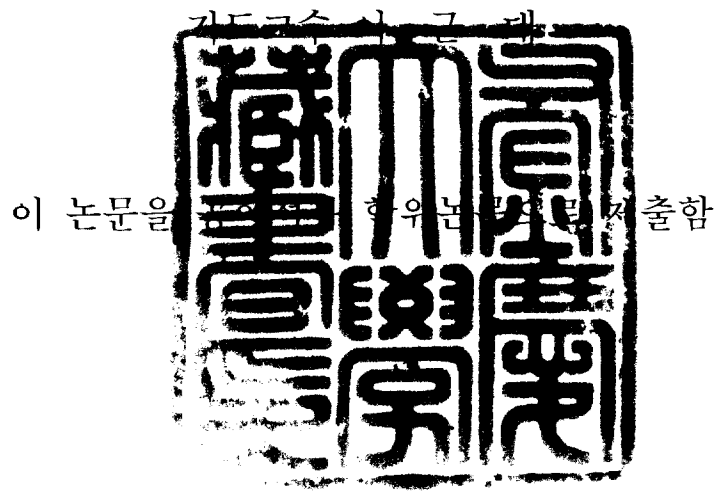


701
301
150
11

공학석사 학위논문

가다랑어 자숙액에서 분리한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화 효과



2006 년 2 월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

김 영 욱

김영욱의 공학석사 학위논문을 인준함

2005 년 12 월

주 심 농 학 박 사 김 선 봉 

위 원 수 산 학 박 사 조 영 제 

위 원 공 학 박 사 이 근 태 

목 차

Abstract	1
서 론	3
재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
1-1. 참치 자숙액	7
2. 실험방법	7
2-1. 일반성분 측정	7
2-2. 자숙액의 단백질 가수분해	8
2-3. 가수분해도 측정	8
2-4. 한외여과 장치를 통한 저분자 펩타이드 분리	9
2-5. 유리아미노산 함량 측정	9
2-6. HPLC법에 의한 저분자 펩타이드 관련 물질 분석	9
2-7. Linoleic acid계 자동산화 억제능 측정	10
2-8. DPPH 라디칼 제거능	10

2-9. 환원력 측정	11
결과 및 고찰	12
1. 일반성분 분석	12
2. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드 분리정제	12
2-1. 가다랑어 부위별 자숙액에 따른 유리아미노산 분석	12
2-2. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 효소분해 최적 조건	16
2-3. 한외여과 장치를 이용한 저분자 펩타이드의 분리정제	19
3. HPLC 분석	23
3-1. Carnosine	23
3-2. 가다랑어 자숙원액	24
3-3. 한외여과 처리	24
4. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화능 평가	28
4-1. Linoleic acid계 자동 산화 억제능 측정	28
4-2. 환원력 측정	28
4-3. DPPH 라디칼 제거능	30
요약	33
감사의 글	35
참 고 문 헌	36

Antioxidant Effect of Histidine Containing Low Molecular Weight Peptide Isolated from Skipjack Boiled Extract

Young-Wook Kim

**Department of Food Industrial Engineering
Graduate School of Industry,
Pukyong National University**

Abstrat

This studies were carried out to investigate optimun condition for the isolation of histidine containing low molecular weight peptides and the evalution of antioxidant effect from skipjack boiled extract(SBE). the results were summarized as follows.

Experiments with SBE demonstrated that histidine containing low molecular weight peptides are capable of inhibiting lipid oxidation. They also possessed effective abilities as free radical scavengers and reducing agents. These activities may increased with increasing concnetration.

1. The proximate compositions of SBE were crude protein 82.30%, crude fat 10%, crude ash 0.39%. The contents of L-histidine in the white muscle ranged from 79.7 ± 4.86 to 83.1 ± 1.75 $\mu\text{mol/g}$ and 11.0 ± 2.39

μmol/g in red muscle. The L-histidine level of red muscle was much lower than that of white muscle in the SBE

2. The extracts were treated with a 2 commercial enzymes(alcalase, neutrase) under different pH, temperature and time. The optimum hydrolysis conditions of SBE were pH 7.0, temperature 60°C for 2 hours in the batch reactor and 63% of SBE was hydrolyzed. And HPLC analysis proved removing effect of UFP to high molecular weight impurities in SBE.

3. SBE and pure carnosine participated as a inhibiting autoxidation agents that confirmed trough the autoxidation processing of linoleic acid. The treatment of UFP improved the inhibiting ability of SBE to autoxidation of linoleic acid.

4. The reducing power of UFP treated white muscle extracts are 10 fold higher than red muscle extracts and 0.7 fold higher than 20mM pure carnosine. The UFP treated white muscle extracts had greater reducing power activity than pure carnosine.

5. The scavenging activities of different treated SBE and pure carnosine on DPPH radical were investigated that white and red muscle extracts and pure carnosine were 90%, 70%, 45% respectively. Histidine containing low molecular weight peptides were free radical inhibitors as well as primary antioxidants that reacted with free radicals.

서 론

수산가공공장에서 발생하는 가공부산물 중에서 자숙액은 주로 참치, 고등어, 굴, 오징어 및 멸치 등과 같은 통조림 및 건제품 가공공정에서 발생되며, 이들 대부분은 폐기물로 처리되고 일부는 저가의 조미료 재료나 식품중간소재로 이용되고 있는 실정이다. 특히 다랑어 자숙액의 경우 아미노산이나 단백질 등과 같은 함질소 성분 외에도 기능성 지질 성분도 다량 함유하고 있어 기능성 식품의 소재로써의 활용 가능성이 대단히 높은 것으로 알려져 있으나, 이들 자숙액에 함유된 기능성 물질의 탐색 및 분리를 위한 고차가공에 대한 체계적인 연구는 미미한 실정이다. 최근 기능성 천연 저분자 펩타이드에 관한 연구가 영국이나 미국 등 몇몇 선진국에서 다수 진행되고 있는 추세이나 대부분 가금류나 축육을 원료로 사용하는 경우이고 수산물을 대상으로 진행 중인 연구는 미미한 상태이다.

천연 저분자 펩타이드 중 carnosine(Fig. 1)이나 anserine(Fig. 2)과 같은 히스티딘계 저분자 펩타이드는 항산화능, 글리케이터 저해능, 가교결합 저해능, 자유라디칼과 금속이온 제거능이 매우 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능특성으로 인해 세포의 노화를 억제 시킬 수 있는 물질로 여겨지고 있으며, 최근 히스티딘계 저분자 펩타이드는 다른 항산화제와 달리 활성산소제거 뿐만 아니라 성인병 및 노화억제에 깊이 관련하고 있는 것으로 보고되고 있다. 히스티딘계 저분자 펩타이드는 수산물에서 회유성 어류에 많이 함유되어 있으며 특히 참치에 다량 함유되어 있는 것으로 조사되어 있다.

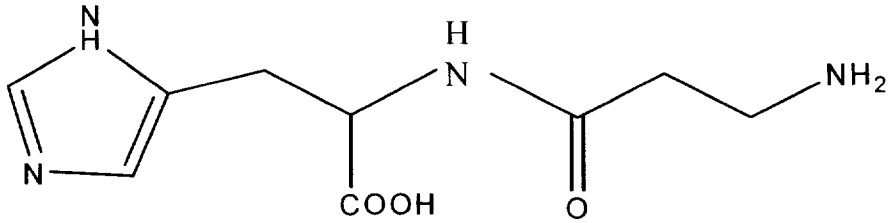


Fig.1. Structure of carnosine (β -alanyl-L-histidine)

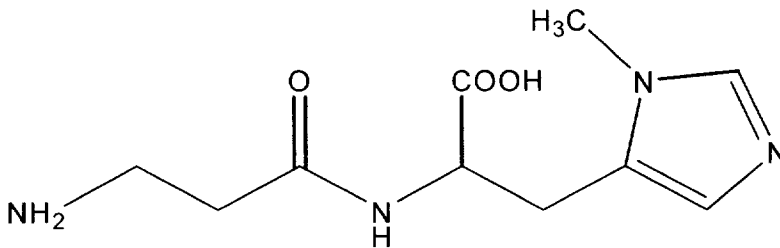


Fig.2. Structure of anserine (β -alanyl-L-1-methylhistidine)

수산가공 자숙액의 경우 고농도의 유기물이 함유되어 있으므로 폐수 처리시 막대한 경비가 소요되므로 이를 활용할 수 있는 방법의 개발은 경제적으로나 환경적으로 대단히 주목받을 만한 과제라 생각된다. 특히 자숙액에 함유되어 있는 히스티딘계 저분자 펩타이드를 분리하여 노화 억제능을 가진 고부가가치의 신기능성 소재로 활용할 수 있다면 일거양

득의 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

수산물에는 다른 동식물성 식품에서는 찾아볼 수 없을 정도로 독특한 정미성분, 향기성분 및 다양한 기능성 성분이 존재하며 이러한 성분들을 일부 이용하여 조미소재로 활용하고 있으나 그 이용도는 제한적이며 연구 또한 미미한 실정이다.

참치가공부산물을 이용한 연구는 참치가공부산물로부터 단백질 분해 효소를 이용한 기능성 천연조미료의 개발(kim and Cha, 1996), 가다랑어의 자숙액, 혈함육, 두부 및 내장에 함유된 유효성분(Choi et al., 1996), 가다랑어 자숙엑스분의 항산화성(Oh et al., 1987))에 관한 연구가 있으며, 자숙액을 이용한 연구는 주로 천연조미료의 개발(Kim and Cha, 1990)에 대한 연구와 정어리 간장 엑스분의 가공조건 및 정미성분에 관한 연구, 단백질분해효소를 이용한 굴과 홍합 단백질 가수분해물의 제조(Kim, 1994; Lee, 1988) 등이 있고, 수산부산물의 이용에 관한 연구는 진주담치 농축엑스분의 제조 및 이용(Lee et al., 1983) 등이 있다.

자숙액의 항산화성에 관한 연구는 오(1987)에 의해 수산가공 부산물로부터 새로운 생리 기능성 소재 탐색 차원에서 시도된 바 있으나 자숙액의 항산화성이 어떠한 기작에 의해서 이루어지는지에 대해서는 연구된 바 없다. 일본의 경우 어류의 히스티딘 유래 물질의 분포에 대하여 연구된 사례가 있으나 저분자 펩타이드의 항산화성과 노화억제능에 관한 연구는 없는 실정이다.

기능성 저분자 펩타이드에 대한 연구에 있어서 Gopalakrishnan (1999)에 의해 돼지골격근 추출물에 함유된 기능성 저분자 펩타이드의 검색에 대한 연구는 이루어진 바 있으나, 수산물 중 어류를 이용한 기능성 펩타이드 추출 또는 관련 제품을 개발한 사례는 아직 보고되지 않

고 있다. Hipkiss(2001)에 의해 항산화성 저분자 펩타이드의 노화억제능에 대해 보고되어 있으나 이러한 물질의 추출 및 정제에 대해서는 부족한 상태이며, 주로 축육을 대상으로 Yeargans(1999)에 의해서 기능성 저분자 펩타이드의 추출에 관한 연구가 진행되어 있을 뿐 수산물을 이용한 추출은 아직 세계적으로도 미미한 실정이다. 이러한 연구가 주로 축산물을 대상으로 국외에서 이루어지고 있는 이유는 주요 식품소비형태의 차이에 따른 결과로 사료되어지며, 우리나라에서는 축산물보다 수산물을 이용한 기능성 저분자 펩타이드 개발이 보다 더 효과적일 것으로 판단되며 관련 산업의 발전에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각되어진다.

현재 우리나라에서 이루어지고 있는 자숙액의 이용형태는 천연 조미료 개발에 제한적으로 이용되어지고 있는 것이 대부분이고 자숙액 속에 함유되어 있는 천연 저분자 펩타이드의 항산화 효과와 단백질 가교결합 형성 및 글리케이션 형성을 억제하는 기능을 이용한 형태의 제품개발은 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 가다랑어 자숙액로부터 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 분리하고, 이를 고부가가치의 기능성 식품소재로써의 이용가능성을 타진할 목적으로 항산화능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 참치 자숙액

본 실험에 사용한 참치육은 (주)서영티앤비에서 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)를 제공받아 저분자 펩타이드의 분리정제용 시료로 사용하였다. 각 시료는 혈합육과 보통육으로 나누어서 20 Brix로 농축한후 1kg단위로 진공포장한후 -20℃의 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였으며 가수분해시 사용한 효소인 Alcalase, Neutrase는 Novo Co.(Denmark)으로부터 구입하여 사용하였으며 기능성 저분자 펩타이드의 HPLC용 표준품으로 사용된 Carnosine과 linoleic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical과 ascorbic acid는 sigma chemical (St. Louis, USA)에서 구입하였으며 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 자숙액의 단백질을 가수분해시켜 분자량별로 분획하기 위한 한외여과막 장치(ultrafiltration membrane system)는 Millipore Co.(Bedford, USA)으로부터 구입하여 사용하였으며 실험에 사용된 membrane은 분자량 한계범위(molecular weight cut-off: MWCO)가 각각 10kDa - 500Da이었다.

2. 실험방법

2-1. 일반성분의 측정

AOAC(1990)에 수록된 방법에 따라 수분은 상압가열건조법으로 조단백질

은 Semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였으며 조지방은 Soxhlet방법을 이용한 용매추출법으로 측정하였다.

2-2. 자숙액의 단백질 가수분해

가다랑어 자숙액에 함유된 단백질을 추출하기 위해 20 Brix로 농축된 가다랑어 자숙액 보통육과 혈합육 300g을 homogenizer를 이용하여 100rpm에서 60초간 균질화 한후 초고속 원심분리기를 이용하여 10℃에서 7000×g의 조건으로 15분간 원심분리한후 상등액을 회수한후 1N HCl 또는 1N NaOH를 이용하여 pH를 실험에 사용한 Alcalse와 neutrase효소의 최적 활성 조건의 pH로 조절후 자숙액중량의 0.5%(w/v)가한후 2시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해후에는 85℃에서 10분간 효소를 불활성화 시킨후 다시 10℃에서 7000×g의 조건으로 15분간 원심분리한후 상등액을 취하여 저분자 펩타이드 추출시료로 사용하였다.

2-3. 가수분해도 측정

Alcalase와 Neutrase를 이용한 자숙액의 가수분해도 (degree of hydrolysis) 측정은 각 효소별 최적 온도에서 반응시킨후 일정 시간의 경과에 따라 반응혼합액을 2ml를 취하여 20% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 2ml가 들어있는 시험관에 넣고, 혼합한후 원심분리(3,000×g, 10min)하였으며 원심분리한 상층액을 일정량 취하여 Lowry법으로 10% TCA 가용성 단백질량을 측정한후, 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{10\%TCA\text{가용성단백질량}}{\text{총단백질량}} \times 100$$

2-4. 한외여과장치를 통한 저분자 펩타이드 분리

저분자 펩타이드의 분리를 위해서 Amicon사의 stirred cell ultrafiltration 장치를 이용하였으며 저분자펩타이드의 분리를 위해서 membrane filter를 이용하여 10kDa - 500Da 까지 분리 하였으며 한외여과시 사용되는 질소 가스는 50psi의 압력조건으로 실험에 사용하였다. 500Da까지 분리된 시료는 -40℃이하의 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2-5. 유리아미노산 함량 측정

유리아미노산은 참치육 및 가공부산물 5ml에 5' sulfosalicylic acid 250mg을 넣고 잘 혼합하여 균질화시켜 제단백 시킨후 원심분리 (3,000×g, 15min)하여 얻은 상층액을 0.20μm membrane filter로 여과한 다음 lithium citrate buffer(pH 2.2)로 일정량 희석하여 아미노산 자동 분석기(Hitachi model 835-50, Japan)로 분석하였다.

2-6. HPLC법에 의한 저분자 펩타이드 관련 물질 분석

Knecht et al.(1986)의 방법에 따라 추출물 25μl에 탈이온수 25μl를 첨가한후 혼합물에 50μl NaHCO₃ buffer(100mM; pH8.3)를 첨가한후 다시 200μl의 Dabsyl-Cl 용액(4mM)을 첨가한후 이용액을 70-72℃에서 15분간 가열한후 700μl의 Na₂HPO₄ buffer(50mM;pH 7.0)를 첨가한후 0.22μm membrane filter로 여과한후 HPLC에 10μl를 주입하였다. HPLC는 Hewlett-Packard사의 1100 series를 사용하였으며 column은 C-18(5μl;

4.6mm×20cm)을 사용하였다. 이동상 용액은 sodium acetate buffer(25mM;pH 6.5)와 acetonitrile을 사용하였고 유속은 1ml/min , column 온도는 40℃ 검출과장은 436nm에서 분석하였다.

2-7. Linoleic acid계 자동산화 억제능 측정

항산화능 측정은 ferric thiocyanate 방법에 따라 측정하였다. 대조구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 0.5ml의 시료에 1.0ml의 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 1.0ml의 50mM linoleic acid (in ethanol 95%)를 5ml의 tube에 넣어 혼합한후 산화를 가속시키기 위해 60℃의 암소에서 저장시키면서 항산화능을 측정하였다.

산화시킨 반응물 50 μ l에 75% 에탄올 2.35ml와 30% ammonium thiocyanate 50 μ l 그리고 20mM ferrous chloride 용액 50 μ l를 첨가한후 3분간 교반하고 과산화물가를 자외선 분광계를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였으며 모든 시료는 3회반복하여 실험 하였다.

2-8. DPPH 라디칼 제거능

저분자 펩타이드의 $\alpha\alpha$ -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH)라디칼의 제거능 시험은 Shimada et al.(1992)의 방법에 따라 측정하였다. 공시험구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 1.5ml의 각각의 시료에 0.1mM DPPH용액 1.5ml를 첨가한후 혼합물을 교반후 실온에서 30분간 정치시킨후 자외선 분광계를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 제거능을 측정하였으며 제거능은 다음과 같은 방법으로 계산 하였다.

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

2-9. 환원력 측정

저분자 펩타이드의 환원력은 Oyaizu(1988)의 방법에 따라서 측정하였다. 대조구의 시료로는 탈이온수를 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 시료 2ml에 0.2M phosphate buffer(pH 6.6) 2ml와 2ml의 1% potassium ferricyanide를 첨가한후 혼합물을 50℃에서 20분간 배양시킨 후 2ml의 10% trichloroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가한후 배양된 반응물 2ml에 증류수 2ml와 0.4ml의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가한 10분후에 자외선분광계를 이용하여 700nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 일반 성분 분석

실험에 사용된 가다랑어육의 일반성분의 조성은 Table 1과 같이 건조 중량 기준으로 조단백질이 82.30%로 가장 높은 함량을 나타내었으며 지방과 회분의 함량은 각각 0.39% 와 10%로 함유되어져 있는 것으로 나타났다.

2. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드 분리정제

2-1. 가다랑어 부위별 자숙액에 따른 유리 아미노산 분석

가다랑어 자숙액의 유리아미노산 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 결과를 살펴 보면 습물 기준으로 L-Anserine이 보통육의 경우 17.3 ± 0.804 로 가장 높은 함량으로 측정되었으며 L-carnosine의 경우도 5.54 ± 0.229 다소 함량이 낮은 편이지만 함유되어져 있는 것으로 조사되었다. 최근 기능성 저분자 펩타이드 중에서도 L-Carnosine 과 L-Anserine 의 경우 Decker and Faraji(1990)에 의하면 Carnosine은 매우 훌륭한 천연 항산화 물질이라고 보고 하였으며 이러한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 이용하여 Huang and Kuo(2000)에 의해서 닭에서 추출한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화능에 대해서 연구가 이루어져 있으며 가금류를 이용하여 천연 항산화물질의 추출에 관한 연구는 다소 진행 되었으나 수산물을 이용한 추출에 대해서는 그 연구가 미미 실정이기 때문에 Fig.3.에 나타낸 것처럼 가다랑어육의 부위별에 따른 히스티딘 함유 펩타이드의 함량을 조사하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 결과를 살펴보면 히스티딘 함

Table 1. proximate compositions(%) of tuna
(dry basis)

Composition	Contents (%)
Crude protein	82.30
Crude ash	0.39
Crude fat	10

Table 2. Distribution of L-Histidine, carnosine and anserine in skipjack tuna muscle ($\mu\text{mol/g}$ wet weight)

Muscle	portion	L-Histidine	Carnosine	Anserine
White muscle	1	83.1$\pm$1.75	5.54$\pm$0.229	17.3$\pm$0.804
	2	79.7$\pm$4.86	4.87$\pm$0.269	14.8$\pm$0.818
Red muscle	3	11.0$\pm$2.39	0.599$\pm$0.0374	2.23$\pm$0.545

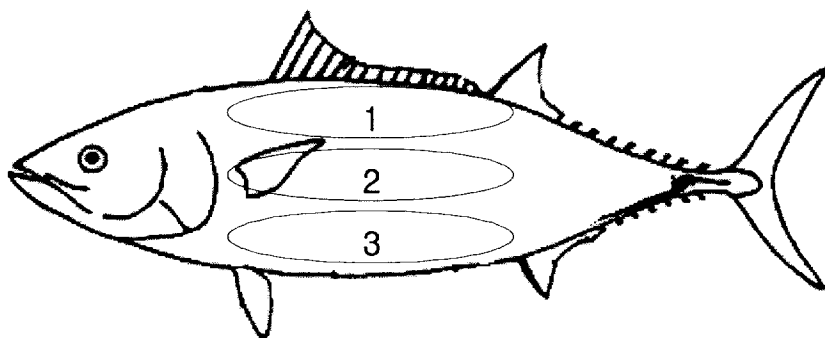


Fig. 3. Sampled portions of white and red muscles of skipjack tuna

- 1: dorsal muscle
- 2: red muscle
- 3: ventral muscle

유 펩타이드의 경우 특히 혈합육이 보통육에 비해서 높은 함량을 나타내었으며 특히 혈합육에 있어서도 등육이 높은 함량을 나타내었다. 이에 본 실험에서는 백색근과 적색근으로 나누어서 20 Brix의 자숙액을 제조하여 각 실험에 사용하였다.

2-2. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 효소분해 최적조건

단백질로부터 기능성 저분자 펩타이드를 분리하는데 사용되어지는 효소의 종류는 사용 대상과 목적에 따라 매우 다양하나 그중 기능성 펩타이드나 가수분해물 추출시 많이 사용되어지고 효과과 높은 효소인 alcalase 와 neutrase를 본 실험에서는 추출용 효소로 사용하였다. 먼저 가다랑어 자숙액에 함유되어져 있는 단백질을 추출하기 위해 20 Brix로 농축된 자숙액을 이용하여 alcalase 와 neutrase를 이용하여 효소별 최적 pH와 온도조건, 반응시간에 따른 최적 가수분해 조건을 산출하기 위한 최적 조건을 검토하였다.

먼저 각효소의 최적의 pH 조건을 산출하기 위해 pH를 2-12까지 조절하여 실험하였다. alcalse를 사용한 구의 결과(Fig.4)를 살펴보면 pH 7.0 부근에서 60%정도로 가장 높은 가수분해율을 나타내었는데 자숙액의 단백질이 수용성 단백질로 구성되어져 있으나 기타 일반 단백질의 가수분해도에 비해 자숙액의 가수분해도가 다소 낮게 나타났는데 이는 자숙액 중에 남아있는 소량의 지방이 효소활성의 저해효과 때문에 추정된다고 Kim et al(1999) 보고하였으며 Neutrase를 사용한 결과를 Fig.5에 나타내었는데 역시 pH 7.0 부근에서 가수분해율이 가장 높게 나타났다. 또한 온도에 따른 최적의 조건을 산출하기 위해서 가열온도를 40℃-80℃로 변화시켜 실험을 행하였다.

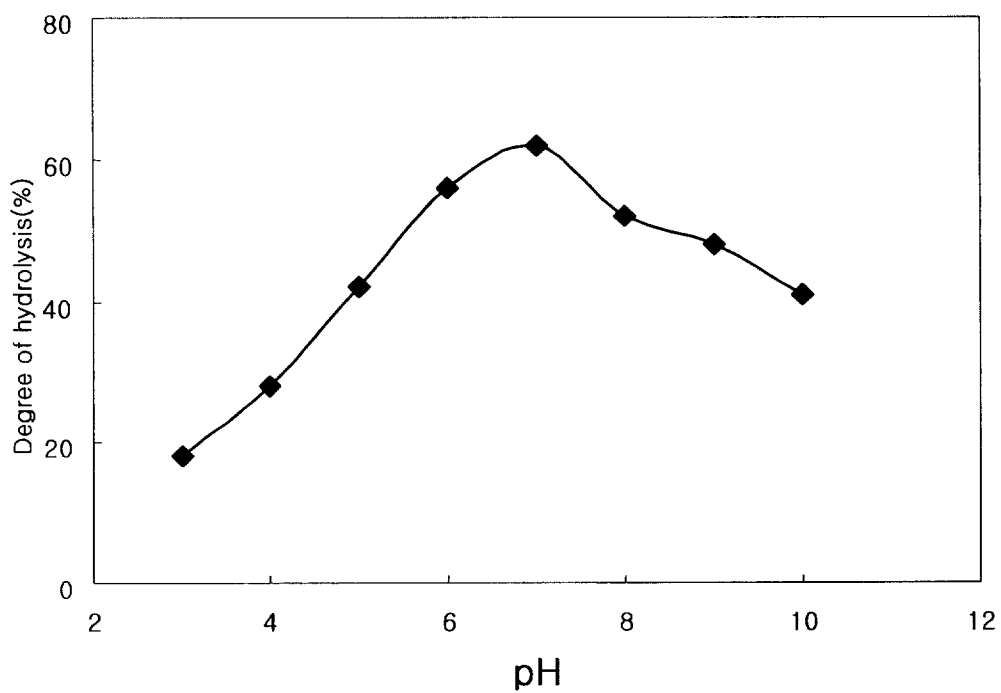


Fig.4. Effect of pH on the hydrolysis of skip jack tuna cooking juice with Alcalase

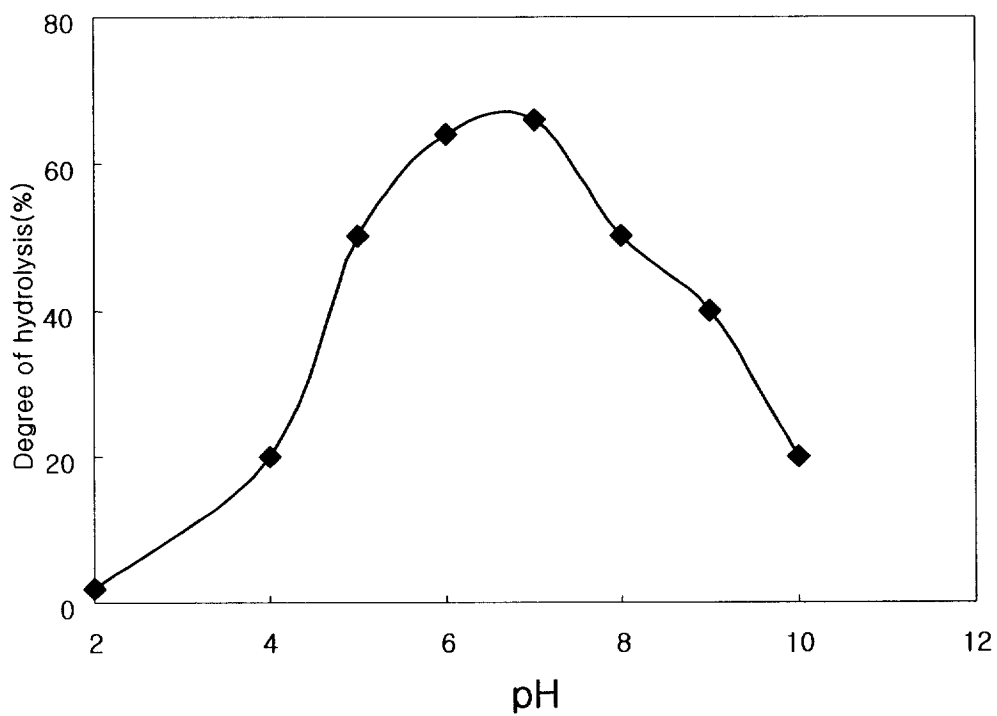


Fig.5 . Effect of pH on the hydrolysis of skip jack tuna cooking juice with Neutrase

Alcalase 와 Neutrase를 사용한 가수분해 결과를 Fig.6 과 Fig.7 에 나타내었다.

두 실험구 모두 60℃로 가열시 가장 좋은 가수분해율을 나타내었다. 이렇게 도출된 두가지 효소의 최적의 pH와 온도를 설정한후 가수분해 시간에 따른 변화를 살펴보았다(Fig.8). 두가지 효소 모두 pH는 7.0으로 조절한후 60℃의 온도조건으로정한후 가수분해 시간을 1시간에서 4시간으로 각각 가수분해 시켜 가수분해율을 검토해 보았다. 결과를 살펴보면 효소의 종류에 따른 차이는 가수분해 2시간을 기준으로 하였을 경우 neutrase가 낮은 경향을 나타내었으나 2시간이상 가수분해 시킨후에는 alcalase와 비교시 특이적인 차이는 나타내지 않는 결과를 나타내었으며 가수분해 시간에 따른 조건을 살펴보면 alcalase와 neutrase 모두 2시간 경과후에는 더 이상의 가수분해가 특이적으로 나타나지 않는 것으로 나타났다.

이에 본실험에서는 효소의 차이에 따른 영향성이 없었기 때문에 alcalase 와 neutrase 두종류의 효소를 사용하였으며 pH는 7.0 으로 조절하고 온도는 60℃에서 가수분해시간은 2시간으로 고정시켜 기능성 펩타이드 최적 추출 조건으로 사용하였다.

2-3. 한외여과 장치를 이용한 저분자 펩타이드의 분리정제

본 실험에서 가다랑어 자숙액을 이용한 기능성 저분자 펩타이드의 추출을 위해 가다랑어의 보통육과 혈합육을 이용하여 히스티딘 함유 저분자 펩타이드 추출 시료로 사용하였으며 이러한 자숙액은 가공과정중 폐기물의 양이 많아 환경 문제 뿐만 아니라 이의 효율적인 회수가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이러한 자숙액에는 히스티딘 함유 펩타이드와 같은 기능성 물질이 다소 함유되어져 있는 것으로 조사되어 이러한 유효 성분

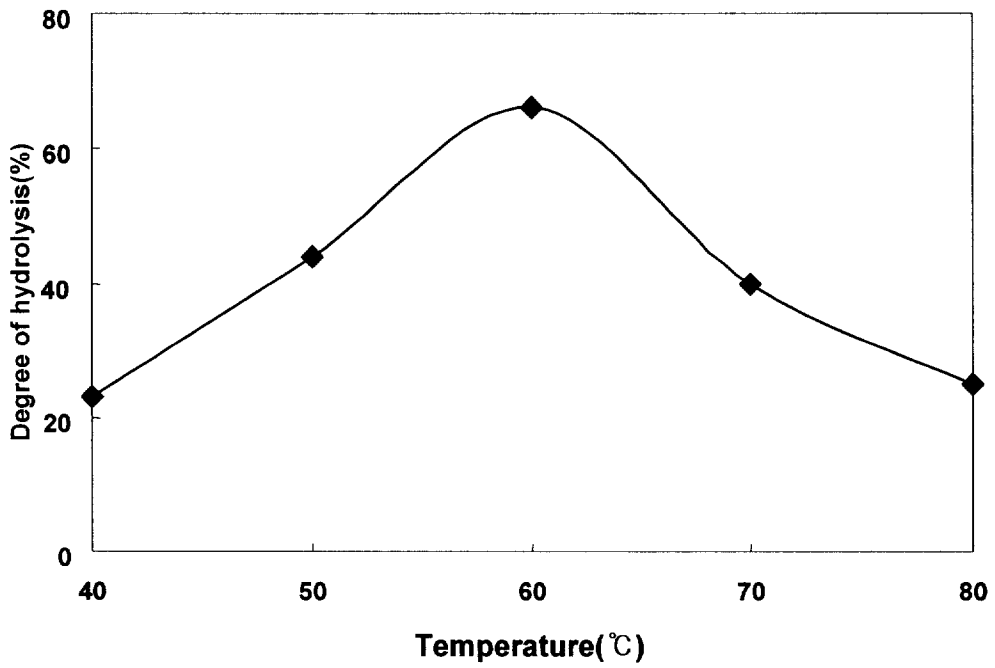


Fig.6. Effect of pH on the hydrolysis of skip jack tuna cooking juice withAlcalase

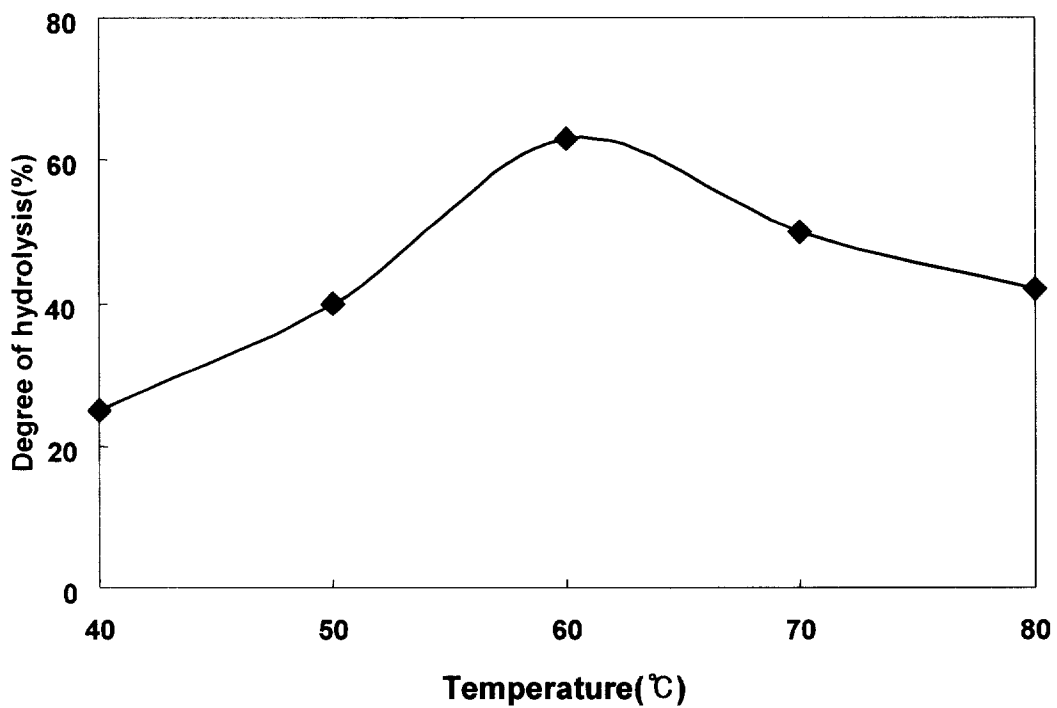


Fig.7. Effect of pH on the hydrolysis of skip jack tuna cooking juice withNeutrase

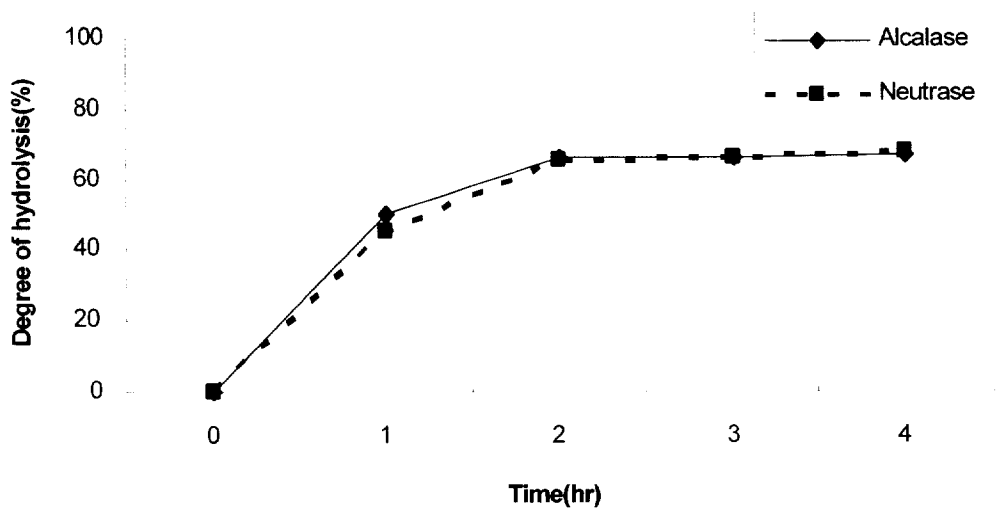


Fig. 8. Effect of incubation time on the hydrolysis of skipjack tuna cooking juice with alcalase and neutrase

의 효율적인 회수를 위해 효소반응으로 얻은 가수분해물을 한외여과 장치를 이용하여 분자량 한계범위(molecular weight cut-off: MWCO)가 각각 10kDa - 500Da의 범위로 한외여과를 시행하여 최종 500 Da의 저분자 펩타이드를 분리 하였으며 한외여과시 질소가스의 압력조건은 55 psi의 조건으로 고정 시켜서 실험을 행하였다. 이렇게 분자량별로 Cut-off한 추출물을 HPLC를 이용하여 각 분리 단계별로 분리 정제도를 확인하였다. 본 실험에서 한외여과 장치를 이용한 가장 큰 이유는 연속적으로 생성물을 분리하여 분자량이 각각 다른 분해물을 생산할수 있다는 큰 이점과 추출조건에 민감한 물질의 분리를 가능하게 한다는 장점이 있다. 단백질의 가수분해에서 한외 여과장치를 이용한 연구는 Deeslie and Cheyan(1981) 과 Cheryan and Deeslie(1983,1984)에 의해서 단백질의 연속적 가수분해와 한외여과막 공정에 의한 유청 단백질의 생산에 관한 연구가 보고 되어져 있으며 Kim(1999)에 의해서 막반응기를 이용하여 참치 자숙액의 연속적 가수분해에 관해 보고 되어져 있으며 이를 이용하여 폐기되는 자숙액의 유용성분의 효율적인 회수 및 이용을 위해 한외여과 장치를 이용하였으며 이에 따른 결과를 HPLC를 이용하여 도출하였다.

3. HPLC 분석

3-1. Carnosine

먼저 히스티딘 함유 저분자 펩타이드중 천연 항산화물질로써 많은 연구가 이루어 지고 있는 Carnosine의 표품을 측정 한 결과를 Fig.9.에 나타내었다. 분석결과를 살펴보면 27분대에서 carnosine의 표품 peak를 확인할수 있었으며 결과에는 나타내지 않았지만 다양한 농도로 조제하여 LC를 측정한

결과에서도 27분대의 peak에서 농도의 증가에 따른 peak area가 비례적으로 증가함을 알수 있었다.

3-2. 가다랑어 자숙원액

가다랑어 자숙원액을 HPLC로 측정한 결과를 살펴보면 Fig.10 에 나타난 것처럼 carnosine 표품과 동일한 27분 영역에서 peak를 확인할수 있었지만 상대적으로 10-20분대에 고분자량을 가진 펩타이드로 추정되는 peak들도 상당량 함유되어져 있음을 확인할수 있었다. 이에 본실험에서는 효율적인 히스티딘 저분자 펩타이드의 회수를 위해 효소가수분해와 한외여과 처리를 통해서 이러한 기타 펩타이드들을 분리 정제 하였다.

3-3. 한외여과 처리

HPLC를 이용하여 한외여과처리한 시료의 HPLC측정 결과를 Fig.11.에 나타내었다. 결과를 살펴보면 한외여과 처리를 한 경우 원시료에 비해서 10-20분대에 나타나던 다수의 peak가 제거되거나 상쇄되는 결과를 나타내었는데 이는 본실험에서 기능성 저분자 펩타이드의 회수를 위해 사용한 한외여과 처리시 분리정제에 있어서 효율적인 방법으로 사료되어 지며 기능성 저분자 펩타이드의 회수를 위해서 축육과 가공류를 대상으로 한 실험에서는 일반적으로 사용되어지는 방법으로써 수산가공부산물인 자숙액을 이용한 기능성 저분자 펩타이드의 분리에 있어서도 효율적으로 이용되어 질수 있는 것으로 사료되어 진다. 이렇게 한외여과 처리를 거쳐서 분자량을 500Da 까지 cut off 시킨 시료를 이용하여 각종 향산화 실험에 사용하였다.

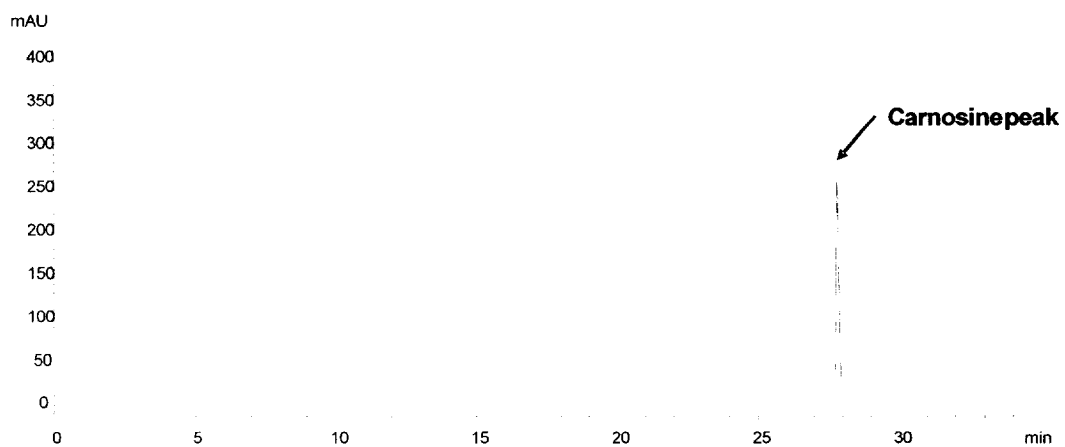


Fig. 9. HPLC chromatogram of Carnosine standard

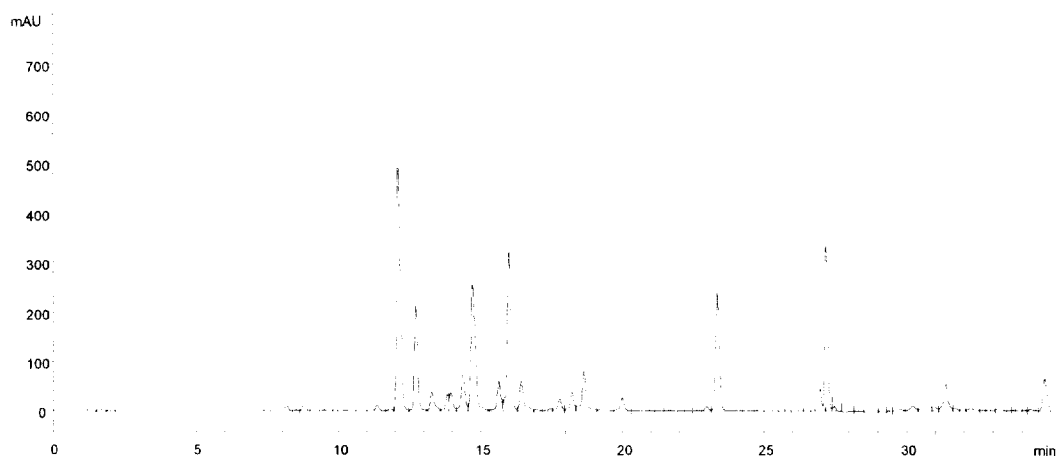


Fig. 10. HPLC chromatogram of skip jack tuna



Fig. 11 . HPLC chromatogram of skip jack tuna (UFP Treated)

4. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화능평가

4-1. Linoleic acid계 자동 산화 억제능 측정

항산화능을 가진 것으로 추정되는 3가지 저분자 펩타이드를 첨가한 linoleic acid의 과산화물가의 변화를 Fig.12.에 나타내었다. 저장기간 7일 동안 linoleic acid에 대한 대조구의 과산화 물가는 초기에 비해 약 20배이상 증가한 반면에 20mM Carnosine 첨가구와 한외여과 처리한 백색근과 적색근은 대조구에 비해서 산화억제 효과가 있는 것으로 나타났으며 백색근에서 추출한 히스티딘계 저분자 펩타이드의 경우 저장 6일째 까지 항산화 지속성이 상당히 우수한 것으로 나타났다. 이에 반해 적색근 추출물은 항산화능을 나타내고는 있지만 백색근에 비해서는 매우 낮은 항산화능을 나타내었다. 이러한 결과를 살펴볼때 한외여과 처리한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드가 지질의 과산화물 생성억제능에도 천연항산화제로써 우수한 능력을 가진 것으로 사료되어 지며 20mM carnosine 첨가구에 비해 백색근 한외처리구의 높은 항산화능은 히스티딘 함유 펩타이드인 Anserine에 의한 상승효과일것이라고 사료되어진다.

4-2. 환원력 측정

한외여과 장치를 이용하여 분리한 가다랑어 자숙액의 보통육과 혈합육을 이용하여 환원력을 비교한 결과를 Fig.13.에 나타내었다. 결과를 살펴보면 20mM Carnosine을 첨가한구에 비해 한외여과 처리한 가다랑어 혈합육의 백색근의 환원력이 높은 결과를 나타내었는데 이는 한외여과 처리하여 얻은 추출물의 경우 순수한 Carnosine에 비해서 동일한 환원능력을 가진 Anserine이 함유되어져 있기 때문에 이러한 기능성 저분자 펩타이드의 상

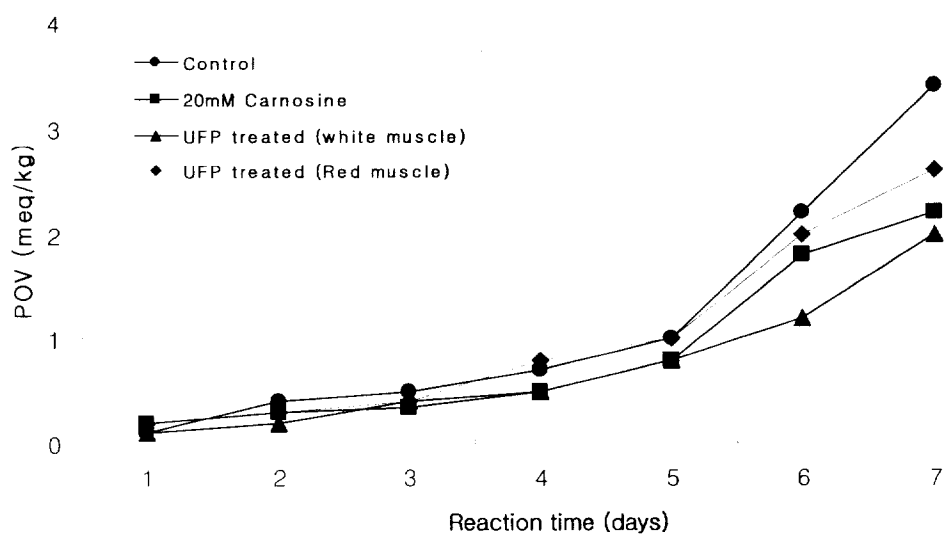


Fig. 12. Comparison of value of Carnosine , histidine containing lowmolecular weight peptides antioxidants in linoleic acid stored at 60°C for 7 days

승 효과에 의한 것으로 사료되어진다. 또한 이러한 자숙액 유래 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 경우 매우 강력한 수용성 성질을 가지고 있기 때문에 기능성 음료로써의 개발도 유용할 것으로 사료되어 진다.

4-3. DPPH 라디칼 제거능

천연항산화제로써의 효능을 살펴보기 위해 DPPH 라디칼의 소거능을 실험하여 Fig.14.에 나타내었다. 이러한 라디칼은 자동산화의 연쇄반응을 일으켜 과산화를 촉진 시키거나 생체내에서 성인병과 관련된 질병을 일으키는 인자로 알려져 있기 때문에 이러한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 이용하여 라디칼 소거능을 살펴본 결과 20mM Carnosine을 첨가한구의 경우 약 70%정도의 라디칼 소거능을 나타내었으며 이에 반해 백색근에서 분리한 추출물은 거의 90%의 라디칼소거능을 나타내었으나 적색근의 경우에는 약 45%정도의 소거능을 나타내었다. 이상의 결과를 살펴볼때 수산가공부산물인 자숙액에서 추출한 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 항산화능은 실험결과 상당히 우수한 것으로 사료되어 지며 미이용 폐자원을 이용한 고부가가치의 기능성 물질 추출의 원료로써의 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어진다.

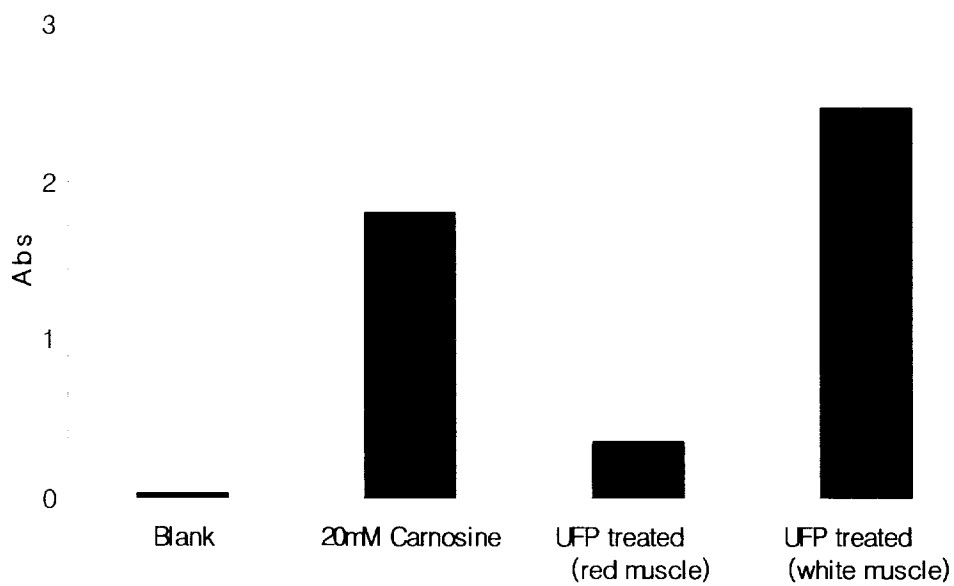


Fig. 13. Reducing power of low molecular weight peptide

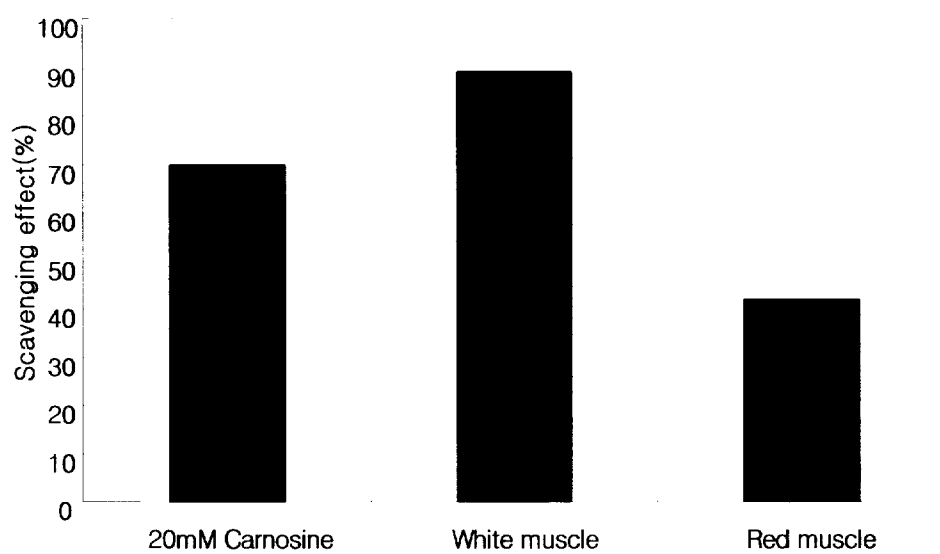


Fig. 14. scavenging effect(%) of histidine containing low molecular weight peptides on (DPPH) radical

요 약

1. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드의 추출 가능성을 살펴보기 위해 먼저 가다랑어육의 일반성분의 조성을 살펴본 결과 건조 중량 기준으로 조단백질이 82.30%로 가장 높은 함량으로 존재하고 있어 대상 펩타이드 추출용 시료로 적당한 것으로 나타났다.
2. 가다랑어 자숙액의 유리아미노산 분석 결과 wet base기준으로 L-Anserine 이 가장 높은 함량으로 측정되었으며 L-carnosine의 경우도 다소 함량이 낮은 편이지만 함유되어져 있는 것으로 조사되었으며 가다랑어육의 부위별에 따른 히스티딘 함유 펩타이드의 함량을 조사한 결과 보통육이 혈합육에 비해서 높은 함량을 나타내었으며 특히 보통육에 있어서도 등육이 높은 함량을 나타내었다.
3. Alcalase 와 neutrase 이용하여 단백질 가수분해의 최적 조건을 살펴본 결과 본 실험에서는 효소의 차이에 따른 영향성이 없었으며 alcalase와 neutrase 두종류의 효소를 사용하였을때 pH는 7.0 으로 조절하고 온도는 60℃에서 가수분해시간은 2시간으로 고정시키는 것이 단백질 가수분해 최적 추출 조건 나타났다.
4. HPLC를 이용하여 한외여과처리한 시료의 HPLC측정 결과 한외여과 처리를 한 경우 원시료에 비해서 10-20분대에 나타나던 다수의 peak가 제거되거나 상쇄되는 결과를 나타내었는데 이는 본실험에서 기능성 저분자 펩타이드의 회수를 위해 사용한 한외여과 처리시 분리정제에 있어서 효율적인 방법으로 사료되어 진다.

5. 20mM Carnosine 첨가구와 한외여과 처리한 보통육과 혈합육은 대조구에 비해서 산화억제 효과가 있는 것으로 나타났으며 보통육에서 추출한 히스티딘계 저분자 펩타이드의 경우 저장 6일째 까지 항산화 지속성이 상당히 우수한 것으로 나타났다.

6. 한외여과 처리한 가다랑어 자숙액의 보통육과 혈합육을 이용하여 환원력을 비교한 결과 20mM Carnosine을 첨가한구에 비해 한외여과 처리한 보통육의 환원력이 높은 결과를 나타내었는데 이는 한외여과 처리하여 얻은 추출물의 경우 순수한 Carnosine에 비해서 동일한 환원능력을 가진 Anserine이 함유되어져 있기 때문에 이러한 기능성 저분자 펩타이드의 상승 효과에 의한 것으로 사료되어진다.

7. 히스티딘 함유 저분자 펩타이드를 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 살펴본 결과 20mM Carnosine을 첨가한구의 경우 약 70%정도의 라디칼 소거능을 나타내었으며 이에 반해 보통육에서 분리한 추출물은 거의 90%의 라디칼소거능을 나타내었으나 혈합육의 경우에는 약 45%정도의 소거능을 나타내었다.

감사의 글

본 연구가 이루어지기까지 많은 관심으로 지도하여 주신 이근태 교수님께 먼저 존경과 감사를 표합니다.

부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 조영제 교수님, 김선봉 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 평소 따뜻한 격려로 용기를 주신 지금은 퇴임하신 장동석 교수님과 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 전병수 교수님, 안동현 교수님께 감사드립니다.

또한 실험에 있어서 어려운 고비마다 많은 도움을 준 박성민 박사님께 감사드리며 기쁠때나 슬플때나 항상 같이해준 화공실 가족 여러분께도 감사의 마음을 전하고자 합니다.

그 외 많은 도움을 주신 여러지인들에게도 지면이나마 감사하다는 마음을 전하고자 합니다.

그리고 항상 자식 잘되기만을 바라시고 말없이 지켜봐 주신 부모님과 형제 그리고 많은 시간동안 곁에서 힘이 되어준 집사람과 아들에게 이 논문을 바치고자 합니다.

참 고 문 헌

김은정, 차용준 ; 참치 가공부산물로부터 단백질 분해효소를 이용한
기능성 천연조미료 제재의 개발. 한국식품영양과학회지. 25(4), 608. 1996.

김은정, 차용준 ; 참치 가공부산물로부터 단백질 분해효소를
이용한 기능성 천연조미료 제재의 개발. 한국식품영양과학회지.
25(4), 617. 1996.

오광수, 이응호, 김명찬, 이강희 ; 가다랑어 자숙엑스분의
향산화성. 한국수산학회지. 20(5), 441.1987.

김세권, 변희국, 전유진 ; 막반응기에서 참치 유문수 유래 단백질
분해효소를 이용한 참치자숙액의 연속적 가수분해.
한국식품과학회지. 17(2), 65. 1985.

이응호, 차용준, 구재근, 문성훈 ; 진주담치 농축엑기스분의 제조
및 이용. 부산수대연보. 23(1), 9.1983.

이응호, 조순영, 하재호, 오광수, 김장량 ; 정어리 잔사를 이용한
정어리 간장의 제조. 한국수산학회지. 17(2), 117. 1984.

이응호, 지승길, 안창범, 김진수 ; 숙성 정어리간장 엑스분의
가공조건 및 정미성분에 관한연구.한국수산학회지. 21(1), 57. 1988.

차용준, 김은정, 김훈 ; 참치 가공부산물로부터 단백질 분해효소를
이용한 기능성 천연조미료 제재의 개발. 한국식품영양과학회지.
25(4), 627. 1996.

최영준, 김인수, 이근우, 김근배, 이남걸, 조영제 ; 가다랑어
자숙액, 혈합육, 두부 및 내장의 유효성분. 한국수산물학회지. 29(5),
701. 1996.

최인재, 남희섭, 산재익, 이병훈 ; 단백질 분해효소에 의한 혼합
단백질의 분해에 관한 연구. 한국식품과학회지. 24(6), 519. 1992.

Antonini, F. M., E. Petruzzi, P. Pinzani, C. Orlando, M. Poggesi,
M. Serio, M. Pazzagli and G. Masotti. 2002. The meat in the
diet of aged subjects and the antioxidant effects of carnosine.
Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl, Vol.8, 7-14.

Aristoy, M. C. and F. Toldra. 1998. Concentration of Free
Amino Acids and Dipeptides in Porcine Skeletal Muscles with
Different Oxidative Patterns. Meat Science, Vol.50, No.3,
327-332.

Boldyrev, A., E. Bulygina, T. Leinsoo, I. Petrushanko, S.
Tsubone and H. Abe. 2004. Protection of neuronal cells against
reactive oxygen species by carnosine and related compound.
Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Vol.137,
81-88.

Boldyrev, A., H. Abe, S. Stvolinsky and O. Tyulina. 1995. Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species:a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol*, Vol.112B, No.3, 481-485.

Djenane, D., L. Martinez, A. S. Escalante, J. A. Beltran and P. Roncales. 2004. Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. *Food Chemistry*, Vol.85, 453-459.

Diez, R. P. and E. J. Baran. 2003. A density functional study of some physical properties of carnosine. *Journal of Molexular Structure(Theochem)*, Vol.621, 245-251.

Decker, E. A., A. D. Crum and J. T. Calvert. 1992. Differences in the Antioxidant Mechanism of Carnosine in the Presence of Cooper and Iron. *J. Agric. Food Chem*, Vol. 40, 756-759.

Gariballa, S. E. and A. J. Sinclair. 2000. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and Aging*, Vol.29, 207-210.

Gopalakrishnan, J., E. A. Decker and W. J. Means. 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Science*, Vol.52, 101-110.

Hipkiss, Alan. R. 1998. Carnosine, a protective, anti-aging peptide?. *Biochemistry and Cell Biology*, Vol.30, 863-868.

Hipkiss, A. R., C. Brownson and M. J. Carrier. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol.122, 1431-1445.

Hobart, L. J., I. Seibel, G. S. Yeargans and N. W. Seidler. 2004. Anti-crosslinking properties of carnosine: Significance of histidine. *Life Science*, Vol.75, 1379-1389.

Huang, S. C. and J. C. Kuo. 2000. Concentrations and Antioxidative Activity of Anserine and Carnosine in Poultry Meat Extracts Treated with Demineralization and Papain. *Proc. Natl. Sci. Counc. Roc(B)*, Vol.24, No.4, 193-201.

Kantha, S. S., M. Takeuchi, S. Watabe and H. Ochi. 2000. HPLC

Determination of carnosine in commercial canned soups and natural meat extracts. *Lebensm. Wiss. u-Technol*, Vol.33, 60-62.

Lee, B. J., J. H. Park, Y. S. Lee, M. H. Cho, Y. C. Kim and D. G. Hendricks. 1999. Effect of Carnosine and Related Compounds on Glucose Oxidation and Protein Glycation In Vitro. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.32, No.4,370-378.

Lee, B. J., Y. S. Lee, K. S. Kang, M. H. Cho and D. G. Hendricks. 1999. Carnosine and Related Compounds Protect

Aganist Copper-Induced Damage of Biomolecules. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.32, No.4, 350-357.

Moya, V. J., M. Flores, M. C. Aristoy and F. Toldra. 2001. Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. *Meat Science*, Vol.58, 197-206.

Nagasawa, T., T. Yonekura, N. Nishizawa and D. D. Kitts. 2001. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol.225, 29-34.

Purchas, R. W., S. M. Rutherford, P. D. Pearce, R. Vather and B. H. P. Wilkinson. 2004. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q₁₀, and creatine. *Meat Science*, Vol.66, 629-637.

Pegova, A., H. Abe and A. Boldyrev. 2000. Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, Vol.127, 443-446.

Seidler, N. W., G. S. Yeargans and T. G. Morgan. 2004. Carnosine disaggregates glycated α -crystallin: an in vitro study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.427, 110-115.

Shao, L., Q. H. Li and Z. Tan. 2004. L-Carnosine reduce telomere damage and shortening rate in cultured normal

fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.324, 931-936.

Torreggiani, A., P. Taddei, A. Tinti and G. Fini. 2002. Vibrational study on the cobaltbinding mode of Carnosine. Journal of Molecular Structure, Vol.641, 61-70.

Torreggiani, A., G. Fini and G. Bottura. 2001. Effect of transition metal binding on the tautomeric equilibrium of the carnosine imidazolic ring. Journal of Molecular Structure, Vol.565-566, 341-346.

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. Journal of Food Drug Analysis, Vol.11, No.2, 148-453.

Yeargans, G. S. and N. W. Seidler. 2003. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.300, 75-80.