

## 연어(*Oncorhynchus keta*) 추출물 중의 Anserine, 단백질 및 철분 함량에 미치는 추출방법의 영향

민혜옥<sup>1</sup> · 박인명<sup>2</sup> · 송호수<sup>3</sup>

<sup>1</sup>부산식품의약품안전청

<sup>2</sup>영산대학교 동양조리학과

<sup>3</sup>영산대학교 서양조리학과

### Effects of Extraction Method on Anserine, Protein, and Iron Contents of Salmon (*Oncorhynchus keta*) Extracts

Hye-Ok Min<sup>1</sup>, In-Myoung Park<sup>2</sup>, and Ho-Su Song<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Busan Regional Office of Food and Drug Safety

<sup>2</sup>Department of Oriental Cuisine and Culinary Arts and

<sup>3</sup>Department of Western Cuisine and Culinary Arts, Youngsan University

**ABSTRACT** Effects of extraction methods on reducing concentrations of pro-oxidants (total iron and protein) of salmon was determined. For development of the extraction process, the effectiveness of several extraction methods was determined and compared, including heat treatment (60, 80, and 100°C), ion exchange and carboxymethyl (CM)-cellulose column chromatography, and ultrafiltration (UF). Protein, total iron, and anserine contents of salmon extracts were 23.64 mg/mL, 16.20 µg/mL, and 5.47 mg/mL in non-heated extracts, 7.40 mg/mL, 2.32 µg/mL, and 5.20 mg/mL in heated extracts at 60°C, 7.64 mg/mL, 1.20 µg/mL, and 5.21 mg/mL at 80°C, and 7.04 mg/mL, 0.68 µg/mL, and 4.04 mg/mL at 100°C, respectively. Heating and UF decreased contents of protein and total iron, whereas only UF slightly decreased anserine content. Application of the primary ion exchange method increased the content of anserine up to 16%. Protein and total iron contents by the primary ion exchange method decreased by 70 and 98%, respectively. Secondary ion exchange (CM-cellulose) treatment after primary ion exchange and UF resulted in lower anserine content than the primary ion exchange method. However, the content of impurities (protein, total iron) was lower than in all other salmon extracts. Therefore, primary ion exchange, UF, and secondary ion exchange method were the best extraction processes in this study.

**Key words:** anserine, ion exchange treatment, pro-oxidants, salmon (*Oncorhynchus keta*)

## 서 론

Anserine은 β-alanine과 1-methylhistidine이 결합한 히스티딘계 저분자 펩타이드로 거위 근육에서 처음으로 발견되었다(1). Anserine은 특히 연어, 다랑어, 가다랑어와 같은 회유성 어류의 백색육에 많이 존재하며(2-4), 조류와 파충류에서도 다량으로 함유된 것으로 보고되었다(5). 주로 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 추출은 축육 및 가공류를 대상으로 이루어져 왔으며 이러한 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 자유라디칼 소거능과 지질산화 억제능 등 항산화능에 대해 보고된 바 있다(6).

근육 추출물 중에는 이러한 anserine 외에도 철과 heme

을 함유한 화합물이 존재하며, 비단백질과 결합한 철, 즉 저분자 철의 경우 지방 산화를 촉진하는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical을 생성시키며 hem-in, metmyoglobin과 methemoglobin과 같은 heme 함유 화합물은 *in vitro*에서와 생체막에서 지방 산화의 촉매작용을 한다(7,8). 현재 유리철과 철단백질과 같은 산화촉진제의 함량 감소를 위해 가열처리, 한외여과처리(9) 등이 사용되고 있으나, 이러한 방법은 유리철과 철단백질과 같은 산화촉진제의 함량 감소와 함께 anserine의 농도도 감소하여, anserine의 농도는 높이 유지하면서 유리철과 철단백질과 같은 산화촉진제의 함량을 감소시킬 수 있는 좀 더 효과적인 추출방법이 필요하다.

또한, 추출 시 축육을 이용할 경우 구제역 및 광우병에 대한 우려로 이용 가능성에 다소 제약을 받는다는 단점이 있으며, 현재 해양생물자원인 수산물을 이용한 연구는 상대적으로 극히 미비한 실정으로 anserine의 효율적인 추출방법 또한

Received 29 September 2016; Accepted 19 January 2017

Corresponding author: Ho-Su Song, Department of Western Cuisine and Culinary Arts, Youngsan University, Busan 48015, Korea  
E-mail: hssong@ysu.ac.kr, Phone: +82-51-540-7142

아직 보고된 바가 없는 실정이다. 이에 수산물을 이용하여 산화촉진물의 함량은 낮추면서 anserine의 함량을 높이 유지할 수 있는 더욱 효과적인 추출방법이 필요하다고 생각한다.

이에 본 연구에서는 수산물 중 한국산 연어를 이용한 기능성 천연 저분자 펩타이드 추출방법 개발을 통해 상업적인 적용 가능성을 검토하고자 하였으며, 이에 다양한 방법으로 anserine을 추출 후 각 추출 방법에 따른 산화촉진물의 함량을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 시약

본 실험에서 사용한 한국산 연어(*Oncorhynchus keta*, 11월, 동해안, 강릉산)는 평균 길이 62.80±4.89 cm, 둘레 30.85±2.52 cm, 무게 2.28±0.42 kg으로 -80°C에 동결하여 사용하였다.

Anserine과 *N*-methyl-L-histidine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene은 Tokyo Kasei Kogyo Co.(Tokyo, Kanto, Japan)에서 구입하였고 그 외의 모든 시약은 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

### 시료 전처리

Anserine 추출을 위해 동결상태의 연어를 일정 시간 해동시킨 후 두부와 껍질 그리고 뼈, 혈액 및 내장을 제거하여 anserine 추출용 시료로 사용하였다.

### 일반성분 분석

일반성분 정량은 AOAC 방법에 따라 수분함량은 105°C 상압건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl법, 조지방 함량은 Soxhlet법, 조회분은 직접회화법으로 정량하였다(10).

### 유리아미노산 분석

유리아미노산은 Seo 등(11)의 방법에 따라 연어육 5 g에 5-sulfosalicylic acid 0.5 g을 첨가하여 제단백시킨 후 원심분리(3,000×g, 15 min, 4°C) 하였다. 상층액을 0.2 µm membrane filter로 여과한 다음 lithium citrate buffer(pH 2.2)로 일정량을 희석하여 이것을 분석액으로 하였다. 이온교환 추출물의 경우 액상 상태의 추출물을 취하여 0.02 N HCl로 희석해 아미노산 자동 분석기(Hitachi Amino Acid Analyzer L-8900, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

### Anserine 추출

**가열추출:** 연어의 가열추출처리는 Gopalakrishnan 등(12)의 방법에 따라 연어육 일정량에 2배의 탈이온수(4°C)를 가하여 마쇄(60 s, 2회)한 연어육을 homogenizer(PH-

91, SMT Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 균질화(10,000 rpm, 2 min, 4회)시킨 후 원심분리(8,000×g, 30 min, 4°C) 하였다. 원심분리 후 Whatman No. 5A 필터(Whatman, London, UK)를 이용하여 여과함으로써 침전물을 제거하였고 이 액을 각각 60°C, 80°C, 100°C에서 15분간 가열 처리하여 다시 원심분리(8000×g, 20 min, 4°C) 시켜 Whatman No. 5A 필터(Whatman)를 사용하여 침전물을 제거하였다(Fig. 1).

**1차 이온교환처리:** Suyama 등(13)의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 연어육 일정량에 2배 분량의 1% picric acid를 첨가하여 마쇄한 후 homogenizer(PH-91, SMT Co.)를 이용하여 균질화시켜 원심분리(8,000×g, 30 min, 4°C) 하였다. 이를 Whatman No. 5A 필터로 여과하여 침전물을 제거하였다. 그리고 Dowex 1×8 chloride column(2.5×30 cm; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 이온 교환함으로써 picric acid로부터 유리시켰다.

**한외여과처리:** 각각 가열 처리한 추출물과 1% picric acid를 이용하여 1차 이온교환처리 한 추출물을 Bussayarat와 Kanokorn(14)의 방법에 따라 stirred cell ultrafiltration(Amicon Co., Beverly, MA, USA) 장치를 이용하여 50 psi에서 한외여과 하였다. 한외여과막(XM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)을 이용하여 분자량을 500 이하로 조절하였다(Fig. 1).

**2차 이온교환처리:** 1차 이온교환처리 및 한외여과처리 한 추출물을 Chan 등(9)의 방법에 따라 CM-cellulose column(2.5×40 cm)을 이용하여 이온교환 크로마토그래피를 하였다(Fig. 1). 먼저 1 mM sodium phosphate buffer(pH 3.5)를 흘려 평형화시킨 뒤 10 mM sodium phosphate buffer(pH 8.5)도 동일한 방법으로 충분히 흘려주어 안정화한 후 추출액을 칼럼에 주입해 분당 2 mL씩 분취 받았으며 표품인 anserine이 최대 흡광도 수치를 나타내는 212 nm에서 흡광도를 측정하여 높은 값을 나타내는 분취물을 모았다(Fig. 2).

### 단백질 함량 측정

각 추출조건에 따른 단백질의 함량 측정은 Gornall 등(15)의 방법에 따라 biuret법으로 측정하였다. 추출물 1 mL에 biuret 시약 4 mL를 혼합하여 암소에 30분 방치시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였으며 검량식을 작성한 후 각 추출물에 따른 단백질 함량 변화를 측정하였다.

### 총철 함량 측정

총철 함량의 측정은 Viollier 등(16)의 방법을 변형하여 실험하였다. 추출물 3 mL에 10 mM ferrozine 용액 300 µL를 첨가하고 환원시약(2 M HCl에 hydroxylamine hydrochloride를 1.4 M의 농도로 제조) 450 µL를 가하여 교반 후 10분간 반응시켰다. 그리고 10 M ammonium acetate

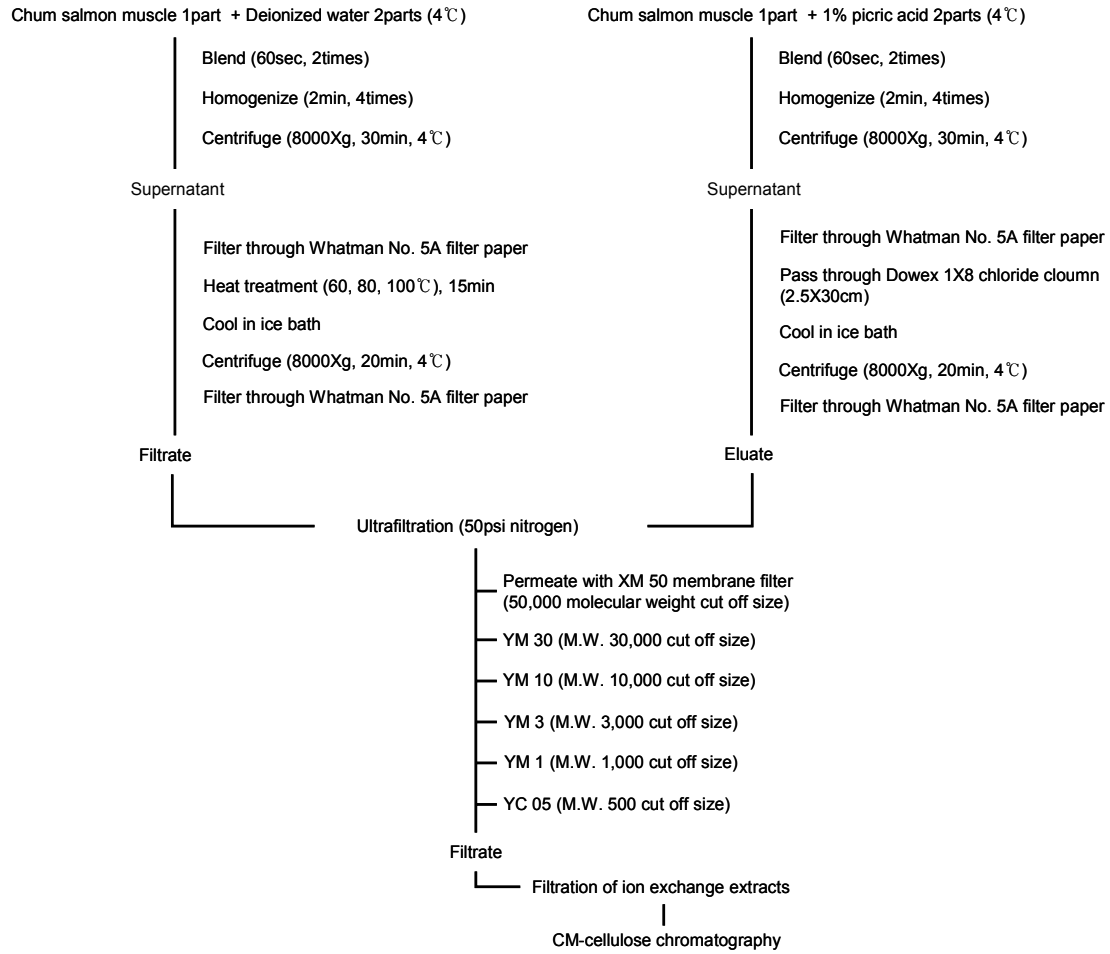


Fig. 1. Extraction procedure for anserine from chum salmon.

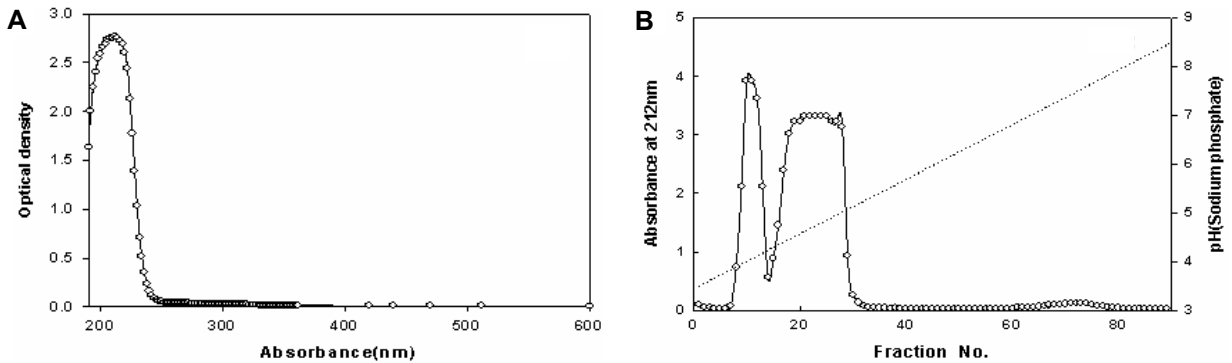


Fig. 2. CM-cellulose ion exchange chromatography pattern of salmon anserine. A, O.D of anserine standard; B, O.D of salmon anserine extracts.

buffer(pH 9.5) 150  $\mu$ L를 첨가한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량식에 대입함으로써 각 추출물의 총철 함량을 측정하였다.

**Anserine 함량 측정**

Anserine 함량 측정은 Parker(17)의 방법에 따라 실험하였다. 추출물 1 mL에 4% NaHCO 0.8 mL와 FDNB 용액

0.2 mL를 가한 후 55°C에서 30분간 반응시키고 10 N NaOH 0.1 mL와 20% HCl 1 mL를 혼합시켰다. 에테르 2 mL를 가한 후 가운함으로써 에테르층을 휘발시키고 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 anserine(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 검량식을 작성하였으며 각 추출물에 대한 anserine 함량을 분석하였다.

### SDS-PAGE

연어 추출물 각각의 정제 정도를 알아보기 위해 SDS 전기영동을 하였다. 전기영동은 Laemmli(18)의 방법에 따라 Mini-Protein 3(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 실험하였다. 20% polyacrylamide gel을 사용하였으며 시료를 각각 20  $\mu$ L씩 주입하고 25 mM Tris-192 mM glycine 완충용액(pH 8.3)을 전극액으로 사용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 SDS-gel의 염색은 Coomassie blue R-250(Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA, USA)을 사용하였으며 염색이 끝난 겔은 glacial acetic acid/MeOH/H<sub>2</sub>O 혼합액(v/v/v=1:1:8)으로 탈색하였다.

### HPLC 분석

각 추출조건에 따른 차이를 알아보기 위해 Song 등(19)의 방법에 따라 HPLC(Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 분석을 하였다. 추출물 25  $\mu$ L에 동량의 탈이온수를 첨가한 후 50  $\mu$ L NaHCO buffer(100 mM, pH 8.3)와 4 mM의 Dabsyl-Cl 용액 200  $\mu$ L를 혼합하여 70~72°C에서 15분간 방치시켰다. 방치 후 700  $\mu$ L의 NaHPO<sub>4</sub> buffer(50 mM, pH 7.0)를 첨가하고 0.2  $\mu$ m membrane filter로 여과한 다음 HPLC에 10  $\mu$ L를 주입하였다. 칼럼은 C-18(5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 25 cm)을 사용하였으며 이동상 용매는 sodium acetate buffer(25 mM, pH 6.5)와 acetonitrile을 사용하였다. 유속은 1 mL/min, 칼럼의 온도는 40°C, 검출과장은 436 nm로 분석하였다.

### LC/MS를 이용한 질량 분석

최종 정제된 물질을 LC/MS(API 2000, Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였다. 이동상은 water/ACN/MeOH=35/30/35(4 mM AF, pH 2.6)를 사용하였고, 칼럼은 Symmetry(150 $\times$ 3.9 mm, 5  $\mu$ m, 1 mL/min)를 이용하였다.

### 통계처리

실험결과와 통계처리는 SAS version 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 하였으며 조사 항목 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법으로  $P < 0.05$  수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 일반성분 분석

연어의 일반성분 분석 결과는 Table 1과 같다. 수분 76.34 $\pm$ 0.31%, 단백질 20.45 $\pm$ 0.04%, 지질 3.75 $\pm$ 1.20%, 회분 1.26 $\pm$ 0.04%로 나타났으며, 이는 연어의 종류에 따른 일반성분을 분석한 Heu 등(20)의 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

**Table 1.** Proximate composition of chum salmon (*O. keta*)

Ingredient	Content (%)
Moisture	76.34 $\pm$ 0.31 <sup>1)</sup>
Crude protein	20.45 $\pm$ 0.04
Crude lipid	3.75 $\pm$ 1.20
Crude ash	1.26 $\pm$ 0.04

<sup>1)</sup>Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3).

### 유리아미노산 분석

연어육의 유리아미노산 조성은 Table 2와 같이 모두 33종의 아미노산이 검출되었으며 총 함량은 2,485.91 mg/100 g으로 분석되었다. 각각의 유리아미노산 함량을 살펴보면 anserine, lysine, alanine, leucine, taurine, glutamic acid 등의 순으로 나타났으며, 그중 anserine이 전체 유리아미노산의 약 43.06%를 차지하였고 histidine과 carnosine은 각각 1.58%, 0.11%로 나타났다. 따라서 히스티딘계 저분자 펩타이드 중 histidine과 carnosine의 함량은 낮으면서 상대적으로 anserine의 함량이 높으므로 anserine 추출용 시

**Table 2.** Free amino acids composition of chum salmon muscle

Free amino acids	Content (mg/100 g)
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
$\beta$ -Alanine	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	1,070.51
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- $\delta$ -Hydroxylysine	5.37
Total	2,485.91

료로서 연어가 적합하다고 판단된다.

Lukton과 Olcott(21)의 연구 결과에 의하면 연어류의 근육에는 anserine이 풍부하며 연어 이외에도 다랑어류, 상어류, 고래류에도 많이 분포하는 것으로 보고하였다(22). 또한, Park 등(23)의 연구에서 본 연구와 같은 종의 한국산 연어(*O. keta*)의 유리아미노산을 분석한 결과 724~1,242 mg으로 유사한 결과를 나타냈다.

### 추출방법에 따른 함량 변화

**가열처리:** 가열처리에 따른 추출물의 단백질, 총철, anserine의 함량 변화는 Table 3과 같다. 단백질 함량의 경우 60°C, 80°C, 100°C로 가열 처리하였을 때 각각 7.40±0.39 mg/mL, 7.64±0.04 mg/mL, 7.04±0.28 mg/mL로 비가열 처리구에 비해 각각 약 69%, 68%, 71% 정도 감소하였으며, 총철 함량 또한 온도 증가에 따라 86%, 93%, 96% 정도 감소하는 것으로 나타났다. Maikhunthod와 Intarapichet (14)은 가열처리가 구상 단백질의 응집현상에 의해 변성을 일으키고 이러한 변성 단백질은 용해성이 감소하여 원심분리를 통해 침전, 분리함으로써 단백질의 함량을 감소시킬

**Table 3.** Effects of heat treatment and ultrafiltration on the contents of protein, iron and anserine in salmon extracts

Treatments	Contents		
	Protein (mg/mL)	Iron (µg/mL)	Anserine (mg/mL)
Unheated	23.64±0.21 <sup>a1)</sup>	16.20±0.09 <sup>a</sup>	5.47±0.22 <sup>a</sup>
Unheated-1	6.00±0.64 <sup>d</sup>	2.94±0.06 <sup>b</sup>	4.46±0.26 <sup>abc</sup>
Unheated-2	5.42±0.13 <sup>de</sup>	1.60±0.07 <sup>f</sup>	4.35±0.56 <sup>abc</sup>
Unheated-3	5.22±0.12 <sup>ef</sup>	0.64±0.02 <sup>ghi</sup>	4.32±0.32 <sup>abc</sup>
Unheated-4	4.46±0.04 <sup>f</sup>	0.42±0.03 <sup>ijk</sup>	3.09±0.08 <sup>bc</sup>
60°C	7.40±0.39 <sup>bc</sup>	2.32±0.02 <sup>c</sup>	5.20±0.63 <sup>ab</sup>
60°C-1	7.50±0.23 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>hijk</sup>	4.93±0.56 <sup>ab</sup>
60°C-2	5.40±0.44 <sup>de</sup>	0.50±0.05 <sup>ghijk</sup>	4.67±0.60 <sup>abc</sup>
60°C-3	4.98±0.28 <sup>ef</sup>	0.34±0.01 <sup>kl</sup>	4.16±0.57 <sup>abc</sup>
60°C-4	5.16±0.31 <sup>ef</sup>	0.34±0.02 <sup>kl</sup>	2.58±0.52 <sup>c</sup>
80°C	7.64±0.04 <sup>b</sup>	1.20±0.12 <sup>c</sup>	5.21±0.15 <sup>ab</sup>
80°C-1	6.76±0.20 <sup>c</sup>	0.94±0.02 <sup>f</sup>	4.15±0.21 <sup>abc</sup>
80°C-2	6.78±0.29 <sup>c</sup>	0.74±0.03 <sup>fg</sup>	4.86±0.50 <sup>ab</sup>
80°C-3	4.98±0.09 <sup>ef</sup>	0.52±0.02 <sup>ghijk</sup>	4.03±0.34 <sup>abc</sup>
80°C-4	4.48±0.28 <sup>f</sup>	0.30±0.01 <sup>kl</sup>	3.26±0.24 <sup>abc</sup>
100°C	7.04±0.28 <sup>bc</sup>	0.68±0.02 <sup>gh</sup>	4.04±0.31 <sup>abc</sup>
100°C-1	5.40±0.48 <sup>de</sup>	0.58±0.01 <sup>ghij</sup>	5.22±0.28 <sup>ab</sup>
100°C-2	6.06±0.04 <sup>d</sup>	0.42±0.02 <sup>ijk</sup>	4.51±0.35 <sup>abc</sup>
100°C-3	4.68±0.07 <sup>ef</sup>	0.40±0.01 <sup>ijk</sup>	3.78±0.28 <sup>abc</sup>
100°C-4	4.68±0.22 <sup>ef</sup>	0.14±0.01 <sup>l</sup>	2.49±0.24 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Data are expressed as mean±standard deviation (n=3).

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

Untreated: sample without heated treatment and water extract. 60°C, 80°C, 100°C: samples which had been water extracted by heating to 60, 80, 100°C for 15 minutes.

1, ultrafiltration (molecular weight cut off 30,000<); 2, ultrafiltration (molecular weight cut off 10,000<); 3, ultrafiltration (molecular weight cut off 3,000<); 4, ultrafiltration (molecular weight cut off 500<).

수 있으며, 그리고 산화촉진제로 작용할 수 있는 철 함유 단백질 또한 제거됨으로써 총철 함량도 감소한다고 보고하였다. Anserine 함량은 비가열처리구에 비해 60°C와 80°C 가열처리구가 약 5% 정도 감소하였으나 80°C의 경우 비가열처리구와 유의적으로 큰 차이는 없었으며 100°C 가열처리구는 anserine의 함량이 26% 정도 감소하는 것으로 분석되었다. 각 온도에서 가열 처리한 결과 100°C 가열처리구가 총철과 단백질 등 불순물 제거에 가장 효과적이었으나 anserine 함량의 감소가 큰 것으로 나타났다. Igene 등(24)과 Chen 등(25)은 쇠고기육 추출물을 가열할 경우 총철 제거에 효과적이라 보고하였고 Chan 등(9)은 60°C, 100°C 가열처리구가 비가열처리구에 비해 총철 함량을 감소시켰다고 하였으며, Gopalakrishnan 등(12) 또한 가열처리를 함으로써 단백질과 총철을 감소시켰다고 보고하였는데 이는 본 실험 결과와 유사한 결과를 나타냈다.

**한외여과처리:** 가열처리 추출물의 공정을 개선하기 위하여 한외여과를 통해 추출물의 분자량을 조절하였으며 각 추출물의 단백질, 총철, anserine의 함량 변화를 측정하였다 (Table 3). 단계적으로 한외여과를 한 추출물이 가열처리 추출물보다 단백질과 총철 함량이 감소하는 경향을 나타냈으며 비가열처리구의 경우 한외여과를 함으로써 단백질의 함량이 4.46±0.04 mg/mL로 약 81% 감소하였다. 60°C, 80°C, 100°C 가열-한외여과 처리구의 단백질 함량은 각각 5.16±0.31 mg/mL, 4.48±0.28 mg/mL, 4.68±0.22 mg/mL로 가열처리구에 비해 각각 30%, 41%, 34% 정도의 단백질 함량의 감소를 나타냈다. 비가열-한외여과 처리구의 총철 함량은 0.42±0.03 mg/mL로 약 97% 정도의 감소를 나타냈으며, 60°C, 80°C, 100°C 가열-한외여과 처리구에서도 한외여과를 통한 총철 함량의 감소를 확인할 수 있었다. Anserine 함량의 경우 비가열-한외여과 처리구는 3.09±0.08 mg/mL로 약 43%의 감소를 나타냈으며, 60°C, 80°C, 100°C 가열-한외여과 처리구의 경우 각각 2.58±0.52 mg/mL, 3.26±0.24 mg/mL, 2.49±0.24 mg/mL로 약 50%, 37%, 35% 정도 각각 감소하였다. 이러한 anserine의 감소는 한외여과 시 단백질과 같은 고분자 물질들이 anserine과 같은 저분자 물질의 여과막 통과를 방해한 것으로 생각하며, Chan 등(9)은 쇠고기를 이용하여 carnosine 추출 시 한외여과를 행하였을 때 무처리 추출물보다 28% 정도 감소하였다고 하였고 Gopalakrishnan 등(12) 또한 한외여과 처리 시 약 42% 감소하였다고 보고한 논문을 통해 본 실험과 유사한 경향을 확인하였다.

**이온교환 및 한외여과처리:** 이온교환법을 이용한 추출물 중의 단백질, 총철, anserine의 함량을 조사한 결과는 Table 4와 같다. Picric acid를 이용하여 육을 추출한 뒤 Dowex 1×8 수지를 이용하여 1차 이온교환을 하고 이온교환한 추출물을 이용하여 MW 500까지 한외여과처리를 한 후 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 하였다. 1차 이온교환을 한 결과 단백질, 총철, anserine 함량이 각각 7.30±0.26

**Table 4.** Effects of ion exchange chromatography and ultrafiltration on the contents of protein, iron and anserine in salmon extracts

Treatments	Contents		
	Protein (mg/mL)	Iron (µg/mL)	Anserine (mg/mL)
IEC-A	7.30±0.26 <sup>a1)</sup>	0.46±0.01 <sup>a</sup>	6.38±0.31 <sup>a</sup>
IEC-A-1	6.78±0.16 <sup>b</sup>	0.40±0.01 <sup>b</sup>	6.19±0.79 <sup>a</sup>
IEC-A-2	5.34±0.17 <sup>c</sup>	0.40±0.01 <sup>b</sup>	4.61±0.87 <sup>b</sup>
IEC-A-3	5.01±0.20 <sup>d</sup>	0.22±0.01 <sup>c</sup>	3.35±0.25 <sup>d</sup>
IEC-A-4	4.74±0.06 <sup>e</sup>	0.14±0.01 <sup>d</sup>	4.22±0.09 <sup>bc</sup>
IEC-B	3.90±0.11 <sup>f</sup>	0.04±0.01 <sup>e</sup>	3.72±0.21 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Data are expressed as mean±standard deviation (n=3). Values with different letters (a-f) within a column are significantly different ( $P<0.05$ ). IEC: Ion exchange chromatography treated. A: Primary ion exchange chromatography (Dowex 1×8) treated. 1, ultrafiltration (molecular weight cut off 30,000<); 2, ultrafiltration (molecular weight cut off 10,000<); 3, ultrafiltration (molecular weight cut off 3,000<); 4, ultrafiltration (molecular weight cut off 500<). B: Secondary ion exchange chromatography (CM-cellulose) treated.

mg/mL, 0.46±0.01 µg/mL, 6.38±0.31 mg/mL로 분석되었다. 단백질, 총철 함량의 경우 비가열 처리구보다 약 69%, 97% 감소하였으나 anserine 함량의 경우 약 17% 증가하였다. 그리고 60°C, 80°C, 100°C 가열처리구에 비해 단백질 함량은 큰 차이가 없었으나 총철 함량의 경우 80%, 61%, 32% 감소하였으며 anserine 함량은 22%, 22%, 37%의 증가를 나타냈다. 이온교환-한외여과 처리구의 단백질, 총철, anserine 함량은 각각 46%, 91%, 34% 감소하였는데 이는 비가열처리구와 가열처리구보다 낮은 단백질, 총철 함량을 나타냈지만 anserine 함량은 가장 높은 수치를 나타냈다. CM-cellulose를 이용한 2차 이온교환 추출물은 1차 이온교환 및 한외여과처리 추출물보다 총철 함량과 단백질 함량이 약 28%, 70% 낮아졌으며 anserine 함량은 약 12% 정도 감소하였으나 비가열처리나 가열-한외여과 처리구보다 anserine 함량이 상대적으로 높은 수준이었다. 따라서 비가열

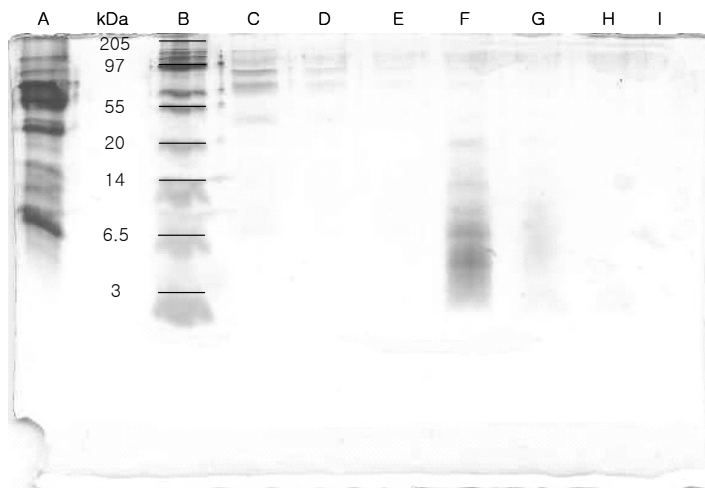
처리 추출물과 가열-한외여과 처리구보다 이온교환-한외여과처리 추출물이 불순물의 함량은 낮추면서 상대적으로 anserine의 함량을 높일 추출방법이라 생각한다.

**SDS-PAGE에 의한 추출물의 분자량 확인**

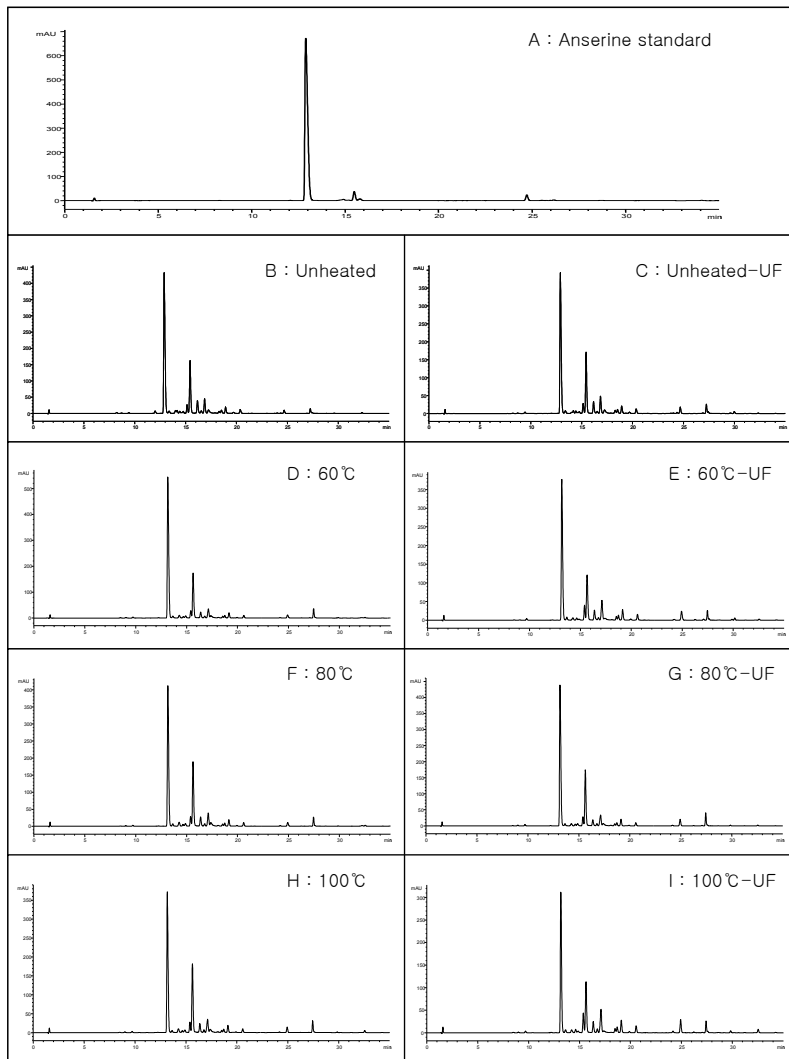
각 추출물의 전기영동 실험결과는 Fig. 3과 같다. 비가열 처리 추출물의 경우 6.5 kDa~205 kDa 사이에 많은 밴드가 관찰됐지만 가열처리 추출물과 한외여과 추출물의 경우 비가열처리 추출물에서 관찰되었던 밴드가 제거됨으로써 단백질이 제거된 결과를 나타냈다. 100°C 가열 추출물에서는 6.5 kDa 이하의 펩타이드들이 관찰되었으나 한외여과처리 추출물에서는 밴드가 제거됨으로써 불순물의 감소를 확인할 수 있었으며 1차 이온교환-한외여과처리, 2차 이온교환 처리 추출물 또한 다른 추출물에 비해 고분자량 물질이 제거된 것으로 나타났다. 즉, 전기영동 결과 비가열처리보다 가열처리-한외여과 처리구, 이온교환처리 추출물의 밴드가 많이 감소한 것으로 보아 단백질 등의 불순물이 제거된 것을 확인할 수 있었으며, 그중에서도 이온교환-한외여과처리 추출물과 2차 이온교환처리 추출물이 가장 효과적인 방법이라 생각한다.

**기기분석을 통한 추출물의 정성 분석**

기기분석을 통한 추출방법 간의 차이를 비교한 결과는 다음과 같다. 먼저 HPLC를 이용하여 각 추출 조건에 따른 변화를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타냈다. HPLC 분석 결과 표준물질인 합성 anserine의 peak는 13분대에 나타났다. 비가열처리와 가열처리 및 한외여과처리 추출물에서 모두 13분대에 합성 anserine과 동일한 peak가 확인되었으나 다른 peak들이 15~19분대 영역에 나타난 것으로 분석되었다. 60, 80, 100°C에서 가열-한외여과 처리구 추출물이 비가열 추출물보다 peak가 감소하는 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.



**Fig. 3.** 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°C and UFP 500 cut off; lane 4, E, water extracted by heating to 80°C and UFP 500 cut off; lane 5, F, water extracted by heating to 100°C; lane 6, G, water extracted by heating to 100°C 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.



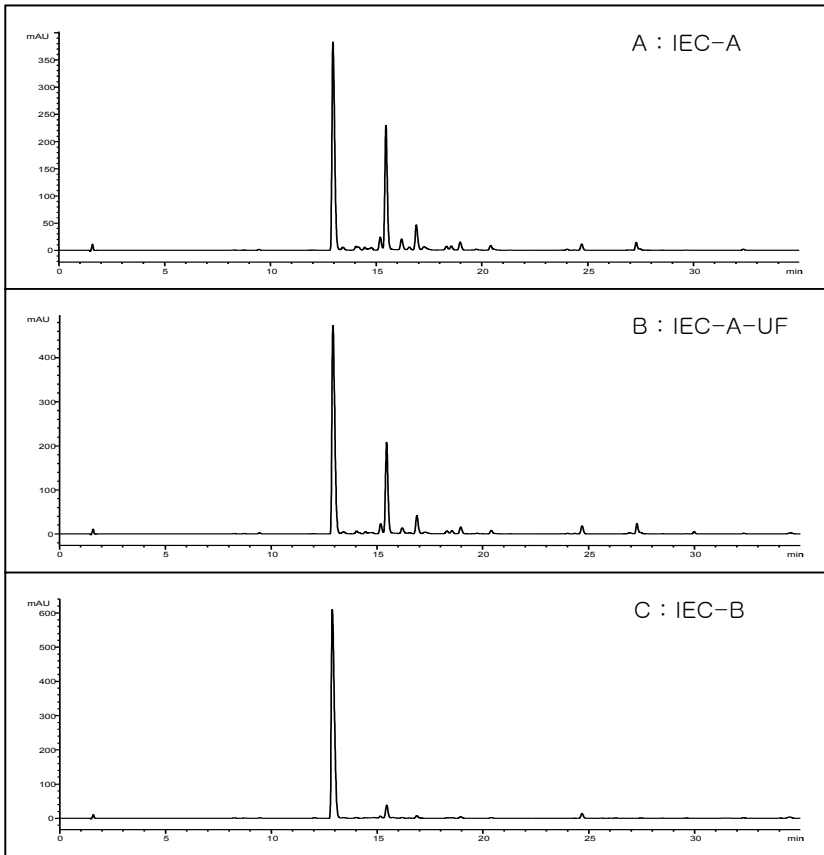
**Fig. 4.** HPLC chromatogram of salmon extracts. A, anserine standard; B, represent the sample without heated treatment; C, represent the sample without heated treatment and permeate ultrafiltration (UF); D, represent the sample which had been extracted by heating to 60°C for 15 min; E, represent the sample which had been extracted by heating to 60°C for 15min and UF; F, represent the sample which had been extracted by heating to 80°C for 15min; G, represent the sample which had been extracted by heating to 80°C for 15 min and UF; H, represent the sample which had been extracted by heating to 100°C for 15 min; I, represent the sample which had been extracted by heating to 100°C for 15 min and UF.

15분대 영역의 다른 peak들은 한외여과를 함으로써 감소하는 경향을 나타냈으나 크게 감소하지는 않았다. 그리고 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환한 추출물에서는 1차 이온교환보다 단백질 잔여물 제거 효과가 높았으며 anserine peak 외에 15분대에 관찰됐었던 peak가 제거되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 anserine 추출방법으로는 단순 가열처리보다는 가열-한외여과처리를 병행하는 것이 좋고, 1차 이온교환처리 후 한외여과 및 2차 이온교환을 하는 것이 단백질 잔여물을 가장 효과적으로 제거하면서 깨끗한 peak를 얻을 추출방법이라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 1차 이온교환 및 한외여과처리 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. 6) 두 시료 모두 동일한 분자량(MW 240)을 가진 물질임이 확인되었다.

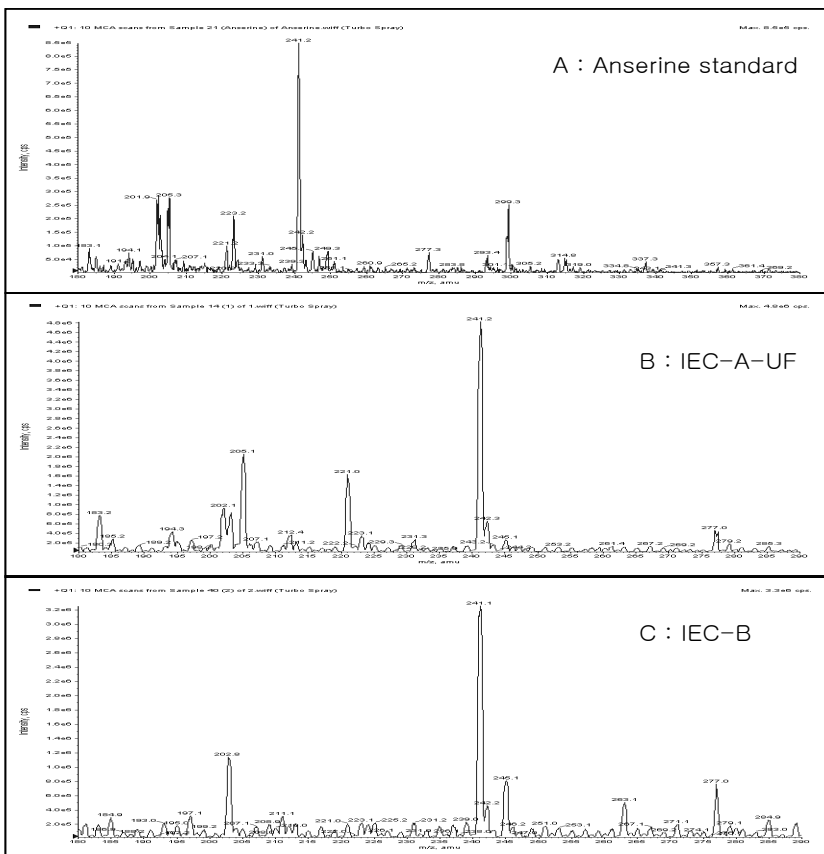
Song 등(19)은 뱀장어로부터 carnosine과 같은 천연 저분자 펩타이드의 추출에 있어서 이온교환과 한외여과처리를 병행한 경우 저분자 펩타이드의 농도는 고농도로 유지하면서 상대적으로 산화축진물질의 제거에 더 효율적이라고 보고하였으며, 본 연구에서도 이러한 결과와 유사하게 기존의 추출방법인 가열처리와 한외여과처리를 행하는 것보다 이온교환과 한외여과처리를 병행한 추출방법이 단백질, 철과 같은 산화축진물질은 제거하면서 상대적으로 anserine의 함량을 높이는 데 효율적인 방법이라 생각한다.

## 요 약

본 연구는 수산동물을 원료로 한 천연 anserine의 추출을 위해 여러 추출방법을 이용하여 연어로부터 anserine을 추출하였으며 각 추출방법에 따른 불순물(protein, iron)과 anserine의 함량 변화를 살펴보았다. Anserine 추출용 시료로서 연어의 적합성을 알아보기 위해 아미노산 함량을 분석한 결과 전체 아미노산 함량 중 anserine은 약 43.06%를



**Fig. 5.** 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 UF; C, represent the sample which had been extracted by ion exchange chromatography (CM-cellulose).



**Fig. 6.** LC/MS chromatogram of salmon extracts. A, anserine standard; B, the sample extracted by ion exchange chromatography and UF; C, the sample extracted by ion exchange chromatography (CM-cellulose).



차지하는 것으로 나타나 추출용 시료로 적합한 것으로 나타났다, 추출방법에 따른 함량 변화를 살펴보기 위해 가열처리와 한외여과처리, 그리고 이온교환 및 한외여과처리를 이용한 추출방법에 따른 함량 변화를 살펴본 결과 60°C, 80°C, 100°C로 가열 처리한 경우 100°C 가열처리구가 총철과 단백질 등 불순물 제거에 가장 효과적이었으나, anserine 함량의 감소가 큰 것으로 나타났다. 한외여과방법을 통해 분자량을 조절한 추출물의 함량 변화를 측정된 결과에서는 가열처리 추출물보다 단백질 약 81%, 총철 함량이 약 97% 감소하는 결과를 나타내었으며, anserine의 함량 변화는 가열처리구와 비슷한 수준을 유지하였다. 또한, Dowex 1×8 수지를 이용하여 1차 이온교환을 하고 이온 교환한 추출물을 이용하여 MW 500까지 한외여과처리를 한 후 CM-cellulose를 이용하여 2차 이온교환을 병행한 추출물의 함량 변화를 살펴본 결과, 가열-한외여과처리 추출물보다 단백질 및 총철의 함량은 감소했지만 상대적으로 높은 anserine 함량을 나타내어 이온교환-한외여과처리 추출방법이 단백질 및 총철과 같은 불순물의 함량은 낮추면서 상대적으로 anserine의 함량을 높일 수 있는 추출방법이라 사료된다. 또한, 이러한 경향은 전기영동 및 HPLC를 통해 확인할 수 있었으며, LC/MS를 이용하여 표준 anserine과 1차 이온교환-한외여과처리 추출물, 2차 이온교환 추출물을 분석한 결과 모두 동일한 분자량(MW 240)을 가진 물질로 확인되어 1, 2차 이온교환 및 한외여과처리를 병행한 추출법이 anserine의 추출에 있어서 효율적인 방법으로 생각한다.

### 감사의 글

이 연구는 2016년 영산대학교 교내연구비의 지원을 받아 수행되었음

### REFERENCES

- Auh JH, Namgung N, Shin KS, Park SW, Paik IK. 2010. Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. *J Poult Sci* 47: 302-309.
- Aursand M, Jorgensen L, Grasdalen H. 1995. Quantitative high-resolution <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance of anserine and lactate in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol* 112B: 315-321.
- Suyama M, Suzuki T, Nonaka J. 1967. Chromatographic determination of imidazole compounds in the whale meat. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 33: 141-146.
- Abe H, Okuma E. 1991. Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 57: 2101-2107.
- Huang SC, Kuo JC. 2000. Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 24: 193-201.
- Wu HC, Shiau CY, Chen HM, Chiou TK. 2003. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J Food Drug Anal* 11: 148-153.
- Decker EA, Crum AD. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Sci* 34: 245-253.
- Kanner J, Salan MA, Harel S, Shegalovich I. 1991. Lipid peroxidation of muscle food: the role of the cytosolic fraction. *J Agric Food Chem* 39: 242-246.
- Chan KM, Decker EA, Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* 58: 1-4.
- AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 777-788.
- Seo SS, Kim MH, No HK, Kim SD. 2002. Cooking characteristics of coated rice with water homogenate of citrus fruits peel. *J East Asian Soc Diet Life* 12: 318-325.
- Gopalakrishnan J, Decker EA, Means WJ. 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Sci* 52: 101-110.
- Suyama M, Hirano T, Suzuki T. 1986. Buffering capacity of free histidine and its related dipeptides in white and dark muscles of yellowfin tuna. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 52: 2171-2175.
- Maikhunthod B, Intarapichet K. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Sci* 71: 364-374.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
- Viollier E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN, Van Cappellen P. 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Appl Geochem* 15: 785-790.
- Parker CJ Jr. 1966. Spectrophotometric determination of carnosine and anserine in muscle. *Anal Chem* 38: 1359-1362.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Song HS, Lee KT, Kang OJ. 2006. Effects of extraction method on the carnosine, protein, and iron contents of eel (*Anguilla japonica*) extract. *J Korean Fish Soc* 39: 384-390.
- Heu MS, Choi BD, Kim KH, Kang SI, Kim YJ, Kim JS. 2015. Comparison on the food quality characteristics of muscles from salmonids according to species, imported country, and separated part. *Korean J Fish Aquat Soc* 48: 16-25.
- Lukton A, Olcott HS. 1958. Content of free imidazole compounds in the muscle tissue of aquatic animals. *J Food Sci* 23: 611-618.
- Suyama M, Suzuki T, Maruyama M, Saito K. 1970. Determination of carnosine, anserine, and balenine in the muscle of animal. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 36: 1048-1053.
- Park CK, Souh SB, Lee EH. 1996. Studies on the extractive nitrogenous constituents of chum salmon, *Oncorhynchus keta* in Korea. *J Korean Fish Soc* 29: 51-63.
- Igene JO, King JA, Pearson AM, Gray JI. 1979. Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *J Agric Food Chem* 27: 838-842.
- Chen CC, Pearson AM, Gray JI, Fooladi MH, Ku PK. 1984. Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. *J Food Sci* 49: 581-584.