃ for 15min; I, represent the sample which had been extracted by heating to 100℃ for 15min and UFP.

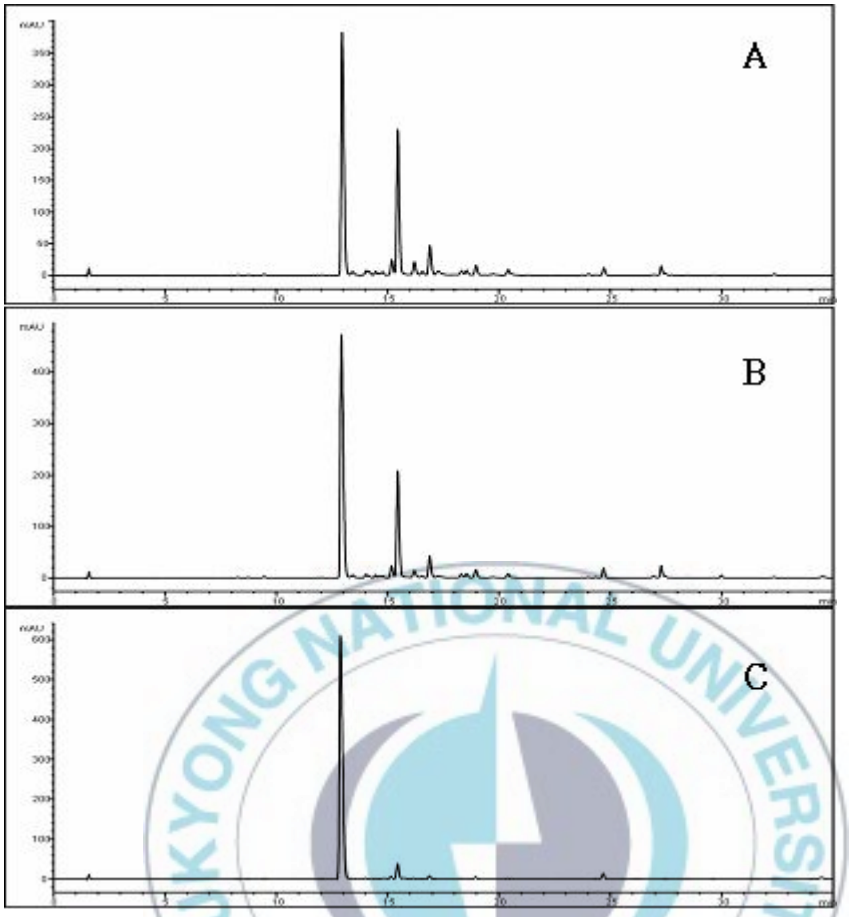

Fig. 12. HPLC chromatogram of salmon extracts

A, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(Dowex 1×8); B, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(Dowex 1×8) and UFP; C, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(CM-cellulose).

한외여과를 함으로서 감소되는 경향을 나타냈으나 크게 감소되지는 않았다. 그리고 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환한 추출물에서는 1차 이온교환에 비해 단백질 잔여물 제거 효과가 높았으며 anserine peak 외에 15분대에 관찰됐었던 peak가 제거되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 anserine 추출방법으로는 단순한 가열처리보다는 가열처리와 한외여과처리를 병행하는 것이 좋고, 1차 이온교환 처리 후 한외여과 및 2차 이온교환을 행하는 것이 단백질 잔여물을 가장 효과적으로 제거하면서 깨끗한 peak를 얻을 수 있는 추출방법이라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 1차 이온교환 및 한외여과 처리 후 2차 이온 교환시킨 추출물을 이용하여 제조한 시료를 각종 기능성 평가 실험에 사용하였다. 연어로부터 추출한 anserine이 표준물질인 합성 anserine과 동일 물질인지를 확인하기 위하여 질량분석기(LC/MS)로 분석한 결과는 다음과 같다. LC/MS를 이용하여 표준물질 anserine과 본 실험에서 추출한 anserine의 분자량을 확인한 결과(Fig. 13, 14.) 두 시료 모두 동일한 분자량(M.w 240)을 가진 물질임이 확인되었다.

3. 기능성 평가

3.1. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼은 분자 내에 유리기를 함유하여 다른 자유기들과 결합하여 안정한 복합체를 만들 수 있으며 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 유리기를 소거하게 된다. 즉 DPPH 라디칼은 보라색을 띠는데 항산화물질로부터 수소를 공여 받게 되면 노란색으로 변하고 그 환원된 정도를 측정하여 항산화능을 계산하게 된다(Carla et al., 2000). 이러한 DPPH 라디칼 소거능은 다양한 천연물의 자유 라디칼 소거능 측정에 많이 이용되고 있다. 각 연어 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 7에 나타냈다. 대조구로는 시중에서 판매되고 있는 합성 anserine과 anserine을 이

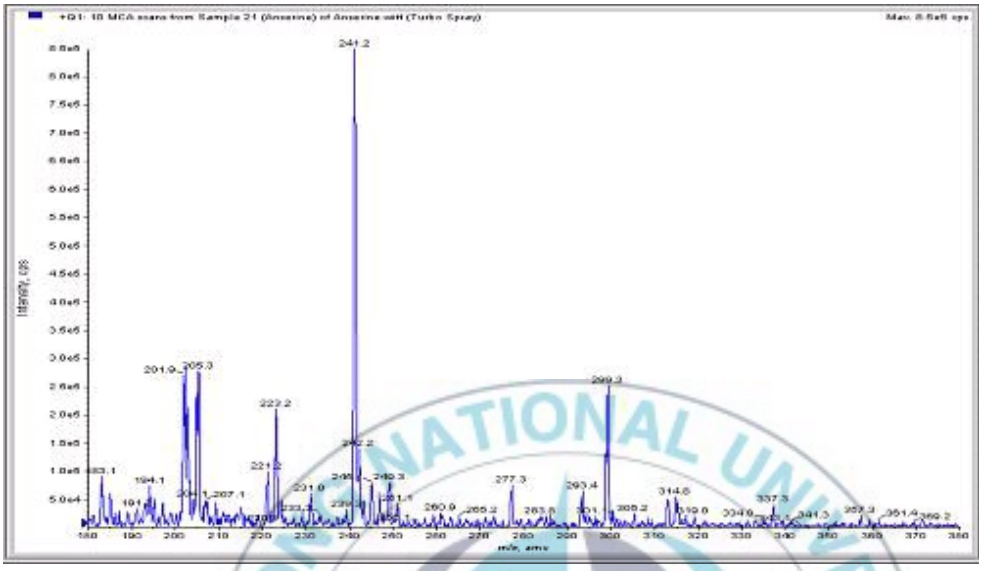

Fig. 13. LC/MS chromatogram of anserine standard.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

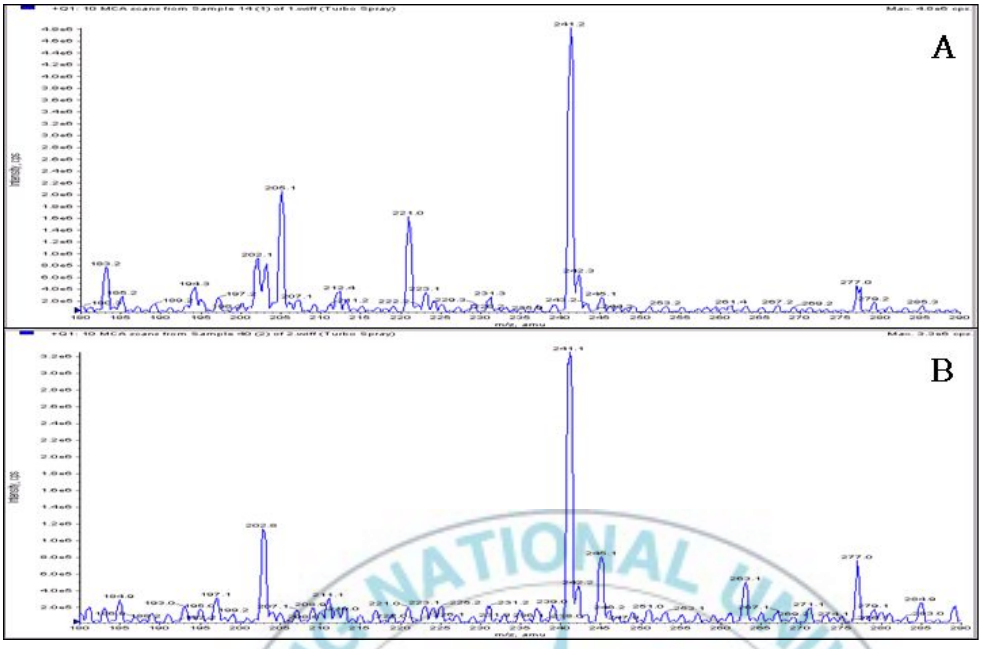

Fig. 14. LC/MS chromatogram of salmon anserine

A, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(Dowex 1×8) and UFP; B, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography(CM-cellulose).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Table 7. Scavenging activity(%)* of free amino acids, antioxidants, anserine and freeze dried salmon anserine on 0.2mM 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.

루는 β-alanine, 1-methylhistidine, 항산화제로는 ascorbic acid, BHT를 사용하였으며 1차 이온교환 및 한외여과 처리 후 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환 처리한 추출물을 이용하여 실험하였다. 그 결과 모든 실험구에서 농도 증가에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며 taurine 과 β-alanine의 경우 0.5mg/mL, 1mg/mL의 농도에서는 라디칼 소거능이 나타나지 않았으나 그 이상의 농도에서 약간의 라다칼 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, 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 있다(Son et al., 1995). 최근에는 ESR 연구를 통해 anserine의 hydroxyl radical 불활성화 능력이 확인된 바 있다(Kazuaki et al., 2004). 이러한 anserine의 전자공여능은 식품 중에서는 지방산화억제를 위한 목적으로 인체 중에서는 노화를 억제시키는 작용으로 이용될 가능성을 제시한다.

3.2. 환원력

일반적으로 환원력은 산화된 물질을 다시 환원시키는 능력을 말하며 항산화활성이 있는 물질의 환원물이 Fe^{3+}/ferricyanide 복합체를 ferrous형태로 환원시켜 나타난 색의 정도를 700nm에서 측정하는 원리(Qi et al., 2006)로 흡광도 수치가 높을수록 높은 환원력을 가진다(Gordon, 1990). 연어 추출 anserine이 환원력을 가지는지 확인하기 위해 각각의 대조구와 추출물의 환

원력을 측정하였으며 그 결과는 Table 8과 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 et al.(2003)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.

3.3. 금속 킬레이트능

철은 호흡과 산소 운반, 그리고 여러 효소 활성에 꼭 필요한 성분이나 전이금속으로 원자의 최외각 껍질에서 불안전 양이온을 만들며 극도로 반응성이 높다. 생체 내에서 $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$ 와 같은 Fenton 반응을 통해 세포의 지질 및 단백질 산화를 촉매하고 식품의 가공 및 저장 중에 지방질의 산화를 촉매시킨다(Decker et al., 1992). 산화를 촉진시키는 금속과 결합해 고리를 형성하여 금속을 봉쇄하는 것은 항산화 매카니즘 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 9). 또한 anserine과 ascorbic aicd, 연어 추출 anserine인 IEC-B의 금속 킬레이트능은 유의적인 차이가 없었으며 taurine, β-ala-

Table 8. 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^{e*}	0.029±0.002^{e}	0.028±0.001^{e}	0.029±0.002^{e}	0.032±0.001^{e}
β-Alanine	0.023±0.002^{e}	0.026±0.001^{e}	0.028±0.002^{e}	0.028±0.003^{e}	0.028±0.002^{e}
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 700nm. 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 9. 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^{g*}	2.71±0.34^{f}	4.76±0.65^{f}	7.10±0.34^{g}	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 [{1-(Blank absorbance/Sample absorbance)}/ Blank absorbance]×100%.

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

nine, 1-methylhistidine에 비해 높은 킬레이트능을 나타냈다.
Stoch et al(1995)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.

3.4. Superoxide dismutase 유사활성

SOD는 superoxide radical(O_2^-)을 산소로 산화시키는($O_2^{\cdot -} + HO_2 \cdot \rightarrow 3O_2 + H_2O_2$) 천연항산화제로 알려져 있으며 산소를 소비하는 기관에 존재하면서 superoxide anion radical의 손상효과를 보호하는 역할을 수행한다(Pokorny et al., 2001). 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물, 그리고 6가지 비교구를 대상으로 농도별 SOD 유사활성을 조사한 결과는 Table 10과 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. Kim(2003)의 연구에서 또한 anserine, carnosine, homocarnosine이 BHT나 ascorbic acid보다 SOD유사활성이 낮게 나타났지만 α-tocopherol, erythrobic 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.

Table 10. 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 [{1-(Blank absorbance/Sample absorbance)}/ Blank absorbance]×100%.

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

3.5. 과산화물가

합성 anserine, 연어 추출물 그리고 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 과산화물가를 측정하였다(Fig. 15). 그 결과, 저장 기간동안 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 et al.(2003)과 Boldyrev et al.(1995)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% 감소시킴으로써 천연항산화제로서 이용이 가능할 것이라 사료된다.

3.6. Thiobarbituric reactive substaces 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(Thio-barbituric acid reactive substance)라고 표현하며 지방 과산화억제와 관련된 많은 연구에서 여러 가지 시스템으로부터 TBARS 측정결과를 활용한 예가 많이 있다(Pokorny et al., 2001).

합성 anserine과 연어 추출물, 그리고 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 TBARS 생성 변화를 Fig. 16에 나타냈다. BHT 첨가구가 가장 낮은 증가를 나타냈으며 Control에 비해 합성 anserine, IEC-B 추출물이 TBARS 생성을 억제시켰으며 그 효과는 유사하였다. 이러한 현상에 대해 Laleye et al.(1984)은 저장 초기 지방산화에 의해 malonaldehyde(MA)가 다량

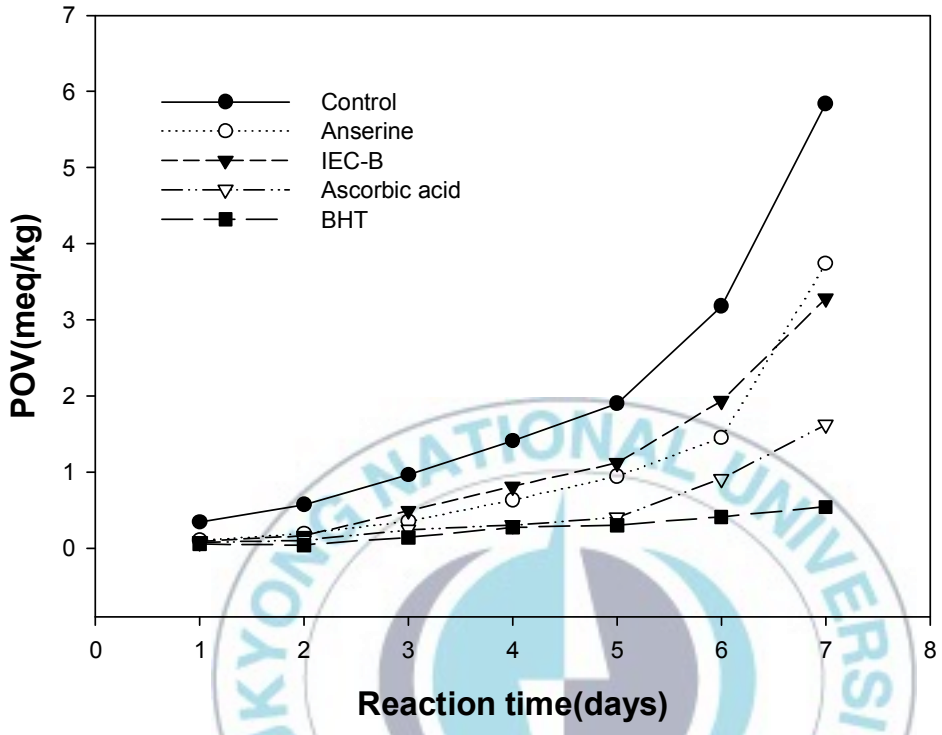

Fig. 15. Effects of anserine, freeze dried salmon anserine, ascorbic acid and BHT on peroxide value of linoleic acid stored at 50℃ for 7days.

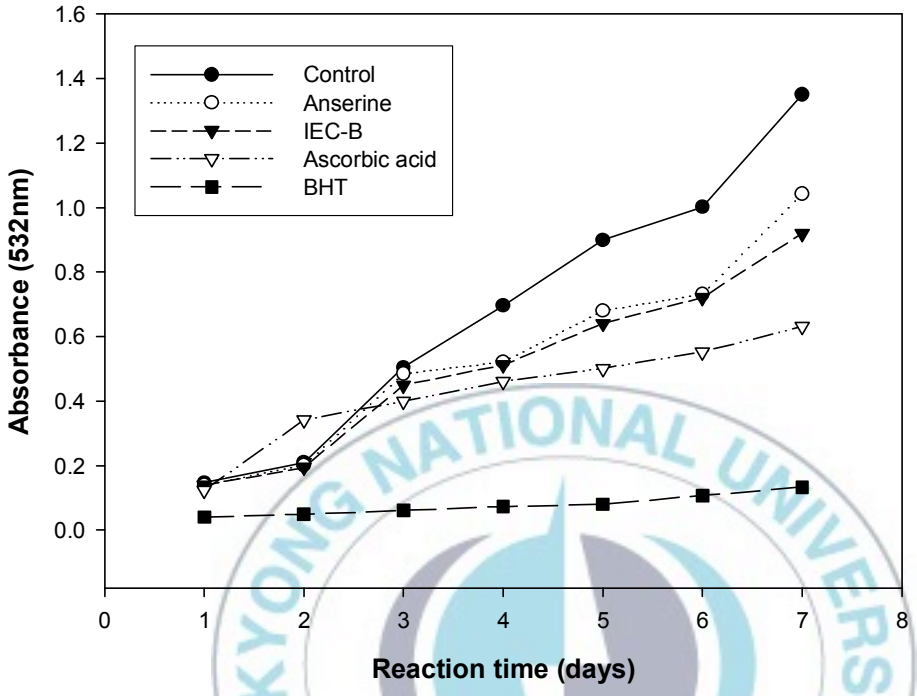

Fig. 16. Effects of anserine, freeze dried salmon anserine, ascorbic acid and BHT on TBARS(absorbance) of linoleic acid stored at 50℃ for 7days.

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.

3.7. 아질산염 소거능

여러 가지 화학물질은 생체 내에서 산화적 대사과정을 거치면서 활성화되어 변이원성이나 발암성을 나타내는 경우가 많다(Chaudiere et al., 1999). 아질산염은 단백질 식품이나 의약품 등에 존재하는 아민류와 반응하여 니트로사민이 생성되는데 이 니트로사민도 발암성을 띠는 물질 중 하나로 생체 내 산화 효소에 의해 활성화되면 diazoalkane으로 전환되고 이것이 alkonium ion을 생성하여 단백질이나 DNA에 알킬화를 일으켜 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Brown et al,, 1981). 본 실험에서는 pH 1.2, pH 4.2, pH 6.0으로 조절하여 pH 변화에 따른 아질산염에 대한 소거능을 살펴보았다. 대조구로는 합성 anserine과 1-methylhistidine, ascorbic acid, BHT를 사용하였으며 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물과 각 대조구들을 측정한 결과는 Fig. 17과 같다. 먼저 모든 pH 조건에서 아질산염 소거능은 pH가 낮을수록 높은 소거능을 나타냈다. pH 1.2 조건하에서 ascorbic acid가 가장 높은 소거능을 나타냈으며 anserine의 경우 농도 증가에 따라 14.48~30.04%의 소거능을 나타냈다. IEC-B 추출물은 13.98~29.27%로 anserine과 유의적으로 동일한 소거능을 나타냈다. pH 4.2 영역에서는 전체적으로 pH 1.2에서보다 아질산염 소거능이 낮아졌으며 pH 6.0에서 또한 소거능이 감소하여 결과적으로 pH

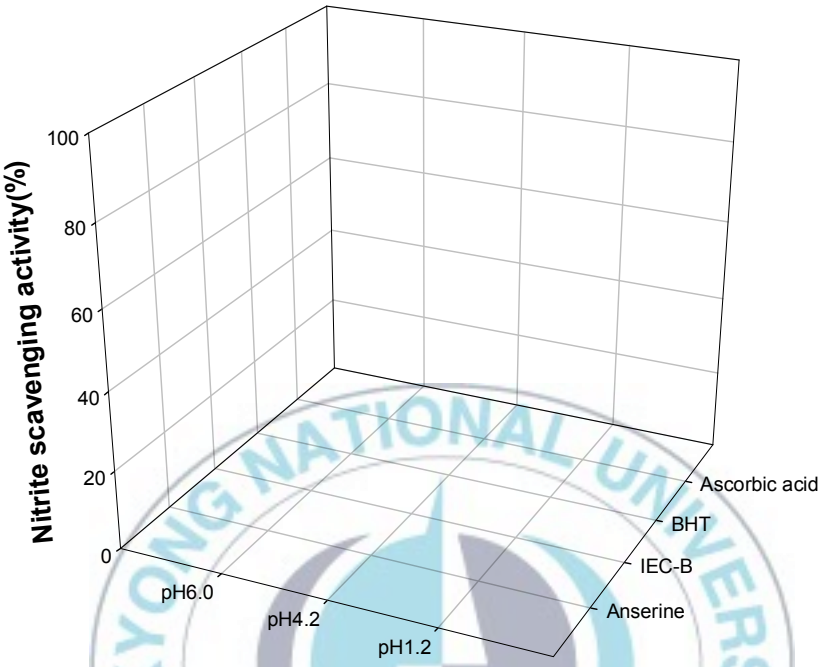

Fig. 17. Nitrite scavenging effect of the anserine, methylhistidine and freeze dried salmon.

1.2 조건에서 아질산염 소거능이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 김(2003)과 Kang et al.(1995)에 의하면 여러 pH 조건에서 아질산염 소거능을 실험한 결과 pH가 낮을수록 높은 소거능을 나타냈다고 했으며 이는 본 실험결과와 유사한 경향을 나타냈다. 이러한 결과를 볼 때 아질산염 소거작용은 pH 조건과 관련을 갖는 것으로 생각된다. 아질산염과 식품 중에 존재하는 amine류와 반응하여 생긴 발암성 물질인 nitrosamine은 낮은 pH 조건에서 쉽게 반응하는 것으로 알려져 있는데 합성 anserine과 연어 추출 anserine이 인체 내 위의 pH 영역인 산성영역에서 가장 높은 소거능을 나타냄으로서 체내에서도 효과적으로 아질산염 소거작용을 통해 nitrosamine 생성을 억제할 수 있을 것이라 사료된다.

4. 연어 추출 anserine이 단백질 변성에 미치는 영향

산소 유리라디칼은 노화 및 노화 관련 질병의 진행과 개시에 있어 주된 역할을 한다. Hipkiss et al.(1998)에 의하면 산소 유리라디칼에 의해 생성된 hypochlorite anion은 carbonyl group을 생성시키며 crystallin, ovalbumin, bovine serum albumin(BSA)과 가교결합을 일으켜 고분자량의 물질 형성을 야기시킨다고 보고되어져 있으며 단백질 산화와 glycation (non-enzymatic glycosylation), 그리고 이러한 변성된 단백질의 축적은 일반적으로 많은 조직과 세포 내에서 질병 및 노화와 관련된 비가역적 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Stadtman, 1992). 지금까지 보고된 hypochlorite에 의한 단백질 변성에서의 carnosine 효과에 대한 많은 연구를 통해 histidine 함유 디펩타이드가 단백질 변성으로 인한 질병을 치유하는데 잠재적인 가능성이 있다고 하였다(Hipkiss et al., 2001). 본 실험에서는 연어에서 추출한 anserine을 이용하여 hypochlorite에 의해 생성되는 carbonyl group 및 단백질 가교결합 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

4.1. Carbonyl group 함량 측정

Hypochlorite anion은 앞서 말한 바와 같이 carbonyl(CO) group을 형성하고 이것이 crystallin이나 ovalbumin 등과 반응하여 거대한 가교결합된 고분자 물질 즉, 최종당화산물(advanced glycosylation end products; AGEs)을 생성하며 이것이 질병 및 노화에 관련된 비가역적 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Thornalley, 1999). CO group은 hydroxyl radical과 hypochlorous acid를 포함하는 반응성 산소종(ROS)의 직접적인 작용뿐만 아니라 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)와 4-hydroxy-nonenal를 포함하는 aldehyde와 반응하여 생성되게 된다(Hazell et al., 1993). 따라서 실제로 CO group의 존재는 단백질 노화의 일반적인 지시자 및 유해 인자로 사용된다(Stadtman, 1992; Goto et al., 1999). 연어 추출 anserine이 hypochlorite에 의해 생성되는 CO group 형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 11과 같다. Ovalbumin에 hypochlorite와 연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물을 첨가한 후 CO group 감소율을 측정한 결과 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/mL의 농도로 연어 추출 anserine을 첨가하였을 때 각각 6.15±0.34%, 16.19±0.82%, 26.69±0.69%, 33.28±1.96%, 42.78±0.94%의 CO group의 감소를 나타냄으로써 추출물의 농도가 증가함에 따라 CO group의 생성 억제능도 증가하는 경향을 나타냈다. Hipkiss et al.(1998)에 따르면 BSA의 malondialdehyde와 hypochlorite를 이용한 단백질 변성시에 histidine 함유 펩타이드가 억제시키는 효과가 있다고 하였으며 이는 펩타이드가 단백질의 CO group과 직접적으로 반응하기 때문이라고 보고되어져 있다(Hipkiss et al., 2001). 이로써 연어로부터 추출한 anserine이 단백질 변성에 의해 생성된 carbonyl group을 감소시키는 작용을 하여 노화와 관련된 반응을 조절하는데 유용할 것이라 사료된다.

Table 11. The effects of salmon anserine on the loss of carbonyl groups from hypochlorite treated ovalbumin*

Sample	Concentration(mg/mL)	lost CO group (%)
IEC-B	0.5	6.15±0.34[e]
	1	16.19±0.82[d]
	2	26.69±0.69[c]
	3	33.28±1.96[b]
	4	42.78±0.94[a]

* Ovalbumin(1mg/mL) was incubated with hypochlorite at 37℃ for 60min.

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

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

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

4.2. 전기영동을 통한 단백질 가교 결합 형성 억제능 확인

연어 추출 anserine인 IEC-B 추출물이 단백질 변성에 미치는 영향을 좀 더 확인해보고자 ovalbumin에 IEC-B를 각각 1~4 mg/mL의 농도로 첨가하여 hypochlorite와 반응시켜 단백질을 변성시킨 후 전기영동을 하였다. 그 결과는 Fig. 18과 같다. A lane은 hypochlorite를 처리하지 않은 ovalbumin이며 B는 hypochlorite 처리한 ovalbumin이다. C, D, E, F lane은 hypochlorite 처리한 ovalbumin에 IEC-B 추출물을 각각 1, 2, 3, 4 mg/mL의 농도로 첨가한 것이다. A lane에서는 ovalbumin의 선명한 단백질 밴드가 관찰되었으나 연어 추출물을 첨가하지 않고 hypochlorite만 처리한 구는 ovalbumin의 단백질 밴드가 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 연어 추출 anserine을 첨가한 구에서는 무처리한 ovalbumin 밴드와 동일하게 나타났으며, 연어 추출 anserine을 1~4mg/mL의 농도로 처리한 실험구 모두 단백질 band가 관찰된 것으로 보아 연어 추출 anserine이 hypochlorite 처리한 단백질의 glycation 반응을 억제할 수 있을 것이라 사료된다. Anserine, carnosine과 같은 histidine 함유 디펩타이드는 이미다졸과 카르복실기를 가진 아미노 그룹으로 이뤄져 있는데 이것이 glycation쪽과 우선적으로 결합하는 특징이 있어 단백질의 가교결합을 억제한다고 보고된 연구(Hipkiss, 1998)가 있으며 bovine α-crystallin을 hypochlorite 처리하여 carnosine의 가교결합 형성 억제능을 실험한 Hipkiss et al.(1998)과 O'Connell et al.(1994)의 연구에서 본 실험과 동일한 결과를 나타낸 것을 확인하였다.

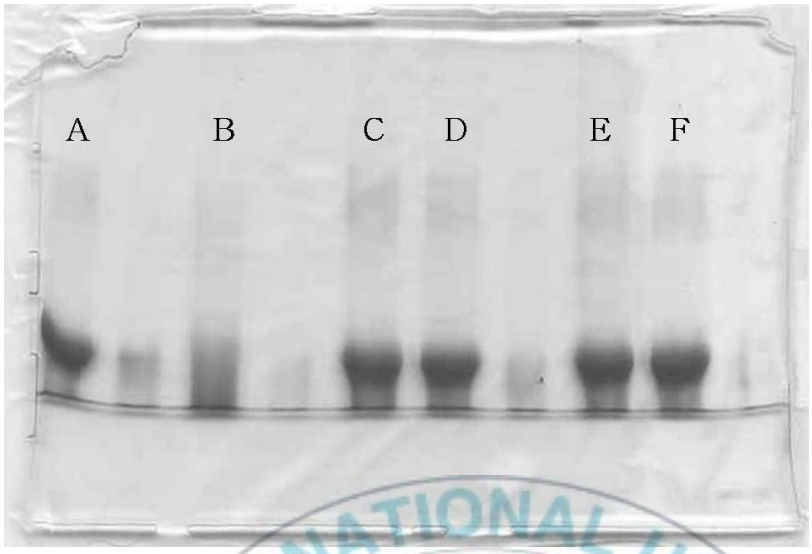

Fig. 18. Inhibition of hypochlorite-mediated protein cross-linking by anserine extracted from salmon. Ovalbumin was incubated with hypochlorite(reagent grade) for 5min at 37℃.

A: no hypochlorite treated ovalbumin, B: hypochlorite treated ovalbumin, C: hypochlorite treated ovalbumin+ 1mg/mL salmon anserine(using CM-cellulose), D: hypochlorite treated ovalbumin+ 2mg/mL salmon anserine(using CM-cellulose), E: hypochlorite treated ovalbumin+ 3mg/mL salmon anserine(using CM-cellulose), F: hypochlorite treated ovalbumin+ 4mg/mL salmon anserine (using CM-cellulose).

결론 및 요약

수산동물을 원료로 한 천연 anserine의 추출을 위해 여러 추출방법을 이용하여 연어로부터 anserine을 추출하였으며 각 추출방법에 따른 불순물(protein, iron)과 anserine의 함량변화를 살펴보았다. 또한 연어로부터 추출한 anserine의 기능적 특성을 확인하기 위하여 항산화능 실험 및 단백질 변성에 미치는 영향에 대하여 조사하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. Anserine 추출용 시료로서 연어의 적합성을 확인하고자 아미노산을 분석한 결과 총 33개의 아미노산이 검출되었는데 이 중 histidine 함유 디펩타이드 중 anserine은 육 100g당 1070.51mg의 함유로 전체 아미노산 중 약 43.06%를 차지하는 것으로 나타났으며 그 외 histidine과 carnosine은 39.29mg, 2.68mg으로 anserine에 비해 소량 존재하였으며 이로써 연어가 anserine의 추출용 시료로서 적합하다는 것을 확인하였다.

2. Anserine 추출공정 중 가열 처리온도에 따른 단백질, 총철, anserine의 함량변화를 조사한 결과 비가열처리구의 경우, 단백질함량, 총철함량과 anserine함량이 각각 23.64±0.21mg/mL, 16.20±0.09μg/mL, 5.47±0.22mg/mL로 나타났다. 60℃ 가열처리구의 함량 변화는 7.40±0.39mg/mL, 2.32±0.02μg/mL, 5.20±0.63mg/mL이었고, 80℃ 경우 7.64±0.04mg/mL, 1.20±0.12μg/mL, 5.21±0.15mg/mL로 분석되었다. 100℃ 처리구는 7.04±0.28mg/mL, 0.68±0.02μg/mL, 4.04±0.31mg/mL로 나타났다. 60℃, 80℃, 100℃ 가열처리구는 비가열처리구에 비해 단

백질함량이 약 69%, 69%, 71% 감소되었으며 총철함량은 약 86%, 92%, 96% 감소하였다. Anserine의 함량은 60℃, 80℃의 경우 약 7% 정도 감소하였고, 100℃의 경우 약 26% 정도 감소를 나타냈다.

3. 가열처리 후 각 추출물을 한외여과를 통해 분자량을 조절하였다. 비가열 처리구의 경우 한외여과를 행했을 때 단백질의 함량이 약 81% 감소되었다. 60℃, 80℃, 100℃ 한외여과 처리구는 가열처리만 한 실험구에 비해 각각 31%, 41%, 33% 정도 단백질 함량이 감소되었으며 총철함량은 비가열처리구의 약 97%를 감소시켰고 60℃, 80℃ 100℃의 경우 가열처리구의 약 94%, 85%, 80%를 감소시켰다. Anserine 함량의 경우 비가열 처리구에 비해 한외여과 처리구가 43% 감소를 나타냈으며, 가열처리구에 비해 50%, 36%, 39% 정도 감소하였다.

4. Dowex 1×8을 이용하여 1차 이온교환을 하고 그 추출물을 이용하여한외여과를 통해 분자량을 조절한 뒤 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 하였다. 그 결과 1차 이온교환 추출물의 단백질함량, 총철함량, anserine함량은 7.30±0.26mg/mL, 0.46±0.01μg/mL, 6.38±0.31mg/mL로 분석되었다. 이는 비가열 처리구의 단백질과 총철함량을 약 69%, 97% 감소시킨 반면 anserine의 함량은 약 16% 증가시켰으며 60℃, 80℃, 100℃ 가열처리와 단백질 함량은 큰 차이가 없었으나 총철함량이 80%, 61%, 32% 감소되었고 anserine의 함량을 각각 22%, 20%, 57% 증가를 나타냈다. 이온교환 추출물을 한외여과 했을시 단백질, 총철 및 anserine 함량은 45%, 91%, 33% 감소하였는데 이는 비가열처리구와 가열처리구에 비해 단백질, 총철함량이 낮은 반면 anserine 함량은 가장 높았다. 2차 이온교환 추출물은 1차 이온교환 및 한외여과 처리한 것에 비해 단백질

함량이 약 70% 낮아졌으며 총철함량의 경우 유의적인 차이가 없었고 anserine의 경우 약 12% 감소되었으나 비가열처리나 가열처리 및 한외여과 추출물에 비해 상대적으로 높았다.

5. 여러 방법으로 추출한 연어추출물을 전기 영동한 결과 많은 밴드가 관찰된 비가열처리 추출물에 비해 가열처리와 한외여과처리, 이온교환처리 추출물에서 단백질 밴드가 많이 감소된 것을 확인할 수 있었다. HPLC 분석에서 anserine 표품은 13분대에 peak가 관찰되었으며 전체적으로 연어 추출물에서는 13분대에 anserine peak가 확인되었으나 15~19분대에 다른 peak들이 관찰되었다. 가열처리와 한외여과, 1차 이온교환을 통해 15~19분대 사이에 존재하던 peak들이 감소되는 것을 확인할 수 있었으나 그 감소 정도는 미비하였다. 2차 이온교환 추출물의 경우 anserine 외의 15~19분대의 peak가 제거되어 연어 추출방법 중 1, 2차 이온교환 및 한외여과 처리를 병행한 것이 단백질 잔여물 제거 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. 그리고 LC/MS를 이용하여 표품 anserine과 1차 이온교환 및 한외여과처리 추출물, 2차 이온교환 추출물을 분석한 결과 모두 동일한 분자량(M.w 240)을 가지는 물질로 확인되었다.

6. 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 나타냈다.

7. 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..

8. pH 1.2, 4.2, 6.0으로 pH 조건을 달리하여 합성 anserine과 연어 추출 anserine인 IEC-B의 아질산염에 대한 소거능을 실험한 결과 ascorbic acid가 가장 높은 소거능을 나타냈고 합성 anserine과 연어 추출 anserine 모두 유사한 소거능을 나타냈으며 모든 실험구는 pH가 낮아질수록 높은 소거능을 나타냈다.

9. Ovalbumin에 hypochlorite와 연어로부터 추출한 anserine을 0.5, 1, 2, 3, 4mg/mL의 농도로 첨가하였을 때 1차이온교환 및 한외여과처리 추출물은 농도에 따라 carbonyl group이 11.02±0.81, 18.44±1.94, 29.16±2.18, 39.43±1.06, 50.02±1.19% 감소하였다. 또한 2차이온교환 추출물의 경우 carbonyl group이 6.15±0.34, 16.19±0.82, 26.69±0.69, 33.28±1.96, 42.78±0.94% 감소하였다. 또한 연어 추출물을 1, 4mg/mL의 농도로 첨가하여 hypochlorite로 반응시켜 변성된 단백질을 전기영동한 결과 hypochlorite 처리를 하지 않은 ovalbumin은 단백질 밴드가 선명하게 나타났으나 연어 추출물을 첨가하지 않은 hypochlorite 첨가구는 ovalbumin의 밴드를 관찰할 수 없었다. 1, 4mg/mL의 농도로 연어 추출물을 첨가한 실험구에서는 무처리한 ovalbumin 밴드와 동일한 단백질 밴드가 나타났다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

감사의 글

어느덧 2년이라는 시간이 흘러 석사과정을 마치게 되었습니다. 석사학위과정동안 배려해주시고 이끌어주신 지도교수 이근태 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다. 그리고 제게 연어를 제공해주신 김상무 교수님께도 감사의 말씀 올립니다. 또한 부족한 저의 논문을 정성껏 다듬어 주시고 깊이를 더해주신 조영제 교수님, 이양봉 교수님께 깊은 감사의 말씀드리며 대학 생활동안 많은 가르침을 주신 김선봉 교수님, 전병수 교수님, 양지영 교수님, 안동현 교수님, 김영목 교수님께도 감사드립니다.

또한 항상 저의 든든한 후원자이자 많은 가르침을 주신 박성민 박사님과 송호수 선배님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 대학생활동안 내 전부이자 가족인 화학공학 실험실... 호빵맨 재희선배, 화공실로 이끌어준 승진선배, 홍사노바 홍길선배, 식공회장님 현태선배, 치토스 쑝간지 지원선배, 초읍사는 현영언니, 자주 아팠던 원경언니, 큐티보이 세광선배, 화공실 이야기로 미생방에서 인기 얻은 매실노 근식선배, 쿠폰발행일인자 균호선배, 올해 09학번의 선풍적인 인기를 끌 것이라 말하던 파파 태영선배, 일한다고 고생해서 살 6kg 빠지고 있는 군정선배, 초고속 승진 엄메 은미, 화공실 어머니 은화, 자기도 예쁜 별명 갖고 싶다고 말하며 울던 지은이, 화공실 요정 양꼬리 은희, 마지막 대학원 생활 내 BF이자 애교쟁이 공주...대학생활 동안 많이 울고 웃던 추억들을 한가득 만들 수 있었던 화공실 식구들에게도 감사의 마음 전합니다. 그리고 평생 가는 우리 동기 명화, 윤정, 경수, 해경, 소현이와 학부생활 절대 빼놓을 수 없는 게임랜드 아이들, 특히 광덕, 재홍, 도형이에게도 고마운 마음 전합니다. 마지막으로 항상 제가 힘들 때 옆에서 달래고 다독여주던 흥식이, 그리고 학위과정동안 항상 든든한 힘이 되어주고 사랑을 베풀어주신 아빠, 엄마께 진심으로 감사드리며 동생 지환이에게도 고마운 마음 전합니다. 그리고 저에게 항상 관심과 사랑을 주신 모든 분들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

Abe, H., G.P. Dobson, U. Hoeger and W.S. Parkhouse. 1985. Role of histidine related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle. Am. J. Physiol., 249, R449-R454.

Abe, H. and E. Okuma. 1991. Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle. J. Jap. Fish. Soc., 57, 2101-2107.

Ackermann, D., O. Timpe and K. Poller. 1929. Uber das Anserin, einen neuen Bestandteil der Vogelmuskulatur. Z. Physiol. Chem., 183, 1-10.

Allan G., G. Charles, J. Bardawill and M. Maxima. 1948. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177, 751-756.

A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.

Block, G. and L. Langseth. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Tech., 48(7), 80-85.

Boldyrev, A.H., S. Ave, Stvolinsky and O. Tyulina. 1995. Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species : A comparatibe study. Comp. Biochem. Physiol., 112(3), 481-485.

Brown, C.E. 1981. Interaction among carnosine, anserine, ophidine and copper in biochemical adaptation. J. Theor. Biol., 88, 245-256.

Bucala, R.A., Cerami and H. Vlassara. 1995. Advanced glycosylation

end products in diabetic complications. Diabetes Rev., 3, 258-268.

Burton, G.W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. J. of Nutrition., 119, 110-116.

Bussayarat, M. and I. Kanokorn. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. Meat Sci., 71, 364-374.

Carla, D.P., C. Sonia, C. Emilio and C.N. Maria. 2000. antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. J. Agric. Food Chem., 48, 4241-4245.

Chan, K.M., E.A. Decker and W.J. Means. 1993. Extraction and activity of carnosine a natually occuring antioxidant in beef muscle. J. Food. Sci., 58, 1-7.

Charles, J. and Jr, Parker. 1966. Spectrophotometric Determination of Carnosine and Anserine in muscle. Anal. Chem., 38, 1359-1362.

Chasovnikoba, L.V., B.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.

Chaudiere, J. and R. Ferrariiliou. 1999. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. Food and Chem. Toxico., 37, 949-962.

Chen, C.C., A.M. Pearson, J.I. Gray and P.K. Ku. 1984. Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. J. Food Sci., 49, 581.

Choi, Y.J., I.S. Kim, K.W. Lee, G.B. Kim, N.G. Lee and Y.J. Cho. 1996. Available components of cooking drips, dark muscle,

head and raw vicera from skipjack. J. Kor. Fish. Soc., 29, 701-708.

Davey, C.L. 1960. The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys., 89, 303-308.

Decker, E.A. and A.D. Crum. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. Meat Sci., 34, 245-253.

Decker, E.A. and B. Welch. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agriculture and Food Chem., 38, 674-677.

Decker, E.A. and H.O. Hultin. 1992. 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.

Dong, S., M. Zeng, D. Wang, Z. Liu, Y. Zhao and H. Yang. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). Food Chem., 111, 879-886.

Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutr., 18, 872-879.

Gayiba, 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.

Gopalakrishnan, J., E.A. Decker and W.J. Means, 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. Meat Sci., 52,

101-110.

Gordon, M.H. 1990. The machanism of antioxidant action in vitro. In food antioxidants. Hudson BJF, ed. Elsevier Applied Sci., London/New York. 1-18.

Goto, S., A. Nakamura, Z. Radak, H. Nakamoto, R. Takahashi, K. Yasuda, Y. Sakurai and N. Ishii. 1999. Carbonylated proteins in aging and exercise : Immunoblot approaches. Mech. Aging Devel., 107, 245-253.

Gray, J.I. and Jr, L.R. Dugan. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. J. Food Sci., 40, 981-984.

Harris, R.C., D.J. Marlin, M. Dunnett, D.H., Snow and E. Hultman. 1990. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the throughbred horse, greyhound dog and man. Comp. Biochem. Physiol., 97A, 249-251.

Hazell, L.J., J.J.M. Van den Berg and R. Stocker. 1993. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. J. Biochem., 290, 165-172.

Hipkiss, A.R., V.C. Worthington, D.T.J. Himsworth and W. Herwig. 1998. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. Biochimica et Biophysica Acta., 1380, 46-54.

Hipkiss, A.R. 1998. Carnosine, a protective, anti-aging peptide?. Biochem and Cell Biology., 30, 863-868.

Hipkiss, A.R., C. Brownson and M.J. Carrier, 2001. Carnosine, the

anti-aging, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. Mechanisms of Ageing and Development., 122, 1431-1445.

Igene, J.O., J.A. King, A.M. Pearson and J.I. Gray. 1979. Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron in development of warmed over flavor(WOF) in cooked meat. J. Agric. Food Chem., 146, 605-611.

Ito, N.S., A. Fukushima, M. Hasegawa, Shibata and T. Ogiso. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F344 rats. J. Natl. Cancer Inst., 70, 343-351.

Kang, C.H., H.Y. Jung, D.H. Lee, J.k. Park, J.U. Ha, S.C. Lee and Y.I. Hwang. 2000. Analysis of chemical compounds on tuna processing by products. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 29, 981-986.

Kang, Y.H., S.R. Park and K.D. Moon. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Kor. J. Food Sci. Technol., 27, 978-984.

Kazuaki, K., M. Yoshiharu. and S. Kazuo. 2004. Sepatation and physiological functions of anserine from fish extract. Develop. in Food Sci., 42, 97-105.

Kim, S.G., H.C. Lee, H.K. Byun and Y.J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. J. Kor. Fish. Soc., 29, 264-255.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

Laleye, L.C., B.H. Lee, R.E. Simard, L. Camichael and R.A. Holly. 1984. 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.

Lee, B.J. and D.G. Hendricks. 1997. Metal-catalyzed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. J. Food Sci., 62, 935-938.

Lee, J.H., K.T. Lee, S.M. Park and C.K. Park. 1998. Improvement of Rheological and functional properties of salmon FPC by enzymatic partial hydrolysis. J. Kor. Fish. Soc., 31, 132-138.

Linneweh, W., A.W. Keil and F.A. Hoppe-Seyler. 1929. Die Konstitution des Anserins, Z. Physiol. Chem., 183, 11-18.

Luckton, L. and H.S. Olcott. 1958. Content of free imidazole compounds in the muscle of aquatic animals. Food Res., 23, 611-618.

Marit, A., J. Leif and G. Hans. 1995. 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.

Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47, 469-474.

Mitsuda, H., K. Yasumoto and K. Iwami. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. Eiyo To Shlkuryo., 19, 210-217.

O'Connell, A.M., S.P. Gieseg and K.K. Stanley. 1994. Hypochlorite oxidation causes cross-lingking Lp(a). Biochem. Biophys. Acta., 1225, 180-186.

Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. J. Jap. Fish. Soc., 35, 771-775.

Park, C.K., S.B. Souh and E.H. Lee. 1996. Studies on the extractive nitrogenous constituents of chum salmon, Oncorhynchus keta in Korea. J. Kor. Fish. Soc., 29, 51-63.

Pokorny, J., N. Yanishlieva. and M. Gordon. 2001. Antioxidants in food. CRC., 71-83.

Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Hu, K. Zhang and Z. Li. 2006. Antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysacccharide extrated from ulva pertusa(Chlorophyta). Bioorgan. and Medic. Chem. Letters, 16, 2441-2445.

Sidwell, C.G., H. Salwin, M. Benca and Jr, J.H. Mitchell. 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. J. Am. Oil. Chem. Soc., 31, 603-609.

Son, J.Y., J.H. Rhim and H.S. Son. 1995. Effect of some synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of skip jack oil. Kor. J. Food Nutr., 8, 88-92.

Song, H.S., G.T. Lee and O.J. Kang. 2006. Effects of extraction

method on the carnosine, protein and iron contents of eel (Anguilla japonica) extract. J. Kor. Fish. Soc., 39, 384-390.

Song, J.Y., K.J. Min and C.G. Cha. 2008. Antioxidative and antitumor activity of extracts from Saussurea lappa. J. Env. Hlth. Sci., 34, 55-61.

Stadtman, E.R. 1992. Protein oxidation and aging. Science, 257, 1220-1224.

Stohs, S.J. and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biol. Medic., 18, 321-336.

Suyama, M., T. Suzuki and J. Nonaka. 1967. Chromatographic determ-rmination of imidazole compounds in the whale meat. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 33(2), 141-146.

Suyama, M., T. Hinaro and T. Suzuki. 1986. 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.

Suyama, M., T. Suzuki, M. Maruyama and K. Saito. 1970. Determination of crnosine, anserine and balenine in the muscle of animal. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 36, 1048-1053.

Thornalley, P.J. 1999. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. Cell Mol. Biol., 44, 1013-1023.

Viollier, E., P.W. Inglett, K. Hunter, A.N. Roychoudhury and P. Van Cappellen. 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. Applied Geochem., 15, 785-790.

Wu, H.C., C.Y. Shiau, H.M. Chen and T.K. Chiou. 2003. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. J. of Food and Drug Anal., 11, 148-153.

Yu, H.E., M.M. Leaniza, Y.J. Bae, D.H. Lee, J.S. Park, H.S. Kwak, H.K. Kim and J.S. Lee. 2005. Screening and extraction condition of antiaging bioactive substances from medicinal pants. J. Kor. Soc Food Sci. Nutr., 34, 1136-1142.

국립수산진흥원. 1995. 한국수산물 성분표. 345.

김영곤. 2004. 항산화제. 여문각. 1-3.

김우선. 2003. 노폐계로부터 분리한 carnosine, anserine 및 homocarnosine의 항산화능과 안전성 평가. 덕성여자대학교 식품영양학과 박사 학위 논문.

농림수산부. 2007. 해양수산통계연보. 376.

정문기, 1988, 韓國漁圖譜, 一志士, 125-126.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교