

뱀장어(*Anguilla japonica*) 추출 Carnosine이 과산화수소로 유도된 인체 백혈구의 DNA 손상과 Repair에 미치는 효과

송호수*

영산대학교 서양조리학과

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

Ho-Su Song

Department of Western Cuisine & Culinary Arts, Youngsan University, Busan 48015, Korea

Carnosine was recently reported to protect against the DNA damage induced by oxidative stress. In this study, we investigated the protective effect of eel *Anguilla japonica* carnosine extracts prepared using different methods (heat treatment extracts, HTEs; ion exchange chromatography, IEC; ultrafiltration permeation, UFP) on leukocyte DNA damage using the comet assay. Human leukocytes were incubated with extracts of eel carnosine at concentrations (of 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$), and then subjected to an oxidative stimulus [200 μM hydrogen peroxide (H_2O_2)].

Pretreatment of the cells for 30 min with carnosine significantly reduced the genotoxicity of H_2O_2 measured as DNA strand breaks. The protective effects of the three types of extract (HTE, IEC, and UFP) increased with concentration. At the highest concentration (100 $\mu\text{g/mL}$), there were no statistical differences in oxidative damage between each extract treatment and PBS-treated negative controls. When leukocytes were incubated with carnosine for 30 min after exposure to H_2O_2 , the protective ability of each extract changed. Therefore, eel carnosine inhibits the H_2O_2 induced damage to cellular DNA in human leukocytes, supporting the protective effect of this compound against oxidative damage.

Key words: Eel, *Anguilla japonica*, Carnosine, Genotoxic effect, DNA damage

서 론

뱀장어(*Anguilla japonica*)는 뱀장어목(order Anguilliformes), 뱀장어과(family Anguillidae), 뱀장어속(genus *Anguilla*)에 속하는 어류로서 뱀장어속 어류는 전 세계적으로 19종이 알려져 있으며, 이중 우리나라에는 동북아에 주로 출현하는 뱀장어(*A. japonica*)와 열대성으로 적대지역에 주로 서식하며, 한반도 남부가 분포지의 북한계인 무태장어 *A. marmorata* 2종이 분포한다(Kim and Park, 2007). 뱀장어(*Anguilla japonica*)는 다른 어종에 비해서 단백질, 지방, 무기질, 비타민 등이 풍부하게 함유되어 있는 대표적인 담수어종으로 한국, 일본, 중국 등 동남아시아에서는 기호식품으로 오래 전부터 이용되고 있다(Cho et al., 2011) 또한 뱀장어에는 기능성 저분자 디펩타이드인

Carnosine이 많이 함유되어져 있는 것으로 알려져 있으며, 뱀장어 유래 carnosine의 추출방법 및 항산화 효과와 같은 기능성에 관한 연구결과가 보고되고 있다(Song et al., 2006; Lee et al., 2007; Song et al., 2009). 러시아 과학자인 Gluevitch와 Amirdgibi (1900)에 의해 처음 알려진 Carnosine은 histidine과 β -alanine이 펩타이드 결합한 디펩타이드 화합물로서 초기 Decker (1992)와 Chan et al. (1993)은 carnosine의 자유라디칼 및 금속이온 소거능과 항산화능에 대해 보고한 바 있고, 최근의 연구결과에 따르면 기타 항산화제와는 달리 노화 및 질병과 관련된 반응에 직간접적으로 관여할 것이라는 연구결과가 보고되고 있다(Lee et al., 1999; Salah et al., 2000; Hipkiss et al., 2001; Kang et al., 2002).

또한 carnosine이 항염증 작용 및 동맥경화와 당뇨병 치료

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0520>



This is an Open Access article 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.

Korean J Fish Aquat Sci 50(5) 520-526, October 2017

Received 24 July 2017; Revised 21 August 2017; Accepted 16 October 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 540. 7142 Fax: +82. 51. 540. 7137

E-mail address: hssong@ysu.ac.kr

효과 등이 알려져 있다(Chasovnikova, 1990; Bucala, 1995; Gayiva, 1999).

일반적으로 알려진 질병 및 노화의 원인으로는 반응성이 매우 큰 활성산소(active oxygen)가 세포 구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대해 비 선택적, 비가역적인 파괴 작용을 하게 되며(Adelson et al., 1988; Escalante et al., 2001) 식품에 있어서도 색, 향, 조직 및 영양적 가치에 좋지 않은 영향을 미치게 된다. 또한, 이와 같은 반응으로부터 야기된 독성을 가진 물질은 암과 노화를 비롯하여 알츠하이머병, 뇌졸중, 면역질환, 동맥경화 등의 다양한 질병을 야기시키는 것으로 보고되고 있다. (Decker et al., 1995; Kansci et al., 1997; Zhou et al., 1999).

단백질에 산화적 손상이 야기되면 열적 불안정성(heat lability), 효소 활성, 단백질 분해효소에 대한 항원성과 반응성이 변화하게 된다. 산화적 손상에 의한 단백질의 변화는 단백질의 3차원적 구조가 변하게 되며, 이로 인해 노화된 단백질의 교체가 지연되며 세포 내에 축적되어 노화가 진행됨에 따라 반응성이 풍부한 카르보닐(carbonyl)기의 함량이 증가하게 되는 것이다.

혈액과 세포 내 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(Bucala et al., 1995). 정상적인 상태에서 단백질은 비 효소적으로 당과 반응하는 maillard 반응을 일으키며, 초기반응 산물인 schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리(amadori)형의 조기당화산물이 생성되며, 이 단계까지의 반응은 가역적으로 일어나 농도가 조절되나 일정 농도 이상 혈당에서는 아마도리 산물이 재배열되어 단백질과 교차결합되어 비가역적인 최종당화산물(AGE)이 생성되며 조직에 축적되게 되며, 또한, 이것은 혈당이 정상으로 조절되어도 분해되지 않으며, 단백질 생존기간 동안 단백질 조직의 구조와 기능성을 비정상적으로 변화시킨다(Nagasaya et al., 2001; Yokozaya et al., 2001). Carnosine은 이와 같은 산화적 스트레스로 야기된 최종당화산물에 대한 저항성을 증대 및 단백질 기능성 저하를 억제시키는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

현재까지 보고된 바에 따르면 carnosine의 생리적 기능은 분자 내 이미다졸 고리(imidazole ring)에 의한 완충작용(Harris et al., 1990), 금속 킬레이트능(Quinn et al., 1992) 및 자유라디칼(Boldyrev et al., 1995)과 활성 당분자의 소거능에 기인하는 것으로 추정 되고 있다(Lee et al., 1999). 또한, 천연물에서 추출한 carnosine이 합성 carnosine에 비해 상대적으로 높은 항산화능 및 단백질 당화 억제능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2007; Song et al., 2009). 이에 본 연구는 뱀장어로부터 추출한 천연물 유래 carnosine을 이용하여, 천연 carnosine의 기능 특성 규명을 위해 인체 DNA 손상 억제 및 회복에 미치는 영향 등에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 연구에 사용한 뱀장어(*Anguilla japonica*)는 부산광역시 남천동에 소재한 남천 해변시장에서 체장 40-70 cm, 평균 체중 200-400 g의 뱀장어를 구매하여 살아있는 상태로 실험실로 운반해 각종 실험에 사용하였다. Comet assay에 사용된 histopaque 1077, low melting point agaroses, hydrogen peroxide, normal melting point agaroses Triton X-100, disodium salt ethylenediamine-tetraacetic, sodium hydrogen phosphate, potassium phosphate 등의 시약은 Sigma chemical Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 외의 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

시료 전처리

뱀장어로부터 Carnosine 추출을 위해 수육 상에서 3시간 정도 방치시킨 후 즉살시켜 두부와 껍질, 뼈, 내장을 제거한 후 carnosine 추출용 시료로 사용하였다.

뱀장어 Carnosine 추출

Carnosine 추출은 Song et al. (2006)의 방법에 따라 3가지 방법을 이용하여 추출하였으며, 가열추출방법, 한외여과처리 방법과 이온교환처리방법을 병행하여 수행하였다.

가열추출

뱀장어 육 약 100 g을 잘게 썰어 2배의 탈이온수(4℃)를 가하여 마쇄(60초, 2회)한 뱀장어육을 homogenizer (PH-91, SMT Co., Japan)를 이용하여 균질화(8,000 g, 2분, 4회)시킨 후 원심 분리(8,000 g, 30분, 4℃)시켜 상등액을 취한 후 Whatman No. 4 필터(Whatman, London, England)를 이용하여 여과한 액을 80℃에서 10분간 가열처리 후 다시 8,000 g에서 15분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 후 Whatman No. 4 필터로 여과한 후 실험용 시료로 사용하였다.

이온교환처리

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 제거하여 실험용 시료로 사용하였다

한외여과처리

한외여과 처리는 Amicon사의 stirred cell 한외여과 장치(Amicon Co., Beverly, MA, USA)를 이용하였다. 즉, 저분자 펩타이드인 carnosine 분리를 위해서 가열 처리 및 이온교환 처리한 시료를 membrane filter (YM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)로 걸러서 분자량을 최종 500 Da이하까지 조절하였으며 여과액을 -50℃ 이하로 냉동시킨 후 동결건조하여 실험용

시료로 사용하였다.

혈액 내 백혈구 세포 분리

24세와 25세의 건강한 비흡연 성인 남성 2명으로부터 채혈한 신선한 전혈 5 mL를 Hisopaque 1077을 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다.

산화적 스트레스 유발

산화적 스트레스 유발은 3가지 농도의 뱀장어 추출 carnosine을 이용하여 2가지 방법으로 산화적 스트레스를 유발하여 실험하였으며 그 방법은 다음과 같다.

(1) 준비된 백혈구 세포에 다양한 농도의 뱀장어 추출 carnosine을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에는 백혈구를 PBS로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위해 200 µM H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다.

(2) 200 µM H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 뱀장어 추출 carnosine을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 뱀장어추출 시료 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 µM H₂O₂ 해를 처리하였고, negative control인 용매(DMSO)처리 세포에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

Comet assay법을 이용한 DNA의 산화적 손상 측정

인체 백혈구 DNA를 대상으로 H₂O₂로부터 야기된 유전자 독성(genotoxic)에 대한 뱀장어 유래 carnosine의 보호 효과에 대해 알아보기 위해 활성산소에 의한 산화적 스트레스 유발 시 세포 내의 DNA의 손상 정도를 직접 확인할 수 있는 유용한 지표로 사용되고 있는 comet assay (single-cell gel electrophoresis)법을 사용하였으며, 이에 뱀장어에서 추출한 carnosine 첨가에 따른 DNA 손상 억제도를 확인하기 위해 Singh et al. (1988)의 분석법을 약간의 수정을 가한 후 comet assay를 실시하였다.

24세와 25세의 건강한 비 흡연 남성에서 채취한 세포 현탁액에 0.5% low melting agarose (LMA) 75 µL를 혼합하고 0.5% normal melting agarose 150 µL가 precoating 된 slide 위로 백혈구와 LMA 현탁액이 골고루 분산시킨 후 cover slip으로 덮어 4°C에서 10분간 냉장 보관하였다. Gel이 응고된 후 cover slip을 제거한 후 다시 한번 0.7% LMA 용액 75 µL를 slide 위에 첨가한 후 다시 cover slip을 덮어 gel이 응고될 때 까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 후 cover slip을 제거하고 slide를 차가운 alkali lysis buffer (2.5M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, 1% lauroylsarcosinate, pH 10)에 담가 60분간 4°C의 암실에 두면서 세포 단백질을 제거하였다.

Lysis가 끝난 slide는 alkaline 용액(10mM Na₂ EDTA, 300

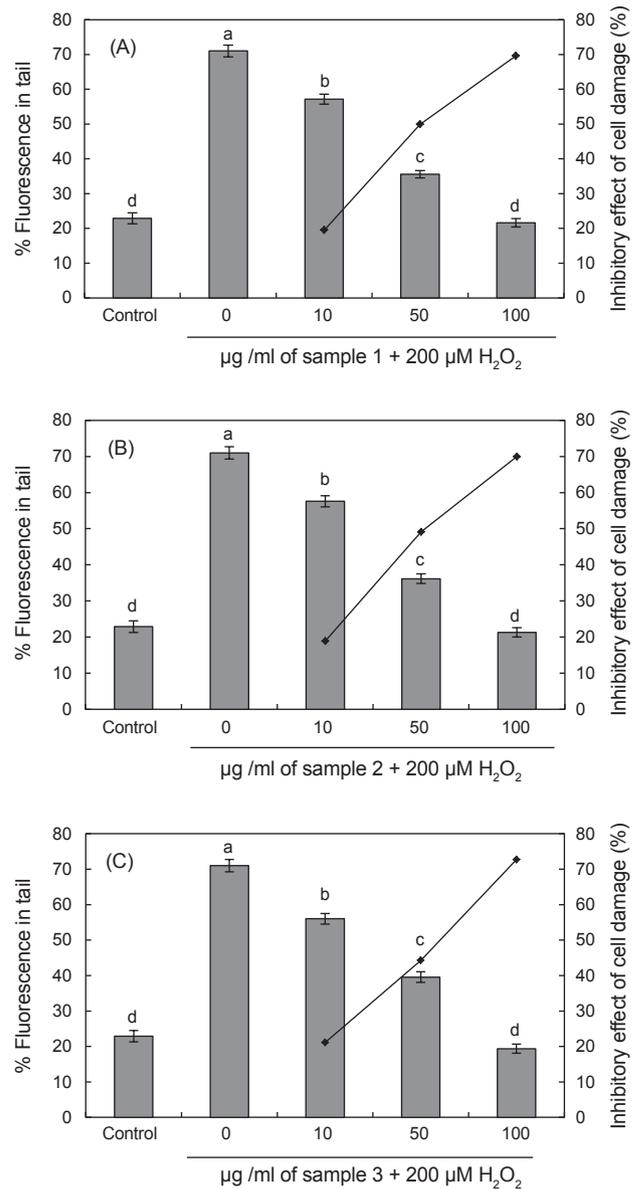


Fig. 1. The preventive effect of supplementation *in vitro* with different concentration of eel *Anguilla japonica* carnosine (A, Heat treatment extracts; B, Ion exchange chromatography treated; C, Ultrafiltration permeated) on 200 µM H₂O₂-induced human leukocytes DNA damage. Control, PBS treated normal control. Values are mean with standard error of duplicate experiments with leukocytes from each of two different donors. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($P < 0.05$).

mM NaOH, pH 13)이 포함된 전기영동기에 넣고 4°C에서 40분간 unwinding 시킨 후 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 슬라이드글라스를 중성화시키기 위해 0.4 M Tris (pH 7.5)용액으로 5분 간격으로 2회 세척하였으며,

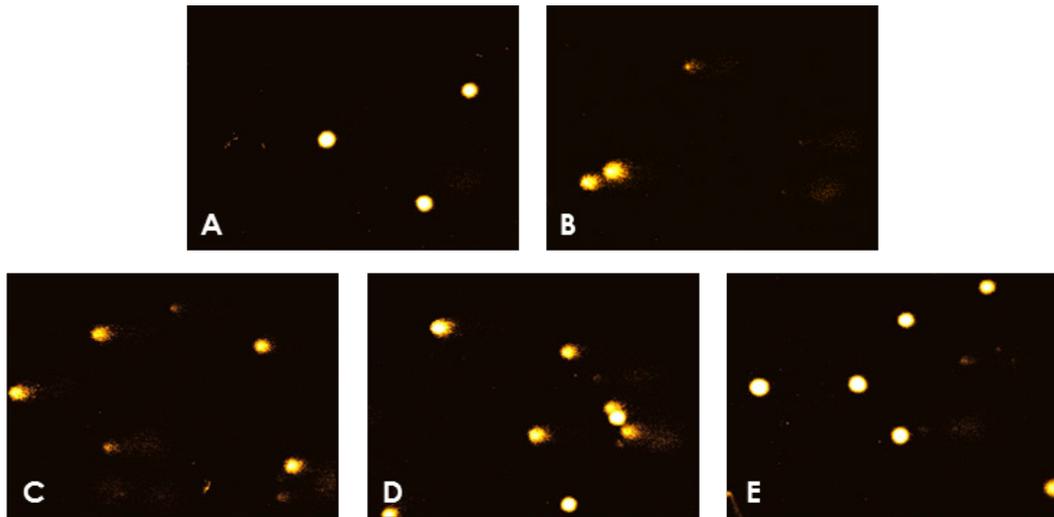


Fig. 2. Comet images of human leukocytes. A, negative control; B, leukocytes treated with 200 μM H_2O_2 ; C, leukocytes treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eel *Anguilla japonica* carnosine (UFP, Ultrafiltration permeated)+200 μM H_2O_2 ; D, leukocytes treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eel carnosine (UFP, Ultrafiltration permeated)+200 μM H_2O_2 ; E, leukocytes treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eel carnosine (UFP, Ultrafiltration permeated)+200 μM H_2O_2 .

ethanol 3 mL로 3분간 건조 시킨 후 comet image 분석을 위해 20 μL 농도의 ethidium bromide용액으로 핵을 염색시켜 형광 현미경(Leica MZ16 FA, Germany)으로 관찰하였다. 그 후 CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 얻은 세포핵 image는 이미지 자동분석 소프트웨어(Komet 4.0, Kinetic Imaging, UK)을 이용하여 분석하였다. Comet assay에 의한 백혈구 DNA 손상도의 측정은 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL) 또는 tail length에 tail 내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM)값을 측정하여 백혈구에서 DNA 손상도를 측정하였다.

통계처리

모든 자료의 통계처리는 SPSS-PC⁺ 통계 package를 이용하였으며, 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차(SE)를 구하고, 각 물질의 DAN 손상 억제 정도를 비교하기 위해 ANOVA test를 통해 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 나타내었으며, 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

DNA의 손상에 미치는 영향

보호 효과

인체 백혈구 DNA를 대상으로 H_2O_2 로 부터 야기된 유전자 독성(genotoxic)에 대한 뱀장어 유래 carnosine의 보호 및 재생 효과에 대해 알아보기 위해 Song et al. (2006)이 밝힌 바와 같이

LC/MS를 이용하여 표품 carnosine과 본 연구에서 추출한 뱀장어 추출 carnosine 모두 동일한 분자량(Mw 226)을 가진 물질임을 확인한 후(결과 미제시) 3가지 방법으로 추출한 carnosine 시료를 이용하여 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 함량으로 첨가시킨 후 30분 후에 200 μM H_2O_2 첨가하여 인체 백혈구 DNA의 손상도를 측정된 결과를 Fig. 1A-1C에 제시하였다.

무 첨가구의 경우 H_2O_2 에 의해 DNA가 손상되어 이에 따른 % fluorescence in tail이 71%를 나타낸 반면에 가열처리 추출 carnosine을 첨가한 경우는 DNA tail %가 각각 57%, 35%, 12%를 나타내었으며, 세포 손상 억제 효과는 각각 19%, 49%, 69%이었다(Fig. 1A). 이온교환 처리 carnosine은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가한 경우 각각 57%, 36%, 21%를 나타내었으며, 이에 따른 세포 손상 억제 효과는 각각 18%, 49%, 69%로 나타났다(Fig. 1B). 한외여과 처리 carnosine은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가한 경우 각각 56%, 39%, 19%를 나타내었으며 이에 따른 세포 손상 억제 효과는 각각 21%, 44%, 72%로 나타났다(Fig. 1C).

또한, 각각 다른 농도의 carnosine을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가한 경우 H_2O_2 에 의해 손상되지 않은 DNA와 동일한 보호 효과가 있는 것으로 나타났으며, DNA 손상에 따른 Comet image 분석결과(Fig. 2) H_2O_2 에 손상되지 않은 DNA에 비해 무 첨가구의 경우 DNA 꼬리가 길게 생성된 반면 뱀장어에서 추출한 한외여과 처리 carnosine을 첨가한 경우 첨가량의 증대에 따라서 손상된 꼬리가 짧아지는 결과를 나타내었다. 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 함량으로 첨가한 실험 결과 손상된 꼬리가 없는 구의 형태를 나타내

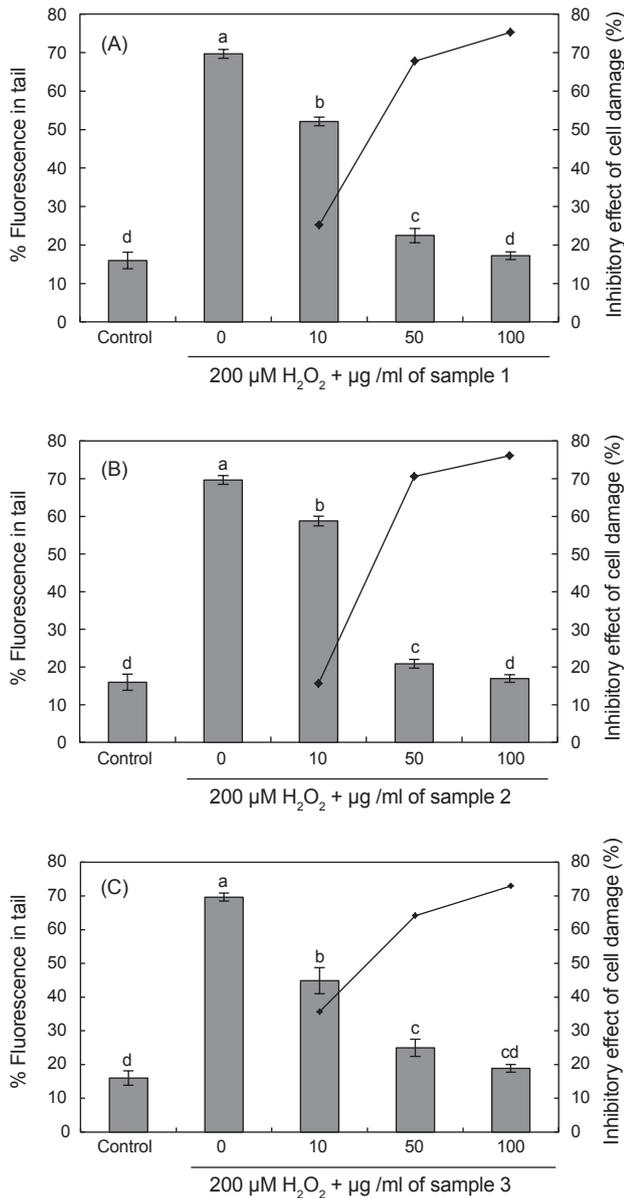


Fig. 3. The recovery effect of supplementation *in vitro* with different concentration of eel *Anguilla japonica* carnosine (A, Heat treatment extracts; B, Ion exchange chromatography treated; C, Ultrafiltration permeated) on 200 μM H₂O₂-induced human leukocytes DNA damage. Control, PBSO treated normal control. Values are mean with standard error of duplicate experiments with leukocytes from each of two different donors. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (P < 0.05).

었다. 이러한 결과는 ferritin과 H₂O₂로 인한 산화적 DNA 손상에 있어서 합성 carnosine과 homocarnosine 첨가를 통해 DNA의 손상을 억제시켰다는 Kang (2010)의 연구 결과와 같이 뱀장어에서 추출한 한외여과 처리 canosine 또한, H₂O₂로 인한

DNA의 손상을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

재생 효과

H₂O₂에 의해 손상된 DNA의 재생효과를 살펴보기 위해 200 μM H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4℃에 5분간 반응시킨 후 뱀장어 추출 carnosine을 농도별로 0 μg/mL, 10 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 함량으로 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시킨 실험 결과는 Fig. 3A-3C에서 보는 바와 같다.

H₂O₂ 무 첨가구의 경우 DNA가 손상되어 이에 따른 DNA tail %가 69%를 나타낸 반면 가열처리 추출 carnosine 첨가 시 DNA tail %가 각각 52%, 22%, 17%, 손상된 세포의 재생 효과는 각각 25%, 67%, 75%였다(Fig. 3A). 이온교환 처리 carnosine을 첨가한 경우에는 각각 58%, 20%, 16%를 나타내었으며, 이에 따른 손상된 세포의 재생 효과는 각각 15%, 70%, 76%로 나타났고(Fig. 3B), 한외여과 처리 뱀장어 추출 carnosine을 10 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL로 각각 첨가한 경우 44%, 24%, 18%를 나타내었으며, 이에 따른 각각의 세포 재생 효과는 35%, 64%, 72%로 나타났다(Fig. 3C). 특히 carnosine 100 μg/mL 첨가하였을 경우 H₂O₂에 의해 손상된 DNA를 손상되지 않은 DNA와 동일하게 재생시키는 결과를 나타내었으며, 추출방법에 따른 영향은 크지 않은 것으로 나타났다. Song et al. (2006)과 Min et al. (2017)은 수산어류로부터 carnosine 및 anserine과 같은 저분자 펩타이드의 추출에 있어서 가열처리, 이온교환, 한외여과 추출방법을 이용한 결과 유리 철과 철 단백질과 같은 산화촉진물의 함량은 효과적으로 감소되었으나 각 추출방법에 따른 저분자 펩타이드의 함량 변화는 크지 않았다고 보고하였으나, 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 뱀장어에서 추출한 carnosine은 산화적 스트레스 유발물질인 H₂O₂에 의해 유도된 백혈구 DNA의 손상에 효과가 있는 것을 확인하였으며, 이에 본 연구에서는 뱀장어로부터 추출한 carnosine을 이용하여, 천연물 유래 carnosine의 기능 특성 규명을 위해 인체 DNA 손상 억제 및 회복에 미치는 영향 등에 대해 조사함으로써 향후 산업적 및 의학적으로 중요한 기능성 소재로써 활용이 가능할 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 2017년 영산대학교 교내연구비의 지원을 받아 수행되었음.

References

- Adelson R, Saul RL and Ames BN. 1988. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. Proc Natl Acad Sci USA 85, 2706-2708. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2706>.

- Boldyrev A, Abe H, Stvolinsky S and Tyulina O. 1995. Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species: a comparative study. *Comp Biochem Physiol* 12, 481-485. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00084-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00084-4).
- Bucala R, Cerami A and Vlassara H. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes Rev* 3, 258-268. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.11140>.
- Chan KM, Decker EA and Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* 58, 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03199.x>.
- Chan KM, Decker EA and Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J Food Sci* 58, 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03199.x>.
- Chasovnikova LV, Formazyuk VE, Sergienko VI, Boldyrev AA and Severine SE. 1990. The antioxidative properties of carnosine and other deuge. *Biochem Int* 20, 1097-1103.
- Cho HS, Choi JH and Ko HB. 2011. Evaluation of major nutrients of domestic farmed eels *Anguilla japonica*. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 237-24. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0237>.
- Crush KG. 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp Biochem Physiol* 34, 3-30. [https://doi.org/10.1016/0010-406x\(70\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0010-406x(70)90049-6).
- Decker EA and Crum AD. 1993. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat sci* 34, 245-253. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90031-c](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90031-c).
- Decker EA, Chan KM, Livisay SA, Butterfield DA and Faustman C. 1995. Interactions between carnosine and the different redox states of myoglobin. *J Food Sci* 60, 1201-1204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04555.x>.
- Decker EA, Crum AD and Calvert JT. 1992. Differences in the Antioxidant Mechanism of Carnosine in the Presence of Cooper and Iron. *J Agric Food Chem* 40, 756-759. <https://doi.org/10.1021/jf00017a009>.
- Escalante AS, Djenane D, Torescano, Beltran JA and Roncales P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Sci* 58, 421-429. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00045-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00045-6).
- Gayiva EI, Kron V, Pavlisak M, Fedurco and Novakova B. 1999. carnosine in patients with diabetes mellitus type I. *Bratisl Lek Listy* 100, 500-502.
- Gopalakrishnan J, Decker EA and Means WJ. 1999. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Sci* 2, 101-110. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00154-5).
- Gulevitch VS and Amiradgibi S. 1900. Uber das carnosine, eine neueorganische base des fleischextraktes. *ber Dtsch Chem Ges* 33, 1902.
- Harris RC, Marlin DJ, Snow DH and Hultman E. 1990. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the throughbred horse, greyhound dog and man. *Comp Biochem Physiol* 97, 249-251. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90180-z](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90180-z).
- Hipkiss AR, Brownson C and Carrier MJ. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev* 122, 1431-1445. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00272-x](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00272-x).
- Kang JH. 2010. Protective effects of carnosine and homocarnosine on ferritin and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *Kor Soc Biochem Mol Biol* 43, 683-687. <https://doi.org/10.3858/bmbrep.2010.43.10.683>.
- Kang JH, Kim KS, Choi SY, Kwon HY, Won MH, and Kang TC. 2002. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxy radical-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase modification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570, 89-96. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00158-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00158-7).
- Kanner J, Harel S and Jaffe R. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by sodium chloride. *J Agric Food Chem* 39, 1017-1024. <https://doi.org/10.1021/jf00006a002>.
- Kansci G, Genot C, Meynier A and Gandemer G. 1997. The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation. *Food Chem* 60, 165-175. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(95\)00257-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(95)00257-x).
- Kim IS and Park JY. 2007. Freshwater fishes of Korea. *Kyohaksa, Seoul, Korea*, 467.
- Lee BJ, Park JH, Lee YS, Cho MH, Kim YC and Hendricks DG. 1999. Effect of Carnosine and Related Compounds on Glucose Oxidation and Protein Glycation In Vitro. *J Biochem Mol Biol* 32, 370-378.
- Lee KT, Song HS and Prak SM. 2007. Antioxidant Effect of carnosine Extracted from the eel *Anguilla japonica* extracts. *Korean J Fish Sic* 40, 193-200. <https://doi.org/10.5657/kfas.2007.40.4.193>.
- Min HO, Park IM and Song HS. 2017. Effect of extraction method on anserine, protein, and iron contents of salmon(*onchorhynchus*) Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46, 220-228. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.2.220>.
- Nagasawa T, Yokozawa T and Terassawa K. 2001. A study of kampo medicines in a diabetic nephrophathy model. *J Trad Med* 19, 161-168.
- Quinn PR, Boldrev AA and Formazuyk VE. 1992. Carnosine : its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 13, 379-444. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(92\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0098-2997(92)90006-1).
- Salah E, Gariballa, Alan J and Sinclair. 2000. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* 29, 207-210. <https://doi.org/10.1093/ageing/29.3.207>.
- Song HS, Lee KT and Kang OK. 2006. Effect of extraction method on the carnosine, protein, and iron contents of

- eel(*anguilla japonica*) extracts. Korean J Fish Sic 39, 384-390. <https://doi.org/10.5657/kfas.2006.39.5.384>.
- Song HS, Lee KT and Kang OK. 2009. Inhibitory Effects of eel(*Anguilla japonica*) extracted carnosine on Protein Glycation. Korean J Fish Sic 42, 104-108. <https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.2.104>.
- Yokozawa T, Nakagawa T and Terasawa K. 2001. Effects of oriental medicines on the production of advanced glycation products. J Trad Med 18, 107-112
- Zho S and Decker EA. 1999. Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. J Agric Food Chem 47, 51-55. <https://doi.org/10.1021/jf980780j>.