

뱀장어 *Anguilla japonica* 추출 Carnosine의 항산화 효과

이근태* · 송호수 · 박성민
부경대학교 식품생명공학부

Antioxidant Effects of Carnosine Extracted from the Eel *Anguilla japonica*

Keun-Tai LEE*, Ho-Su SONG and Seong-Min PARK

Department of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Ion-exchange chromatography and ultra-filtration permeation were used to extract carnosine from the eel *Anguilla japonica*. In an investigation of its antioxidant properties, the eel carnosine prevented lipid peroxidation in linoleic acid systems, scavenged free radicals, and exhibited superoxide dismutase-like activity. These activities increased as the carnosine concentration increased. The nitrite scavenging effects (NSEs) of commercial carnosine and the eel carnosine were measured at various acidic pHs (1.2, 3.0, and 4.2). For both types of carnosine, the maximum NSE was observed at pH 1.2. At this pH, the NSE of the eel carnosine was 65.3%. Both types of carnosine were effective at maintaining reasonably good color of ground beef patties over 5 days of storage at 4°C and inhibited metmyoglobin formation as well as lipid peroxidation. These data suggest that the eel carnosine might be useful as a "natural" antioxidant in commercial production and storage of muscle foodstuffs.

Key words: Eel, *Anguilla japonica*, Carnosine, Functional properties, Natural antioxidant

서 론

산화란 물리적 또는 화학적 요인에 의해 한 화학종이 전자를 잃거나 공유결합에서 자기보다 전자를 당기는 힘이 강한 화학종과 결합하여 일어나는 반응으로 식품에서는 당질, 단백질, 지방질 등과 같은 성분의 산화에 의한 품질 열화가 대표적이며, 사람에게서는 생체 내 성분의 산화에 의한 노화에 깊이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다. 항산화제는 이러한 산화를 방지하거나 지연시키는 능력을 가진 화합물을 총칭하는 것으로 산화의 원인물질과 우선적으로 반응함으로써 다른 화합물의 산화를 방지하는 역할을 한다(Kim, 2004). 항산화제에 대한 연구는 과산화 라디칼을 소거하는 효소인 SOD의 발견을 계기로 이것의 활성산소 발생억제 및 생물독성 방어 또는 소거기구 등에 대해 관심을 가지게 되면서 본격적으로 진행되었다(McCord and Fridovich, 1969).

식품 과학 분야에서 항산화제는 주로 유지의 산화억제 또는 지연을 위하여 사용하는 물질이라는 의미가 강하였으나(Frankel, 1996) 최근 항산화제에 의한 산화억제 또는 지연기능이 생체 내에서도 발휘된다는 사실이 알려지면서 항산화제는 이제 식품의 품질보존 차원을 넘어 노화 억제 및 질병 치료제라는 측면에서 접근하는 연구로 전환되고 있는 실정이다(Giese, 1996).

대표적 합성 항산화제로 알려진 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydro-

quinone (TBHQ) 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 많이 사용되어져 왔으나, 이들이 인체에 암을 유발하는 발암성 물질임이 밝혀지면서 식품이나 의약품으로는 사용되지 못하게 되었다(Ito et al., 1983; Branen, 1975). 따라서 최근 20여 년간 인체에 무해한 새로운 항산화제의 개발을 위해 인간이 오랫동안 섭취해왔던 동식물로부터 항산화 효과가 있는 천연물질을 분리하여 이를 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Larson, 1988; Pratt et al., 1990).

천연항산화제 중에서 carotenoid, anthocyanin, α -tocopherol, vitamin C 및 flavonoid 등은 대표적인 식물성 항산화제이며(Burton, 1989; Block and Langseth, 1994), 이들 식물성 항산화제의 경우 항산화 효과는 높지 않은 반면 가격이 비싸고, 특유의 향과 색을 가지고 있어 산업적 이용에 제약을 받고 있다(Decker and Crum, 1993). 동물성 항산화제로는 주로 가축이나 가금류의 근육을 원료로 하여 추출한 저분자 펩타이드가 관심을 끌고 있고, 이들의 항산화 효과에 대한 연구가 최근 매우 활발하게 진행되고 있다(Casteels et al., 1989; Nakazato et al., 1990; Seki et al., 1993; Kohama, 1988). 그러나 해양생물자원을 원료로 한 항산화제의 검색이나 추출 그리고 항산화 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다. Kim et al. (1996, 2000)에 의해 수산가공 부산물을 이용한 기능성 펩타이드 개발에 관한 연구가 시도된 바 있으나 아직 초기 단계에 있다고 할 수 있다(Nam, 1999).

Carnosine은 β -alanine과 histidine이 펩타이드 결합을 이루고 있는 디펩타이드 화합물로서 약 100년 전 러시아 과학자인

*Corresponding author: ktleec@pknu.ac.kr

Gluevitch and Amiradgibi (1900)에 의해 처음으로 발견되었다. 초기 Decker et al. (1992)와 Chan et al. (1993)은 carnosine의 항산화능과 자유라디칼 및 금속이온 제거능에 대해 보고한 바 있으며, 최근 다른 항산화제와는 달리 질병 및 노화와 관련된 반응에 직접적으로 관여할 것이라는 연구결과가 보고되고 있다 (Hipkiss et al., 2001; Kang et al., 2002; Lee et al., 1999). 그러나 carnosine의 효과에 대해서 그 가능성만을 제시하는 수준에서 그치고 있어 향후 이와 관련하여 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 천연항산화제로써의 가능성을 알아보기 위해 뱀장어에서 추출한 carnosine을 대상으로 기능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 뱀장어 *Anguilla japonica*는 부산광역시 남천동 남천해변시장에서 평균체중 300-400 g, 체장 50-70 cm의 뱀장어를 구입하여 살아있는 상태로 실험실로 운반하여 실험에 사용 하였다.

Carnosine과 linoleic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical과 ascorbic acid는 Sigma chemical (St. Louis, MO)에서 구입하였으며 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

시료 전처리

Carnosine 추출을 위해 살아있는 뱀장어를 수육 상에서 3시간 정도 방치시킨 후 즉살시켜 껍질과 두부, 내장, 뼈를 제거한 후 carnosine 추출용 시료로 사용 하였다.

Carnosine 추출

1) 이온교환처리

McManus (1957)의 방법을 변형하여 뱀장어 육에 10배가량의 1% picric acid를 가해 마쇄한 뱀장어 육을 균질화한 후 8,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 상등액을 Dowex-2 chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 단백질 잔여물과 picric acid를 제거하였다.

2) 한외여과처리

Bussayarat et al. (2005)의 방법을 변형하여 추출물의 분자량을 조절하였으며, Amicon 사의 stirred cell 한외여과 장치를 이용하였다. 즉, 저분자 펩타이드인 carnosine 분리를 위해서 가열 처리 및 이온교환 처리한 시료를 membrane filter (XM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)로 걸러서 분자량을 최종 500Da이하까지 조절하였으며 여과액을 -50℃ 이하로 냉동시킨 후 동결건조 하여 실험용 시료로 사용하였다.

Carnosine 함량 측정

Carnosine 함량 측정은 Parker (1966)의 방법에 따라 추출물 1.0 mL에 1.0 mL의 0.04 M versene과 1.0 mL의 20% Na₂CO₃와 diazotized *p*-bromoaniline 용액을 첨가하고 95% ethanol 2 mL

를 첨가한 후 5분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

단백질 함량 측정

추출조건에 따른 단백질 함량의 변화를 살펴보기 위해 Lowry et al. (1951)의 방법에 의거하여 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하여 추출조건에 따른 단백질의 함량변화를 살펴보았다.

철 함량 측정

철 함량 측정은 Stookey (1970)의 방법에 따라 추출물 1.0 mL에 0.2 mL의 sulfuric acid를 가해 용해시킨 후 0.4 mL의 30% hydrogen peroxide를 첨가하여 110℃에서 2시간 동안 가열하고 1.0 mL의 10% hydroxyl amine hydrochloride를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응 시킨 후 1.0 mL의 ammonium acetate buffer를 첨가하고 1 M NaOH를 가해 pH를 6.0으로 조절한다. 그리고 0.5 mL의 ferrozine solution (9 mM)을 첨가한 후 실온에서 5분간 방치 후 562 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산 하였다.

환원력

뱀장어 추출 carnosine의 환원력은 Oyaizu (1988)의 방법에 따라 측정하였다. 대조구로는 탈이온수를 사용하였으며 실험 방법은 다음과 같다. 시료 2 mL에 동량의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 와 1% potassium ferricyanide를 첨가한 혼합물을 50℃에서 20분간 반응시키고 2 mL의 10% trichloroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가한 후 반응물 2 mL에 증류수 2 mL와 0.4 mL의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가하고 정확히 10분후에 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

Scavenging effect on DPPH radical

뱀장어 추출 carnosine의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 시험은 Shimada et al. (1992)의 방법에 따라 측정하였다. 공시험구의 시료로는 탈 이온수를 사용하였으며 0.5 mL의 각각의 시료에 0.4 mM DPPH 시험용액 1.0 mL를 첨가한 후 혼합물을 교반시키고 실온에서 30분간 정치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였으며 소거능은 다음과 같은 방법으로 계산 하였다.

Scavenging effect=

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

과산화물가

과산화물가 (POV)는 AOAC법 (1995)에 따라 유지혼탁액 1 g을 취하여 유기용매 (chloroform: acetic acid =2:3) 30 mL에 녹이고, KI 포화용액 1 mL를 가하여 약 1분간 강하게 진탕한 다음 5분간 암소에 방치한 후 이 용액에 증류수 70 mL를 가하여 1분간 진탕시키고, 전분 지시약 1 mL를 가한 다음 0.01 N

Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하여 다음의 식에 의하여 산출하였다. 유지 혼탁액은 Choi (1999)의 방법에 따라 Linoleic acid 10, 증류수 9, 유화제 1 (Tween80:Span60=1:1)의 비율로 혼합한 다음 여기에 각 비교 항산화제를 첨가하여 균질기 (Homogenizer AM-7)로 7분 동안 균질화 시켜 유지혼탁액을 제조하였으며 60°C에서 14일 동안 저장하면서 과산화 물가를 측정하였다.

$$POV \text{ (meg/kg oil)} = \frac{(T_1 - T_0) \times F \times N \times 1,000}{S}$$

T₁: 시료의 적정값 (mL), T₀: Blank의 적정값 (mL)
 F: Factor (=1), N: Na₂S₂O₃의 노르말 농도
 S: 시료의 양(g)

Superoxide dismutase 유사활성

SOD 유사활성측정은 Marklund and Marklund (1974) 방법에 따라 농도별로 제조한 각 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer (50 mM tris+10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 mL와 7.2×10⁻³ M pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl (1 mL)로 반응을 정지 시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 시험용액 대신 탈이온수를 첨가하여 다음 계산식에 따라 SOD 유사활성 (%)을 계산하였다.

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

A: 시험구의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

색도 측정

뱀장어 carnosine이 저장육의 색도변화에 미치는 효과를 살펴보기 위해 4°C에 저장한 시료를 2.0×2.0×1.5 cm의 크기로 잘라 색차계 (Color techno system Co., Japan JC801)를 이용하여 L* (명도), a* (적색도), b* (황색도) 값을 측정하였다.

Metmyoglobin 측정

Metmyoglobin 측정은 Krzywicki, 1979의 방법에 따라 측정하였다. 분쇄육 (5 g)을 50 mL의 원심튜브에 넣은 후 25 mL의 phosphate buffer (pH 6.8, 40 mM)을 첨가 후 10초간 균질화 시키고 균질화한 시료를 4°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 30분간 원심분리한 후 (2,7600×g, 4°C) Whatman #1로 여과한 상층액을 700 nm, 572 nm, 525 nm에서 각각 흡광도를 측정한 후 다음의 식에 대입하여 계산하였다.

$$\% \text{ MetMb} = 1.395 - [(A572 - A700) / (A525 - A700)] \times 100$$

아질산염 소거능

Gray and Dugan (1975)의 방법에 따라 발암성 물질인 nitrosoamine 생성의 전구체로 작용하는 아질산염 (nitrite)의 소거능을 살펴보았다.

1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 추출물 1 mL를 가하고 여기에 0.1N HCl (pH1.2)과 0.2 M 구연산 완충액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 3.0과 4.2로 조절하고 부피를 10 mL로 하였다.

이액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL, Griess 시약 (30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid 와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것으로 사용직전 조제) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 산출 하였다.

대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하며 아질산염 소거능은 추출액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율 (%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

Carnosine의 추출

Carnosine 추출을 위해 뱀장어 육을 이용하여 이온교환처리와 한외여과를 통해 분자량을 조절한 시료를 대상으로 각종 기능성을 평가하였으며 각각의 처리조건에 따른 함량 변화를 Table 1에 나타내었다. 결과를 살펴보면 이온교환 처리한 추출물을 한외여과법으로 분자량을 조절하였을 때 산화촉진제로 작용할 수 있는 단백질 및 철 함량은 각각 약 47%, 43% 정도 감소되었으며, carnosine 함량은 약 6% 정도 증가하였다. 이에 본 실험에서는 이온교환 처리와 한외여과를 통해 분자량을 조절한 시료를 항산화능 평가용 시료로 사용하였다.

항산화능 평가

환원력

Carnosine은 histidine과 β-alanine이 결합된 이분자 펩타이드로서 carnosine의 항산화능이 둘 중 어느 것에 의해 발현되는지 확인함과 동시에 뱀장어 추출 carnosine의 항산화능을 평가하기 위하여 histidine, β-alanine 및 taurine을 대조구로 하여 환원력을 측정하였다 (Table 2).

β-alanine과 taurine의 경우 농도 증가에 따른 환원력의 차이는 없는 것으로 나타났으나 뱀장어 추출 carnosine 그리고 histidine의 경우 농도에 따라 환원력이 높아지는 결과를 나타내었다. 특히 뱀장어 추출 carnosine이 대조구에 비해 높은 환원력을 나타내었다. Wu et al. (2003)에 따르면 디펩타이드와 유리아미노산과의 환원력을 비교한 결과 anserine이 가장 높은 환원력을 나타내었으며 그 다음으로 carnosine이 높았고 보고하였다. 그리고 히스티딘계 저분자 펩타이드를 구성하고 있는 각각의 유리아미노산 자체의 환원력은 매우 낮았으며 히스티딘계 저분자 펩타이드의 높은 환원력은 대조구들에 비해 전자공여능이 높기 때문이라고 보고하였다.

DPPH 라디칼 소거능

뱀장어 추출 carnosine의 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 대조구로 histidine과 β-alanine, taurine 및 L-ascorbic acid를 사용한 결과 실험구와 대조구 모두 라디칼 소거능을 나타내었는데 β-alanine, taurine 및 L-ascorbic acid의 경우 농도 증가에 따른 라디칼 소거능 증가는 없었다. 그러

Table 1. The effects of ultrafiltration on protein, total Fe and carnosine contents of the eel *Anguilla japonica* extracts using different extraction methods

Treatments	Contents		
	Protein (mg/g)	Total Fe ($\mu\text{g/g}$)	Carnosine ($\mu\text{g/g}$)
Untreated	127.3 \pm 9.2 ^{*a}	ND	12,288.5 \pm 428.4 ^a
Untreated-UF	60.3 \pm 6.9 ^b	ND	7,950.3 \pm 310.3 ^c
IEC	24.6 \pm 3.0 ^d	162.3 \pm 1.6 ^a	10,535.7 \pm 415.2 ^a
IEC-UF	13.0 \pm 3.1 ^e	91.8 \pm 9.0 ^e	11,153.3 \pm 215.7 ^a

ND: not determined.

*Data are expressed as means \pm standard deviation (n=3). IEC, represent the sample which had been extracted by ion exchange; UF, represent the sample which had been extracted by permeate ultrafiltration.

Table 2. Reducing power of free amino acids and the eel carnosine

Sample	Concentration (mg/mL)			
	1	2	3	4
Histidine	**0.016 \pm 0.002	0.02 \pm 0.002	0.028 \pm 0.003	0.033 \pm 0.004
β -Alanine	0.016 \pm 0.002	0.019 \pm 0.002	0.020 \pm 0.006	0.026 \pm 0.007
Taurine	0.018 \pm 0.002	0.019 \pm 0.003	0.018 \pm 0.001	0.018 \pm 0.002
Eel carnosine	0.072 \pm 0.009	0.114 \pm 0.011	0.175 \pm 0.01	0.229 \pm 0.012

*Expressed as mean \pm standard deviation (n=3).

**Absorbance value at 700 nm.

Table 3. Scavenging effect* of free amino acids and the eel carnosine on 0.4 mM DPPH radical (%)

Sample	Concentration (mg/mL)			
	1	2	3	4
Eel carnosine	22.04 \pm 2.39**	24.49 \pm 2.11	27.20 \pm 1.28	32.38 \pm 2.13
Histidine	4.41 \pm 0.77	9.11 \pm 0.15	17.65 \pm 0.99	21.69 \pm 1.09
β -Alanine	6.33 \pm 0.5	7.62 \pm 0.23	8.94 \pm 0.55	10.34 \pm 1.02
Taurine	10.14 \pm 0.82	11.40 \pm 0.55	10.92 \pm 0.58	11.19 \pm 0.40

*Absorbance at 517 nm. The scavenging effect of 1, 2, 3, 4 (mg/mL) ascorbic acid are 28.59%, 29.29%, 29.51, and 29.73%, respectively.

**Expressed as mean \pm standard deviation (n=3).

나 뱀장어 추출 carnosine과 histidine은 농도 증가에 따라 라디칼 소거능도 증가하였다. 뱀장어 추출 carnosine의 라디칼 소거능은 농도별로 22.04 \pm 2.39%, 24.49 \pm 2.11%, 27.20 \pm 1.28% 및 32.38 \pm 2.13%를 나타내 가장 높았다. L-ascorbic acid의 라디칼 소거능은 농도별로 각각 28.59%, 29.29%, 29.51% 및 29.73%로 나타났으며, 기타 유리아미노산 중에서 histidine은 4.41 \pm 0.77%, 9.11 \pm 0.15%, 17.65 \pm 0.99% 및 21.69 \pm 1.09%로 나타났다. 기타 연구결과에 의하면 carnosine이 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 반응하는 능력을 가지고 있다는 것이 확인 되었으며, carnosine의 이러한 기능은 histidine 잔기의 수소 공여에 의한 것으로 추정되고 있다 (Diez and Baran, 2003; Boldrev et al., 1995).

SOD 유사활성

SOD는 활성산소를 제거하는 효소로서 산소를 소비하는

기관에 존재하면서 생체 내에 과잉의 활성산소가 발생하였을 때 이것을 중화하는 작용을 한다고 알려져 있다 (Pokorny et al., 2001). 인간의 경우 노화가 진행되면 SOD의 유도능이 약해지게 되는데 SOD는 인체 내에서 추가로 생성되지 않는 특성을 가지고 있다. 최근 carnosine이 SOD와 유사 활성을 지닌다는 연구결과가 보고되어 있다 (Kohen et al., 1991; Yoshikawa et al., 1991). 따라서 뱀장어 추출 carnosine의 SOD 유사활성을 L-ascorbic acid 및 BHT와 함께 조사하였다 (Table 4).

뱀장어 추출 carnosine의 활성은 L-ascorbic acid와 BHT에 비해 조금 낮았지만 농도가 증가함에 따라 22.59 \pm 0.94%, 30.71 \pm 2.07%, 34.11 \pm 1.09% 및 42.17 \pm 1.25%의 SOD 유사활성도 증가하는 경향을 나타내었다. Kim (2003)에 의하면 carnosine, anserine, homocarnosine은 BHT나 아스코르빈산 보다 SOD 유사활성이 낮지만 알파-토코페놀 보다는 9-14배, 에리스로빈산 (erythrobinic acid) 보다는 1.8-6.3배 정도 높다고 보고하였다.

과산화물가

과산화물가를 측정된 결과 (Fig. 1), 저장 기간 중 linoleic acid의 과산화물가는 큰 폭으로 증가한 반면 뱀장어 추출 carnosine과 L-ascorbic acid를 첨가한 경우 과산화물가의 증가가 억제되는 경향이 나타났으며, 그 효과는 비슷하였다. 특히

Table 4. Comparison of SOD-like activity of the eel carnosine, and various antioxidants

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	SOD like activity (%)		
	Eel carnosine	Ascorbic acid	BHT
100	22.59 \pm 0.94*	32.08 \pm 1.17	22.07 \pm 1.36
200	30.71 \pm 2.07	44.71 \pm 1.44	23.30 \pm 2.04
300	34.11 \pm 1.09	53.45 \pm 1.28	48.56 \pm 0.72
400	42.17 \pm 1.25	63.45 \pm 0.86	63.21 \pm 0.57

*Expressed as mean \pm standard deviation (n=3)

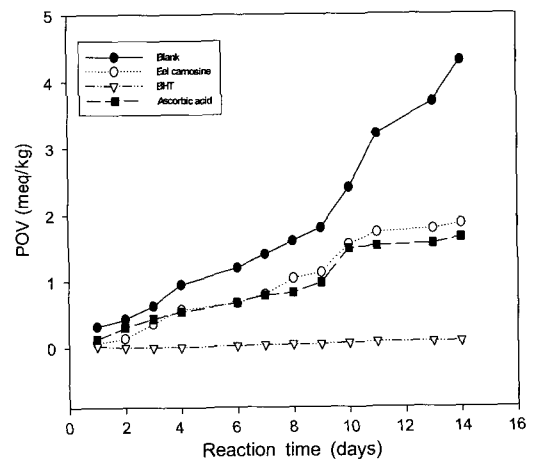


Fig. 1. The effect of eel carnosine and antioxidants on the changes of peroxide value of linoleic acid stored at 60°C for 14 days.

BHT를 첨가한 경우에는 잘 알려진 바와 같이 시험기간 중에 과산화물가의 증가가 나타나지 않았다. Boldyrev et al. (1995)에 의하면 carnosine과 anserine이 지방의 과산화를 억제하는 효과가 있었다고 보고하였으며, linoleic acid의 자동산화에서도 carnosine이 농도 증가에 따라 강한 항산화력을 나타낸다고 보고하였다 (Wu et al., 2003). 이상의 결과에서 뱀장어 추출 carnosine이 L-ascorbic acid와 비슷한 산화억제능을 가진 것으로 나타나 향후 천연항산화제로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

아질산염 소거능 측정

아질산염은 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2, 3급의 아민 등의 아민류와 반응하여 nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있는데 이들 nitrosamine은 대부분이 발암성을 나타내는 물질로 보고되고 있다. 본 실험에서는 pH 1.2, pH 3.0, pH 4.2를 조절하여 아질산염에 대한 소거능을 살펴보았는데 이들 pH 범위는 인체내 위에서의 pH변화를 고려하였으며 합성 carnosine과 뱀장어 추출 carnosine을 동일 농도로 첨가하여 실험한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 결과를 살펴보면 합성 carnosine의 경우 pH 1.2, pH 3.0, pH 4.2에서 각각 37.3%, 23.8%, 14.6%의 아질산염 소거능을 나타낸 반면 뱀장어 추출 carnosine의 경우 65.3%, 57.4%, 55.28%의 소거능을 나타내었으며 두 첨가구 모두 pH가 낮아질수록 높은 소거능을 나타내었는데 이와 유사한 결과로 Kang et al. (1975)에 의하면 아질산염 소거능을 여러 pH조건에서 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 특히 아질산염은 식품 중에 존재하는 amine류와 반응해 생성되는 발암물질인 nitrosamine은 pH가 낮은 조건에서 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있는데 뱀장어 추출 carnosine과 합성 carnosine 모두 pH 1.2에서 가장 높은 소거능을 나타냄으로써 체내에서도 효과적인 아질산염 소거작용을 통해 nitrosamine 생성을 억제할 것으로 생각되어 지며 합성 carnosine이 뱀장어 추출 carnosine에 비해 다소 낮은 아질산염 소거능을 나타내었는데 이는 Kim et al. (2000)에 의하면 합성 펩타이드의 경우 사용한 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 동일한 분자량을 가진 펩타이드라도 N말단기 또는 C말단기에 위치하는 아미노산의 종류가 다르므로 생리활성에 차이가 난다고 보고 하였다. 합성 carnosine의 경우 두개의 아미노산을 정상적인 펩타이드 결합으로 연결하는 대신 hydrazine을 이용하여 amino group의 수를 변화시켜 결합을 유도시키기 때문에 반응성 조절에 따른 어려움 때문에 항산화 효과의 차이가 나타나는 것으로 알려져 있으며 합성 carnosine 제품들을 비교한 결과 hydrazine의 농도에 따라 산화억제능의 차이가 나타난다고 보고하였다 (Armida et al., 2003).

육색의 변화

뱀장어 추출 carnosine을 첨가한 한우육의 저장기간 중 육색의 변화를 비교한 결과를 Table 5에 나타내었다. 대조구로

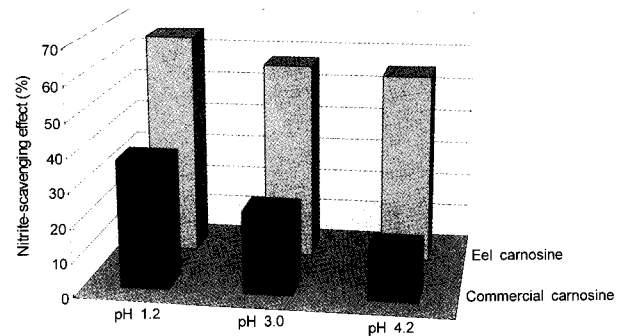


Fig. 2. Nitrite-scavenging effect of eel carnosine and commercial carnosine

Table 5. Effect of carnosine and ascorbic acid on Hunter color values of Ground beef pattie stored in a petri dish

	Day 3			Day 5		
	L	a	b	L	a	b
Control	52.2	9.3	18.3	54.4	11.6	21.1
Ascorbic acid	53.5	10.5	19.6	53.6	11.4	20.8
Commercial carnosine	49.3	8.2	18.7	50.4	10.6	19.9
Eel carnosine	51.9	8.1	18.1	52.6	10.2	19.8

탈이온수를 첨가한 구와 실험구로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid 와 합성 carnosine을 사용하였다. 결과를 살펴보면 명도 (L)는 저장기간이 증가함에 따라 3일째와 5일째를 비교 하면 대조구의 경우 약 4%, L-ascorbic acid의 경우 약 0.18%, 합성 carnosine의 경우 약 2.2% 그리고 뱀장어 추출 carnosine의 경우 1.34%의 명도 증가를 나타내었으며 적색도 (a)는 모두 증가하는 결과를 나타내었으며 황색도 (b)를 측정한 결과를 살펴보면 대조구가 15% 정도 3일째에 비해서 증가한 것으로 나타난 반면에 나머지 실험구의 경우에는 모두 낮은 증가폭을 나타내었다. 일반적으로 육색은 육색소인 미오글로빈이 산소와의 반응으로 나타나며 저장기간의 경과할수록 육색의 변화에 있어 메트미오글로빈 형성율이 증가하기 때문에 육색이 퇴색된다고 알려져 있다. 육색의 변화를 살펴본 결과 대조구에 비해서 항산화제를 첨가한구 모두 육색의 변화는 최소화 되는 결과를 나타내었다.

Metmyoglobin 측정

육색은 철원자의 상태에 따라 달라질 수 있다. 즉 철원자가 환원철인 2가 (Fe²⁺)이면 이를 디옥시미오글로빈 (deoxymyoglobin)이라고 하며 육색은 암적색이 된다. 만약 환원 철원자의 여섯 번째 결합부위에 산소분자가 결합하면 이를 옥시미오글로빈 (oxymyoglobin)이라고 부르고 육색은 밝은 선홍색이 된다. 또 철원자가 산화하여 산화철인 3가 (Fe³⁺)로 되면 육색은 갈색으로 변하며 이를 메트미오글로빈 (metmyoglobin)이라 부르며 이를 육품질의 측정 지표로서 사용하고 있다. 이에 뱀장어 추출 carnosine을 첨가한 한우육의 저장기간 중 메트미오글로빈 변화를 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 대조구로

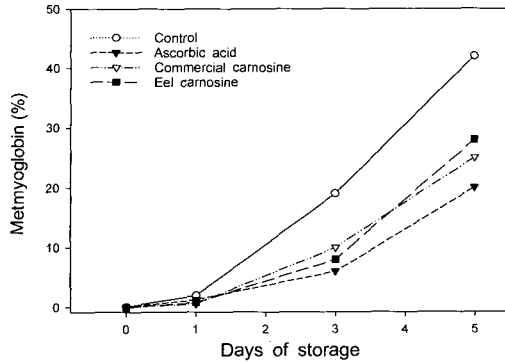


Fig. 3. Metmyoglobin percentage in ground beef patty treated with different antioxidants

는 탈이온수를 첨가한 구와 실험구로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성 carnosine을 사용한 결과, 대조구의 경우 5일째 약 42% 정도의 메트미오글로빈이 생성되었으나 항산화제 첨가구의 경우 대조구에 비해 낮은 결과를 나타내었으나 뱀장어 추출 carnosine 첨가구의 경우에는 합성 carnosine 첨가구에 비해서 약 3% 정도 높게 측정되었는데 이는 합성 carnosine에 비해 뱀장어 carnosine의 경우 천연상태에서 분리, 정제하였기 때문에 극소량 남아있는 잔여물에 의한 영향인 것으로 사료되어지나 천연항산화제인 L-ascorbic acid를 첨가한 경우와도 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. Lee et al. (1999)에 의하면 쇠고기 패티에 carnosine과 ascorbic acid를 첨가하여 저장 실험한 결과 육색의 안정성은 높이면서 메트미오글로빈 형성은 억제 되었다고 보고 하였으며 축산 산업에 사용할 수 있는 유용성 있는 새로운 천연항산화제라고 보고하였다. 뱀장어 추출 carnosine을 첨가한 우육의 냉장 저장에 따른 변화를 살펴본 결과 육색을 지속시키면서 메트미오글로빈의 생성은 억제할 수 있는 천연항산화제로서의 가능성을 가지고 있으며 향후 분리, 정제도를 조금 더 개선할 경우 유용한 천연항산화제로 사료된다

사 사

본 연구는 부경대학교 2005년도 “기성회 학술연구비 지원 사업” 과제의 일부로 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 69-74.
- Armida, S.E., D. Djamel, T. Gaston, G. Begona, A.B. Jose and R. Pedro. 2003. Evaluation of the antioxidant ability of hydrazine-purified and untreated commercial carnosine in beef patties. *Meat Sci.*, 64, 59-67.
- Block, G. and L. Langseth. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.*, 48, 80-85.
- 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.*, 112, 481-485.
- Branen, A.L. 1975. Toxicological and anisole and butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, 52, 59.
- Bucala, R., A. Cerami and H. Vlassara. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabet. Rev.*, 3, 258-268.
- Burton, G.W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutri.*, 119, 110-116.
- Bussayarat, M. and K.O. Intarapichet. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Sci.*, 71, 364-374.
- Casteels, P., C. Ampe and P. Tempst. 1989. Antibacterial peptides from honeybees. *EMBOJ*, 9, 2397-2391.
- Chan, K.M., E.A. Decker and W.J. Means. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.*, 58, 1-7.
- Chasovnikova, L.V., V.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.
- Choi, S.H., K.T. Lee, S.M. Park, B.Y. Son and H.M. Choi. 1999. Studies on hydrothermal extracts from fish head. 1. Chemical composition and physical properties of the extracts. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 537-541.
- Choi, S.Y., H.Y. Kwon, O.B. Kwon and J.H. Kang. 1999. Hydrogen peroxide-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine. *Bioch. Biophys. Acta*, 1472, 651-657.
- Decker, E.A., A.D. Crum and J.T. Calvert. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and Iron. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 756-759.
- Decker, E.A. and A.D. Crum. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Sci.*, 34, 245-253.
- Diez, R.P. and E.J. Baran. 2003. A density functional study of some physical properties of carnosine. *J. Mol. Struct.*, 621, 245-251.
- Frankel, E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their on food quality. *Food Chem.*, 57, 51.
- Gayiva, 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.

- Giese, J. 1996. Antioxidants: Tool for preventing lipid oxidation. *Food Technol.*, 50, 73.
- Gray, J.I. and L.R. Dugan, Jr. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.*, 40, 981-984.
- Gulevitch, V.S. and S. Amiradgibi. 1900. Uber das carnosine, eine neueorganische base des fleischextraktes, *ber. Deusch. Chem. Ges.*, 33, 1902.
- Hipkiss, A.R., C. Brownson and M.J. Carrier. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech. Age. Develop.*, 122, 1431-1445.
- Ito, N., S. Fukushima, A. Hasegawa, M. Shibata and T. Ogiso. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 343.
- Kang, J.H., K.S. Kim, S.Y. Chol, H.Y. Kwon, M.H. Won and T.C. Kang. 2002. Carnosine and Related Dipeptides protect human ceruloplasmin against peroxyl radical-mediated modification. *Mol. Cells*, 13, 498-502.
- Kang, Y.H., Y.K. Park, S.R. Oh and K.D. Moon. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 27, 978-984.
- Kim, S.K., H.C. Lee and Y.J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.*, 29, 246-255.
- Kim, S.K., Y.I. Choi and J.H. Choi. 2000. Screening of Biofunctional peptides from cod processing wastes. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43, 225-227.
- Kim, Y.G. 2004. Antioxidant. Ryomoongak Press, Seoul, Korea, 1-3.
- Kim, W.S. 2003. Antioxidant activity and safety evaluation of carnosine, anserine and homocarnosine isolated from Spent Hen. Ph.D. Thesis, Duksung Women's University, Seoul, Korea, 1-94.
- Kohama, Y. 1988. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155, 332-336.
- Kohen, R., R. Misgav and I. Ginsburg. 1991. The SOD like activity of copper : carnosine, copper : anserine and copper : homocarnosine complexes. *Free Rad. Res. Comm.*, 12, 179-185.
- Krzywicki, K. 1979. Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Sci.*, 3, 1-10.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969.
- 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. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 32, 370-378.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 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.
- McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- McManus, I.R. 1957. Some metabolic precursors of the N-1-methyl group of anserine in the rat. *J. Bio. Chem.*, 225, 325-334.
- Nakazato, M., J. Asai, M. Mitazato and H. Matsuo. 1990. Isolation and identification of isletamyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. Peptides*, 31, 179-186.
- Nam, H.S. 1999. Development of bioactive peptides and its market trend. *Food Ind. Nutri.*, 4, 17-19.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35, 771-775.
- Parker, C.J., Jr. 1966. Spectrophotometric determination of carnosine and anserine in muscle. *Anal. Chem.*, 38, 1359-1362.
- Partt, D.E. and B.J.F. Hudson. 1990. Natural antioxidant not exploited commercially. In: *Food Antioxidants*. Elsevier, 168-171.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva and M. Gordan. 2001. Antioxidants in Food. *CRC*, 71, 291-294.
- Seki, E.K., Osajima, T. Matsui and Y. Osajima. 1993. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Hogyo Gakkaishi*, 40, 783-791.
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidant of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 945-948.
- Stookey, L.L. 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, 42, 779-781.
- 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. Food Drug Anal., 11, 148-453.

Yoshikawa, T., Y. Nanito, T. Tanigawa, T. Yoneta and M. Kondo. 1991. The antioxidant properties of a novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopro-

pionyl)-L-histidine to zinc. Biochem. Biophys. Act., 1115, 15-22.

2007년 7월 23일 접수

2007년 8월 27일 수리