pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 5, pp. 513~520 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.5.513

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

다랑어 육으로부터 분리한 Histidine 함유 저분자 Peptide의 항산화 효과

김홍길[1] · 송호수[2]*
[1]식품의약품안전처 부산지방식품의약품안전청
[2]영산대학교 조리예술학부

Antioxidant Effect of Histidine-Containing Low-Molecular-Weight Peptides Seperated from Tuna Meat

Hong Kil Kim[1], Ho-Su Song[2]*
[1]*Ministry of Food and Drug Safety Food Safety Pusan Regional Office and Food and Drug Safety, Busan, Korea*
[2]*Division of Culinary Arts, Youngsan University, Busan, Korea*

(Received October 6, 2020/Revised October 7, 2020/Accepted October 8, 2020)

ABSTRACT - Here, we evaluated the functional properties of histidine-containing low-molecular-weight (LMW) peptides obtained from tuna waste meats. As with histidine-related components composed of histidine, 1-methyl histidine and anserine, histidine-containing LMW peptides exhibited high α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging effect in a dose-dependent manner. Among the histidine-related dipeptides, anserine exhibited the highest reducing power followed by carnosine. By comparison with dipeptides, tuna extracts also showed similar reducing power and the activity was in a dose-dependent manner. In addition, the antioxidant activities of tuna extracts such as DPPH radical scavenging effect, reducing power, superoxide dismutase activities, and peroxide value of linoleic acid were affected by the various extraction methods.

Key words : Tuna, Dipeptide, Anserine, Carnosine, Antioxidant activity

생체활동에 필요한 에너지는 음식물에 의한 영양소가 호흡으로 인하여 체내로 유입된 산소와 결합하는 대사의 반복으로 얻어질 수 있으며 이러한 과정에 의해 반응성이 높은 산소산물로 변화하는데 이들을 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 또는 반응성 산소물 이라고 일컫는다. 이렇게 생성된 활성산소종으로는 O_2^- (superoxide anion), HO· (hydroxyl radical), $^1O_2$ (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide), HOCl (hypochlorous acid) 들이 존재한다. 이들을 제거시키는 기전에는 크게 두 가지로, 첫째는 항산화 효소계로 각 활성산소에 특이적으로 작용하여 이들을 제거하는 것으로, O_2^-를 제거하는 superoxide dismutase (SOD)가 대표적이며 그 외 H_2O_2를 제거하는 catalase 및 glutathion peroxide 등이 있다. 둘째는 항산화 물질로 산화를 방지하거나 지연시키는 능력을 가진 화합물을 총칭하는 것으로 산화의 원인물질과 우선적으로 반응함으로써 다른 화합물의 산화를 방지하는 역할을 한다[1]. 대표적 합성 항산화제로 알려진 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone (TBHQ) 등이 있으며 이들이 인체에 암을 유발하는 발암성 물질임이 밝혀지면서 식품이나 의약품으로는 사용되지 못하게 되었다[2,3]. 천연항산화제 중에서 carotenoid, anthocyanin, α-tocopherol, vitamin C 및 flavonoid 등은 대표적인 식물성 항산화제이며[4,5], 이들 식물성 항산화제의 경우 항산화 효과는 높지 않은 반면 가격이 비싸고, 특유의 향과 색을 가지고 있어 산업적 이용에 제약을 받고 있다. 이에 인체에 무해한 새로운 항산화제의 개발을 위해 인간이 오랫동안 섭취해왔던 동식물로부터 항산화 효과가 있는 천연물질을 분리하여 이를 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다[6].

정상적인 산소에 비해 활성산소는 체내에서 머무는 시간은 아주 짧지만 활성화되어 있는 시간동안의 활성산소는 정상세포에 대단히 큰 영향을 끼쳐 세포막의 변성을

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

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

불러오고, 그로 인해 세포내의 DNA, RNA 등의 핵산들의 산화를 촉진시켜 생체전달 신호체계를 교란하거나 파괴하며[7,8], 혈액과 세포내 당질은 단백질이나 DNA와 결합하게 되는데 이것을 당화(glycation)라고 하며 당산화(glycoxidation) 반응을 거쳐 당과 단백질이 결합된 최종당화산물(Advanced Glycation Endproducts, AGE)을 형성하게 된다[9,10].

이에 천연 저분자 peptide는 관능성, 영양, 표면활성, 항산화적의 측면에서 연구가 이루어지고 있으며[11], 그 중 histidine 함유 저분자 peptide는 항산화능, 자유라디칼과 금속이온 소거능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 다른 항산화제와 달리 활성산소제거 뿐만 아니라 산화적 스트레스로 인한 단백질의 기능성 저하 감소와 최종당화산물에 대한 저항성 증가 등의 성인병 및 노화억제에 깊이 관련하고 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 천연항산화제로써의 가능성을 알아보기 위해 다랑어육으로부터 추출한 histidine 함유 저분자 peptide의 기능성을 검토하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에 사용한 황다랑어(*Thunnus albacares*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*) 육은 ㈜서영티엔비(Busan, Korea)에서 제공받아 histidine 함유 저분자 peptide의 분리정제용 시료로 사용하였다. 다랑어 육은 가슴살 부위로 10 kg 박스로 포장하여 -70°C의 심온에 저장하면서 사용하였다. Anserine과 carnosine, L-histidine, 3-methyl-histidine, β-alanine, ascorbic acid, linoleic acid등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis. MO, USA)에서 구입하였으며 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

다랑어육의 전처리

다랑어육을 흐르는 냉수에 해동하여 외부의 젤라틴 성분을 제거한 후 내부의 뼈와 응고혈을 제거하여 histidine 함유 저분자 peptide의 추출용 시료로 사용하였다.

Histidine 함유 저분자 peptide의 추출

가열 추출

Min과 Song[12]의 방법에 따라 육 중량의 2배의 탈 이온수를 가하여 grinder (51BL30, Waring Co., Morgan Hill, CA, USA)에서 2분간 2회 마쇄한 후 homogenizer (PH-91, SMT Co., Tokyo, Japan)로 (12,000 rpm, 2 min, 4 times) 균질화하여 원심분리 (10,000×g, 20 min, 4°C)시켜 침전물을 제거한 후 이를 다시 80°C에서 10분간 가열처리 후 원심분리 (10,000×g, 10 min, 4°C)하여 침전물을 제거한 후 Whatman #5A 필터로 여과 한 후 0.45 μm 필터로 재여과하였다.

1차 이온교환: Min과 Song[12]의 방법에 따라 다랑어 육 일정량에 2배 분량의 1% picric acid를 첨가하여 마쇄한 후 homogenizer (PH-91, SMT Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 균질화시켜 원심분리 (8,000×g, 30 min, 4°C) 하였다. 이를 Whatman No. 5A필터로 여과하여 침전물을 제거하였다. 그리고 Dowex 2×8-400 (Sigma, St. Louis., MO, USA) chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 이온교환함으로써 picric acid로부터 유리시켰다.

한외여과: 1% picric acid를 이용하여 1차 이온교환한 추출물을 Bussayarat[13]의 방법에 따라 한외여과장치 stirred cell ultrafiltration (Amicon Co., Beverly, MA, USA) 장치를 이용하여 50 psi에서 한외여과 하였다. 한외여과막 (YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)을 이용하여 분자량을 최종 500 MWCO (molecular weight cut off)이하로 조절하였다.

2차 이온교환: 1차 이온교환 및 한외여과한 추출물을 Chan 등[14]의 방법에 따라 CM-cellulose column (2.5×40 cm)을 이용하여 이온교환크로마토그래피를 하였다. 각 추출물의 동결건조를 통하여 단계별 추출물 및 동결물의 항산화능 및 기능성 조사의 샘플로 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법에 따라 측정하였다[15]. 공시험구는 탈 이온수를 사용하였으며, 시료 2 mL에 각각 95% ethanol에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 첨가한 후 교반 한 후 실온에서 30분간 방치하여 자외선 분광계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거 능을 측정하였다.

환원력 측정

환원력은 Lee 등[16]의 방법에 따라서 측정하였다. 대조구로는 탈이온수를 사용하였으며, 시료 2 mL에 phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) 2 mL와 2 mL의 1% potassium ferricyanide를 첨가한 후 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후 2 mL의 10% trichloroacetic acid를 각각의 반응물에 첨가한 후 반응물 2 mL에 증류수 2 mL와 0.4 mL의 0.1% ferric chloride를 시험관에 첨가한 후 10분 후에 자외선분광계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다.

Superoxide dismutase 유사활성

SOD 유사활성 측정은 농도별로 제조한 각 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer (50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 mL 와 7.2×10^{-3} M pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 한 후 1 N HCl 1.0 mL로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다[17]. 공시험구는 탈이온수를 사용하였으며, 다음 식에 따라 SOD 유사활성을

계산하였다.

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

A: 시험구의 흡광도 B: 대조구의 흡광도

Linoleic acid 계 자동산화 억제

Linoleic acid를 기질로 하여 지방산화의 중간생성물인 과산화물가를 측정하였다[18]. 유지혼탁액은 50 mM linoleic acid (95% EtOH)와 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 pH 7.0으로 조절하여 linoleic acid와 유화제를 10:1의 비율로 제조하였으며, 추출물은 linoleic acid 기준으로 1%를 첨가하였다. 산화를 촉진시키기 위하여 60°C의 암소에 보관하면서 산화 억제능을 비교하였다.

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

T_1 : 시료의 적정값(mL) T_0 : Blank의 적정값(mL)
F : Factor (≒1) N : $Na_2S_2O_3$의 Normal 농도
S : 시료의 양(g)

아질산염 소거능

아질산염 소거능은 1 mM $NaNO_2$용액 2 mL에 각 추출물 1 mL를 가하여 0.1 N HCl (pH 1.2)과 0.2 M citric acid Buffer (pH 3.0, 4.2)로 조정하고 부피를 10 mL로 조절하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL 취하여 2% acetic acid 5 mL를 첨가한 다음 Griess reagent 0.5 mL를 가하여 혼합시킨 후 실온에서 15분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 측정하였다[19]. 대조구는 Griess reagent을 대신해 탈 이온수를 사용하여 같은 방법으로 실시하였으며, 아질산염 소거능은 추출액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 나타내었다.

통계분석

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

Results and Discussion

다랑어 추출 histidine 함유 저분자 peptide의 DPPH 라디칼 소거능

다랑어 추출 histidine 함유 저분자 펩타이드중 carnosine과 anserine 결합하는 구성아미노산중 항산화능이 어느 것에 의해 발현되는지 확인함과 동시에 다랑어 추출물의 항산화능을 비교하기 위해 histidine과 1-methylhistidine β-alanine 및 합성 항산화제인 ascorbic acid와 BHT를 대상으로 농도별 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다(Table 1).

Histidine, 1-methylhistidine, carnosine과 anserine을 포함한 histidine 관련 화합물과 다랑어에서 추출한 histidine 함유 저분자 peptide는 DPPH 라디칼 소거능력을 지녔고, 농도가 증가함에 따라 효과 또한 증가했다. 반면 histidine을 함유하지 않은 β-alanine과 taurine의 라디칼 소거능은 미약하였다. 황다랑어, 눈다랑어 원육 동결물은 소거능이 약했으며, 단백질 침전이 발생했으며 농도증가에 따라 라디칼 소거능이 증가하지 않았다. Histidine과 1-methylhistidine의 라디칼 소거능은 농도증가에 따라 유사하게 증가하는 결과를 보였으며, 이들과 β-alanine이 결합한 carnosine과 anserine보다는 약한 소거능을 나타냈다. 항산화제인 BHT의 라디칼 소거능은 잘 알려진 바와 같이 높게 나타났으며, ascorbic acid의 라디칼 소거능은 33.98±2.85%, 37.80±1.60%, 42.72±1.82%, 56.41±0.44%로 나타났다. 다랑어 추출물은 2차 이온교환 처리물이 carnosine과 anserine의 dipeptide와 유사한 결과를 나타냈다. 가열처리와 한외여과를 병행한 경우와 이온교환과 한외여과 처리를 한 동결물의 경우의 황다랑어와 눈다랑어 추출물은 5 mg/mL의 농도에서 ascorbic acid와 유사한 라디칼 소거능을 나타냈으며, 이는 동일 농도에서 2차 이온교환 처리구에 비해 라디칼 소거능을 지닌 histidine과 carnosine등의 저분자 화합물을 더 포함하고 있기 때문에 ascorbic acid 와 유사한 라디칼 소거능을 나타냈다고 보여진다.

다랑어 추출 histidine 함유 저분자 peptide의 환원력

다랑어 추출물과 histidine 함유 dipeptide 및 이를 구성하는 histidine, 1-methylhistidine, β-alanine과 taurine 및 합성 항산화제인 ascorbic acid와 BHT를 대상으로 농도별 환원력을 측정하여 나타냈다(Table 2). Histidine 함유 dipeptide 중에서 anserine이 가장 높은 환원력을 나타내었으며, carnosine은 두 번째로 강한 환원력을 나타내었다. Histidine에 비해 1-methylhistidine이 높은 환원력을 나타내었으며, dipeptide와 함께 농도가 증가할수록 환원력이 증가하였다. β-Alanine과 taurine, 다랑어 원육 동결물은 환원력이 낮게 나타났으며, 농도 증가에 따라 환원력이 증가하지 않았다. 항산화제인 BHT나 ascorbic acid와 비교하여 histidine 관련물질과 다랑어 추출물의 환원력이 낮게 나타났으나 dipeptide와 비교하여 황다랑어, 눈다랑어 추출물이 높은 환원력을 나타내었다, 특히 가열처리와 한외여과를 병행한 구와 이온교환과 한외여과를 병행한 추출물에서 라디칼 소거능과 유사하게 동일농도에서 histidine과 carnosine이 상대적으로 높게 함유되어 환원력이 높게 나타난 결과로 사료되어 진다. 이러한 결과는 선행연구의 결과와 동일하게 나타났으며[20], anserine과 carnosine이 전자 공여체이고 유리

Table 1. DPPH radical scavenging effect(%)* of dipeptides, free amino acids and freeze-dried tuna extracts

Samples	Concentrations (mg/mL)			
	0.5	1	2	5
YF Raw	2.57±0.51^{hi**}	3.27±1.00^{g}	4.76±0.34^{jk}	5.27±0.70^{i}
BE Raw	1.40±0.35^{i}	2.03±1.25^{g}	3.05±2.29^{k}	3.88±1.84^{i}
YF 80°C-UF	18.33±0.37^{b}	22.65±2.22^{b}	30.32±1.48^{b}	58.06±0.95$^{a\,b}$
BE 80°C-UF	18.19±0.66^{b}	19.06±1.52^{c}	28.93±1.69^{bc}	52.78±3.6^{c}
YF IEC-UF	18.07±0.46^{b}	24.63±1.21^{b}	26.01±3.29^{cd}	56.24±1.41^{b}
BE IEC-UF	14.04±0.46^{c}	18.97±0.76^{c}	22.96±3.72^{de}	59.54±1.03^{a}
YF IEC-2	8.01±0.66^{de}	9.21±0.92^{e}	13.57±0.69^{h}	29.20±1.14^{f}
BE IEC-2	8.42±0.46^{d}	9.30±1.52^{de}	15.59±2.90^{gh}	38.27±0.48^{d}
Carnosine	8.65±0.54^{d}	10.82±1.45^{de}	18.28±0.6^{gh}	33.84±0.51^{e}
Anserine	9.06±1.03^{d}	12.71±0.83^{d}	20.66±1.0^{ef}	39.24±0.63^{d}
Histidine	6.61±0.27^{ef}	6.91±0.73^{f}	8.49±0.82^{i}	14.89±0.70^{g}
1-Methyl histidine	5.32±0.37^{fg}	6.77±1.52^{f}	7.64±1.92^{ij}	16.51±0.33^{g}
β-Alanine	2.69±0.90^{hi}	3.08±0.83^{g}	5.84±0.92^{ijk}	7.85±1.25^{h}
Taurine	4.14±0.21^{gh}	5.89±0.32^{f}	7.54±0.42^{ij}	7.68±0.82^{h}
Ascorbic acid	33.98±2.85^{a}	37.80±1.60^{a}	42.72±1.82^{a}	56.41±0.44^{b}

*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).
YF: Yellow tuna, BE : Big eye tuna.
Raw: Represent the sample without heated treatment.
80°C UF: Represent the sample which had been extractedby heating 80°C for 15 min and ultrafiltration (UF).
IEC-UF: Ion exchange chromatography(Dowex 2×8) treated and ultrafiltration(molecular weight cut off 500<).
IEC-2: Ion exchange chromatography(Dowex 2×8) treated and ultrafiltration(molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromatography(CM-cellulose) treated.

Table 2. Reducing power* of dipeptides, free amino acids and freeze-dried tuna extracts

Samples	Concentrations (mg/mL)			
	0.5	1	2	5
YF Raw	0.011±0.002^{b**}	0.013±0.001^{e}	0.014±0.001^{i}	0.015±0.002^{f}
BE Raw	0.009±0.001^{b}	0.011±0.002^{e}	0.014±0.002^{i}	0.016±0.002^{f}
YF 80°C-UF	0.119±0.002^{b}	0.134±0.002^{b}	0.344±0.002^{b}	0.773±0.160^{b}
BE 80°C-UF	0.096±0.002^{b}	0.105±0.006^{c}	0.234±0.003^{c}	0.584±0.004^{c}
YF IEC-UF	0.090±0.001^{b}	0.126±0.001^{bc}	0.206±0.002^{d}	0.475±0.004^{d}
BE IEC-UF	0.084±0.001^{b}	0.116±0.002^{bc}	0.206±0.004^{d}	0.491±0.008^{d}
YF IEC-2	0.024±0.001^{b}	0.044±0.002^{d}	0.052±0.002^{e}	0.166±0.003^{e}
BE IEC-2	0.023±0.001^{b}	0.043±0.002^{d}	0.058±0.002^{e}	0.159±0.003^{e}
Carnosine	0.016±0.001^{b}	0.034±0.003^{de}	0.047±0.002^{ef}	0.094±0.003^{ef}
Anserine	0.023±0.001^{b}	0.045±0.001^{d}	0.058±0.001^{e}	0.096±0.006^{ef}
Histidine	0.018±0.001^{b}	0.029±0.001^{de}	0.031±0.003^{gh}	0.040±0.001^{f}
1-Methyl histidine	0.022±0.001^{b}	0.032±0.001^{de}	0.038±0.002^{fg}	0.057±0.001^{f}
β-Alanine	0.018±0.001^{b}	0.020±0.001^{de}	0.023±0.001^{ij}	0.024±0.001^{f}
Taurine	0.007±0.001^{b}	0.010±0.001^{e}	0.016±0.001^{i}	0.019±0.001^{f}
Ascorbic acid	1.483±0.575^{a}	2.179±0.053^{a}	2.218±0.029^{a}	2.384±0.066^{a}

* Absorbance at 700nm. The reducing power of 0.5, 1, 2, 5 (mg/mL) BHT are 2.415±0.009, 2.738±0.029, 3.279±0.055, and 3.942±0.050 respectively.
** Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3).
Means within a measurement with different letters were significantly different(P <0.05).
YF : Yellow tuna, BE : Big eye tuna
Raw : Represent the sample without heated treatment
80°C UF : Represent the sample which had been extractedby heating 80°C for 15 min and ultrafiltra-tion (UF)
IEC-UF : Ion exchange chromatography (Dowex 2×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<)
IEC-2 : Ion exchange chromatography (Dowex 2×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and Ion exchange chromato-graphy (CM-cellulose) treated.

라디칼을 더욱 안정적인 생산물과 종결 라디칼 체인 반응으로 전환시킬 수 있다는 것을 나타내었으며, 다랑어 추출물 또한 그러한 능력이 있다는 것을 나타냈다.

다랑어 추출 histidine 함유 저분자 peptide의 SOD 유사활성

인체 내 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)는 산소를 소비하는 기관에 존재하면서 활성산소의 첫 번째 생성물인 과산화 음이온을 제거하며[21], superoxide anion radical의 손상효과를 보호하는 역할과 이후 항산화 효소를 재생하는 것으로 보고되고 있다[22]. SOD는 단백질 활성 위치에 결합된 전위금속 이온에 따라 Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으며[17], histidine 함유 dipeptide의 Cu/Zn-SOD활성이 보고된바 있다[23,24]. 이에 농도별 SOD 유사활성을 다랑어에 추출물과 histidine계 dipeptide 및 taurine, asccorbic acid와 함께 조사하였다(Table 3).

가장 높은 활성을 나타낸 것은 ascorbic acid 와 taurine의 순으로 34.7-94.3%, 15.4-64.2%의 활성을 나타냈으며, carnosine, anserine, β-alanine, histidine 1-methyl histidine의 순으로 11.6-43.0%, 14.2-38.5%, 6.4-35.5%, 2.2-29.1%, 2.7-27.0%의 활성을 나타냈다. 다랑어 추출물의 경우 원육에서의 SOD 유사활성은 약했으나, 가열처리와 한외여과를 병행하였을 때, 황다랑어 눈다랑어 추출물이 각각 4.0-19.4%, 5.7-20.6%로 나타났으며, 이온교환과 한외여과를 병행하였을 때, 8.3-27.9%, 5.4-25.0%로, 2차 이온교환 처리를 하였을 때, 8.2-29.5%, 8.6-32.1%로 활성이 증가하였다. Kim[18]에 의하면 histidine 함유 dipeptide의 SOD 유사활성은 ascorbic acid나 BHT 보다 약하지만 α -tocopherol (9-14배), erythorbic acid (1.8-6.3배) 보다 높은 활성을 나타낸다고 하였다.

다랑어 추출 histidine 함유 저분자 peptide의 linoleic acid계 자동산화 억제

Histidine 함유 dipeptide와 다랑어 추출물과 두 가지의 비교 항산화제를 첨가한 linoleic acid의 자동산화의 억제를 저장 기간에 따른 과산화물의 변화를 측정하여 Fig. 1. 에 나타내었다. 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구의 과산화물의 함량이 증가하였다가 저장 7일경에 최고치에 달했다가 8일경에 감소하는 결과를 나타내었다. 저장 7일

Table 3. Comparison of SOD like activity (%)* of dipeptides, free amino acids and freeze dried tuna extracts

Samples	Concentrations (mg/mL)			
	0.5	1	2	5
YF Raw	0.88±0.58^{h**}	2.39±1.15^{gh}	3.02±0.75^{j}	4.08±1.07^{k}
BE Raw	0.63±0.58^{h}	2.50±1.87^{h}	2.01±0.79^{j}	2.91±1.01^{k}
YF 80°C-UF	4.04±0.79f^{g}	5.03±1.78f^{gh}	11.32±1.36^{i}	17.37±1.07^{j}
BE 80°C-UF	5.68±2.86e^{f}	6.16±1.14e^{fg}	12.08±1.36^{i}	20.63±1.05^{i}
YF IEC-UF	8.33±1.37^{d}	9.56±2.27^{cde}	16.35±1.15^{gh}	27.97±1.05^{gh}
BE IEC-UF	5.43±1.16^{ef}	7.30±2.24^{def}	16.48±0.95^{h}	25.76±1.23^{h}
YF IEC-2	8.21±0.58^{d}	9.69±0.95^{cde}	19.87±0.58^{gh}	30.89±1.46^{f}
BE IEC-2	8.59±1.22^{d}	10.19±1.36^{cde}	20.25±0.29^{f}	35.08±1.67^{e}
Carnosine	11.62±0.58^{c}	12.33±1.23^{cd}	28.55±0.87^{c}	43.01±1.52^{c}
Anserine	14.27±0.95^{b}	13.08±3.21^{c}	25.28±1.13^{d}	38.46±1.75^{d}
Histidine	2.15±1.87^{gh}	7.30±3.14^{def}	17.99±0.44^{g}	29.14±1.93^{fg}
1-Methyl histidine	2.65±1.00^{gh}	8.93±1.33cde	14.97±1.33^{h}	27.04±1.93^{gh}
β-Alanine	6.44±1.00^{de}	11.45±2.00^{cde}	22.52±0.95^{e}	35.55±0.40^{e}
Taurine	15.40±0.79^{b}	31.72±1.15^{b}	39.32±1.00^{b}	50.22±2.05^{d}
Ascorbic acid	34.72±1.75^{a}	70.44±2.83a	94.21±0.58^{a}	94.29±0.20^{a}

* The results are shown as [{1-(Blank absorbance/Sample absorbance)}/Blank absorbance]×100%.

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

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

YF : Yellow tuna, BE : Big eye tuna.

Raw : Represent the sample without heated treatment.

80°C UF : Represent the sample which had been extractedby heating 80°C for 15 min and ultrafiltra-tion (UF).

IEC-UF : Ion exchange chromatography (Dowex 2×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<).

IEC-2 : Ion exchange chromatography (Dowex 2×8) treated and ultrafiltration (molecular weight cut off 500<) and ion exchange chromato-graphy (CM-cellulose) treated.

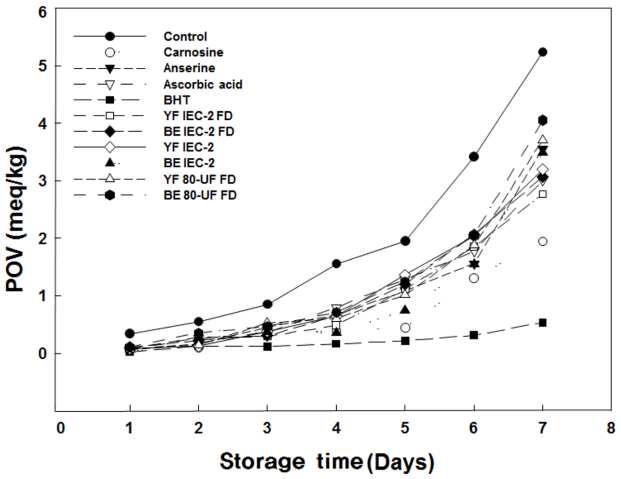

Fig. 1. The effect of carnosine, anserine, freeze-dried tuna extracts and antioxidants on the change of peroxide value of linoleic acid stored at 60°C for 7 days.

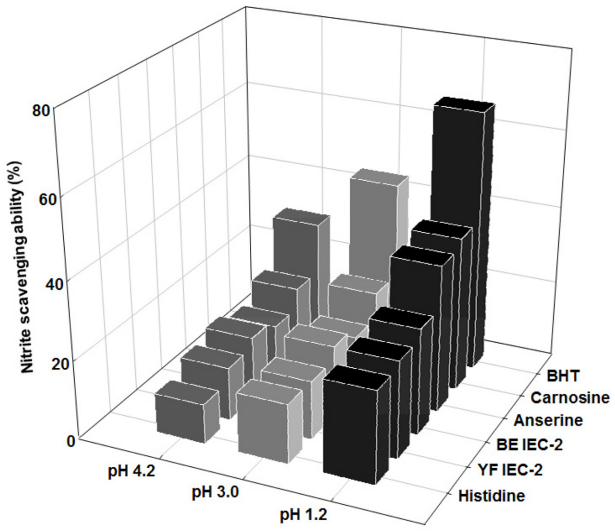

Fig. 2. Nitrite scavenging ability of carnosine, anserine and freeze-dried tuna extracts.

동안 linoleic acid에 대한 대조구의 과산화물은 저장 초기에 비해 15배로 증가한 반면 BHT를 첨가한 경우에는 저장기간 중에 과산화물이 거의 증가하지 않은 것을 나타내었고, ascorbic acid를 첨가한 경우에는 8배가 증가하였으며, carnosine을 첨가한 경우에는 저장 7일 째 5배가량의 과산화물이 증가하여 ascorbic acid를 첨가한 경우 보다 낮은 과산화물의 함량을 나타내었다. Anserine의 경우 비교항산화제와 비교하였을 때 저장 초기 5일 까지는 비교적 안정된 산화억제효과를 나타내었지만, 이 후 크게 증가하여 7일 이후 10배 가량으로 과산화물이 증가하는 것으로 나타났다. 다랑어 추출물과 동결건조물의 지질산화 억제능은 저장 7일 째 8-10배가량 증가하였으며, BHT나 carnosine 보다 낮은 억제능을 나타내었지만, CM-cellulose의 처리 동결건조물은 ascorbic와 유사한 값을 나타내어 지질산화능이 높은 것으로 나타났다. 가열처리와 가열처리 한외여과 동결건조 추출물의 경우 anserine과 유사하거나 낮은 과산화물의 값을 나타내었으며, 대조구와 비교하여 시간경과에 따른 항산화지속성이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 carnosine과 anserine이 지방의 과산화를 억제하는 효과가 있다는 보고와 일치하였으며[25], 가다랑어 엑스분과 눈다랑어 추출물 등이 linoleic acid 모델의 지질산화를 억제한다는 보고와 일치하였다[26,27].

아질산염 소거능 (Nitrite-scavenging ability)

아질산염은 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2,3급 등의 아민류와 반응하여 nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있는데, 이들 nitrosamine은 대부분 발암성을 나타내는 물질로 보고되고 있다. 본 실험에서는 인체 내의 pH 변화를 고려하여 pH 1.2, pH 3.0, pH 4.2로 조절하여 아질산염의 소거능을 살펴보았다(Fig. 2). Carnosine과 anserine, 그리고 합성 항산화제인 BHT와 황다랑어, 눈다랑어 추출물을 동일 농도로 첨가하여 실험한 결과 pH 1.2, pH 3.0, pH 4.2에서 각각 carnosine의 경우 39.91%, 21.43%, 14.37%의 아질산염 소거능을 나타내었으며, anserine의 경우 37.99%, 21.43%, 6.48%로 carnosine과 유사한 결과를 나타내었다. Histidine의 경우 23.84%, 10.53%, 16.23%로 pH 1.2, pH 3.0에서는 carnosine과 anserine보다 약간 낮은 소거능을 나타내었지만 pH 4.2에서는 약간 높은 소거능을 보였다. 황다랑어 추출물의 경우 25.14%, 15.09%, 13.71%, 눈다랑어 추출물은 27.44%, 18,28% 18.09%로 pH 1.2, pH 3.0에서 carnosine과 anserine보다 낮지만 pH 4.2에서 histidine에 보다 높은 소거능을 보였다. 합성항산화제인 BHT의 경우 67.10%, 42.22%, 30.94%로 가장 높은 아질산염 소거능을 나타냈다.

아질산염 소거작용은 pH의 조건과 밀접한 관련을 가지는 것으로 보이며, 위산의 환경과 유사한 pH 1.2의 조건에서 아질산염 소거능이 가장 크게 나타났으며 저 산성 조건에서 형성될 수 있는 nitrosamine과 같은 독성물질 생성을 억제할 것으로 생각되어진다.

Acknowledgement

이 연구는 2020년 영산대학교 교내연구비의 지원을 받아 수행되었음

국문요약

다랑어로부터 추출한 histidine 함유 저분자 peptide의 항

산화능을 평가한 결과, histidine, 1-methylhistidine, carnosine과 anserine을 포함한 histidine 관련 화합물과 다랑어에서 추출한 histidine 함유 저분자 peptide는 DPPH 라디칼 소거능력을 지녔고, 농도가 증가함에 따라 효과 또한 증가하였다. 다랑어 추출물은 2차 이온교환 처리물이 carnosine과 anserine의 dipeptide와 유사한 결과를 나타냈으며, 가열처리와 한외여과를 병행한 경우와 이온교환과 한외여과 처리를 한 동결물의 경우 ascorbic acid와 유사한 라디칼 소거능을 나타냈다. Histidine 함유 dipeptide 중에서 anserine이 가장 높은 환원력을 나타내었으며, carnosine은 두 번째로 강한 환원력을 나타내었다. Dipeptide와 비교하여 황다랑어, 눈다랑어 추출물이 높은 환원력을 나타내었으며, 농도가 증가할수록 환원력이 증가하였다. 다랑어 추출물 원육에서의 SOD 유사활성은 약했으나, 가열처리와 한외여과를 병행하였을 때, 황다랑어 눈다랑어 추출물이 농도별로 4.0-19.4%, 5.7-20.6%로 나타났으며, 이온교환과 한외여과를 병행하였을 때, 8.3-27.9%, 5.4-25.0%, 2차 이온교환 처리를 하였을 때, 8.2-29.5%, 8.6-32.1%로 활성이 증가하였다. Linoleic acid를 기질로 하여 저장기간에 따른 자동산화의 중간생성물인 과산화물의 변화를 측정한 결과 CM-cellulose의 처리 동결건조물은 ascorbic와 유사하게 지질산화능이 높은 것으로 나타났다. 인체 내의 pH 변화를 고려하여 pH 1.2, pH 3.0, pH 4.2로 조절하여 아질산염의 소거능을 살펴보았을 때, 황다랑어 추출물의 경우 25.14%, 15.09%, 13.71%, 눈다랑어 추출물은 27.44%, 18,28% 18.09%로 pH 1.2, pH 3.0에서 carnosine과 anserine보다 낮지만 pH 4.2에서 histidine 보다 높은 소거능을 보였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Hong Kil Kim https://orcid.org/0000-0002-1101-6249
Ho-Su Song https://orcid.org/0000-0003-3933-5863

References

1. Kim, Y.G., 2004. Antioxidant. Ryomoongak press, Seoul, Korea, pp. 1-3.
2. Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso. T., Carcinogenicity of bytylated hydroxy antisole in 344 rats. *J. Natl. Cancel Inst*., **70**, 343 (1983).
3. Branen, A.L., Toxicological and anisole and butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, **52**, 59 (1975).
4. Burton, G.W., Antioxidant action of cartenoids. *J. Nutri.,* **119**, 110-116 (1989).
5. Block, G., Langseth, L., Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.,* **48**, 80-85 (1994).
6. Larson, R.A., The antioxidants of higher plants. *Phycochemistry*, **27**, 969 (1988).
7. Adelson, R., Saul, R.L., Ames, B.N., Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **85**, 2706-2708 (1988).
8. Song, H.S., The effect of carnosine extracted from eels *Anguilla japonica* on oxidative DNA damage induced by hydrogen peroxide and the DNA repair capacity of human leukocytes, *J. Korean Fish Soc.,* **50(5)**, 520-526 (2017).
9. Song, H.S., Lee K,T., Park, S.M., Kang O.J., Inhibitory effects of eel (*Anguilla japonica*) extracted carnosine on protein glycation, *J. Korean Fish Soc.,* **42(2)**, 104-108 (2009).
10. Thornalley, P.J., Advanced glycation and the development of diabetic complications. Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. *Endocrinol. Metab.,* **3,** 149-166 (1999).
11. Huang, S.C., Kuo, J.C.C., Concentration and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. Proc. Natl. Sci. Counc. *Repub China part B Life Sci.,* **24**, 193-201 (2000).
12. Min, H.O., Song, H.S., Antioxidant effect of anserine extracted from salmon (*Oncorhynchus keta)*, *J. Food Hyg. Saf.,* **34(4)**, 396-403 (2019).
13. Bussayarat, M., Intarapiche,. K.O., Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Sci.,* **71,** 364-374 (2005).
14. Chan, K.M., Decker, E., Means, W.J., Extraction and activity of carnosine a natually occuring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.,* **58**, 1-7 (1993).
15. Shimada, K., Fujikawa. K., Yahara, K., Nakamura, T., Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.,* **40**, 945-948 (1992).
16. Lee, K.T., Song, H.S., Park, S.M., Antioxidant activities of carnosine, extracted from eel *(Anguilla japonica) J. Korean Fish Soc.,* **40**, 193-200 (2007).
17. Marklund, S., Marklund, G., Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.,* **47**, 469-474 (1974).
18. Kim, W.S., 2003. Antioxidant activity and safety evaluation of carnosine, anserine and homocarnosine isolated from spent hen. PhD thesis. *Duksung women's university* of Korea, pp. 1-93.
19. Gray, J.I., Dugan, L.R., Inhibition of N-nitrosamine formation in model system. *J. Food Sci.,* **40**, 981-984 (1975).
20. Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M., Chiou, T.K., Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. Food Drug Anal*., **11**, 148-153 (2003).
21. Halliwell, B., Free radicals, reactive oxygen spices, and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.,* **70**, 737-757 (1989).

22. Packer, L., Colman, C., 1999. The antioxidant miracle: Your complete plan for total health age healing. Johm Wiley and Sons Inc. USA, pp. 1-274.
23. Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Kwon, O.B., Kang, J.H., Hydrogen peroxide-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine. *Biochimica. et Biophysica. Acta.,* **1472**, 651-657 (1999).
24. Kang, J.H., Kim, K.S., Choi, S.Y,. Kwon., H.Y., Won, M.H., Kang, T.C., Protective effects of carnosine, homocarnosine and against peroxyl radical-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase modification. *Bioche. et Biophysica. Acta.,* **1570**, 89-96 (2002).
25. Boldyrev, A., Abe, H., Stvolinsky, S., Tyulina O., Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species: a comparative study. *Biochem. Physiol.,* **112(3)**, 481-485 (1995).
26. Oh, K.S., Lee, E.H., Kim, M.C., Lee, K.H., Antioxidative activities of skipjack meat extract. *Bull. Kor. Fish. Soc.,* **20(5)**, 441-446 (1987).
27. Koizumi, C., Ohshima,, T., Wada., S., Inhibitory effect of bigeye tuna meat extract on sodium chlorite-catalyzed oxidation of linoleate. *Bull. of Jap. Soc. of Sci. Fish.,* **50(2)**, 275-280 (1983).