

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 알의 증자-건조처리 농축분말로부터 다양한 효소 가수분해물의 제조 및 식품기능특성

강상인 · 윤인성 · 김민교¹ · 이정석 · 허민수^{1*}

경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ¹경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소

Food Functionalities of Various Enzyme Hydrolysates Prepared from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Steam-dried Roe Concentrate

Sang in Kang, In Seong Yoon, Min Kyo Kim¹, Jung Suck Lee and Min Soo Heu^{1*}

Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Republic of Korea

¹Department of Food and Nutrition/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

In the present study, protein hydrolysates were prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate using different commercial proteases, and their functional properties and bioactivities were examined. Protamex (PR; 21.6%) showed the highest degree of hydrolysis, followed by alcalase (AL; 21.1%) and aroase AP-10 (AA; 20.2%). With regard to foaming activity, trypsin, chymotrypsin (CH), and bromelain (BR) had values ranging 181–188%, followed by neutrase (152%) and AA (141%). CH (36%) and BR (70%) maintained foam stability for up to 15 min. The oil-in-water emulsifying activity index of CH (10.6 m²/g) was the highest among all the hydrolysates. Notably, the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS+) radical scavenging activities (IC₅₀) were significantly higher in pantidase NP-2 (68.1 µg/mL) and flavourzyme (FL, 69.8 µg/mL) than in other hydrolysates. The tyrosinase inhibitory activities of FL, PR, and AA were inhibited by 12.5–19.8%. Aangiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the control was 80.9%, and that of the hydrolysates of CH, AA, PR, and AL, which exhibited higher inhibitory activity, ranged 87.6–90.7%. CH, BR, and AA AP-10 hydrolysates exhibited superior bioactivity and functional properties. Therefore, these hydrolysates can be used as food ingredients in novel types of functional food-enhancing seafood and food processing industries.

Keywords: Olive flounder, Roe, Steam-dried concentrate, Enzyme hydrolysates, Functionality

서론

최근 10년간, 우리나라의 총 어업생산량은 평균 330만톤 수준(MOF, 2023)으로, 이들 어업생산물의 가공 및 제품 제조 시 발생하는 머리, 껍질, frame, 비늘, 내장, 알 등의 비가식 가공부산물인 총 어류 생산량의 약 30–60%를 차지한다(Galla, 2014; Klomklao and Benjakul, 2016). 이들 수산 가공부산물의 영양적 가치는 단백질 급원으로서 높은 잠재력이 있지만, 극히 일부 분만이 어유(fish oil), 어분(fish meal), 질소성 비료나 동물사료 용 등으로 매우 한정적으로 이용될 뿐이다(Dong and Bechtel,

2010; Galla et al., 2012a, 2012b). 수산 가공부산물 중에서 어류 알(fish roe)은 알과 알집을 포함한 것으로, 어종에 따라 다양하지만, 전 어체 중량의 1.5–10%를 차지하고, 알부민(11%), 오보글로블린(75%) 및 콜라겐(13%) 등과 vitellogenin 및 vitellogenin derivatives와 같은 기능성 단백질(Sikorski, 1994; Heu et al., 2006; Park et al., 2016; Kwon et al., 2022; Yoon et al., 2023) 및 필수지방산(Heu et al., 2006; Mahmoud et al., 2008; Intarasirisawat et al., 2011)이 풍부한 고 영양성의 식품 재자원이다. 따라서 수산 가공부산물로부터 주요 구성분인 단백질을 회수하고자 하는 노력은 저비용의 새로운 단백질을 생산하

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 1440 Fax: +82. 55. 772. 1430

E-mail address: minsheu@gnu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0515>

Korean J Fish Aquat Sci 57(5), 515-529, October 2024

Received 30 July 2024; Revised 12 September 2024; Accepted 22 October 2024

저자 직위: 강상인(교수), 윤인성(대학원), 김민교(대학생), 이정석(교수), 허민수(교수)

는 것이 가능하기 때문에 산업적 이용에 있어 매우 중요하다 (Lee et al., 2016, 2017; Yoon et al., 2017, 2018, 2023; Kwon et al., 2022). 증자(steaming)와 같은 가열 및 건조처리 공정(cook-dried process)의 적용은 소화성(digestibility)과 기호성(palatibility)을 향상시키고 유해 세균이나 기생충을 사멸하여 안전한 소비를 제공한다(Lee et al., 2016; Yoon et al., 2018, 2023; Kwon et al., 2022). 또한 다양한 가열-건조 처리공정은 단백질의 구조적인 변화가 다양하게 일어나(Mariod et al., 2010), 영양 또는 기능적 특성을 개선하는 효과가 있을 수 있다(Adebiyi et al., 2009).

단백질 변형(protein modification)은 대개 효소적, 물리적, 및 화학적 처리의 결과로서 구조적, 물리 화학적, 기능적 특성의 변화가 일어나게 되며(Gehring et al., 2011; Foh et al., 2012), 특히 천연 단백질로부터의 효소적 가수분해는 보수력, 조직감, 겔화능, 용해도, 유화 및 거품 형성능을 포함한 식품 기능성을 개선한다(Shahidi, 1994; Intarasirisawat et al., 2012; Liu et al., 2015). 또한 수산 단백질의 효소적 분해는 항산화(Thiansilakul et al., 2007; Galla et al., 2012b; Sarmadi and Ismail, 2010) 및 항 고혈압활성(Li et al., 2004; Park, 2009; Ghassem et al., 2011; Kim et al., 2011; Zhou et al., 2012)과 같은 다양한 생리활성을 가진 peptides를 생산하는 것이 가능하여 기능식품(nutraceuticals) 및 의약품 소재로 개발 가능성이 높다(Ahn et al., 2012). 또한 효소를 이용한 어류 단백질 가수분해물들은 효소 반응조건을 조절하여 개선된 식품 및 건강기능 특성을 갖는 peptides를 제조할 수 있으며, 이들 어류 단백질 가수분해물들은 잠재적인 생리활성과 필수영양소를 회수하는데 효과적인 방법이기도 하다(Souissi et al., 2007; Chalamaiah et al., 2015).

이 연구에서는 다소비 양식어종으로 대부분 폐기되는 수산 가공부산물인 넙치알의 증자-건조처리 농축분말(Kwon et al., 2022; Yoon et al., 2023)로부터 시판 proteases의 기질 특이성에 따른 효소 별 가수분해물을 제조하여 식품기능 특성의 개선

및 생리활성에 대해 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

넙치(olive flounder *Paralichthys olivaceus*)는 통영시 소재 수산시장에서 활어 상태로 구입하여 실험실로 운반한 후, 알을 적출하여 실험에 사용하였다. 넙치 알(olive flounder roe, OFR)은 흐르는 물에 간단히 수세하고, 파우치형 tea bag (polyethylene polypropylene, 16×14.5 cm)에 300 g씩 소분하여 밀봉상태로 -55°C에서 보관하였다.

OFR로부터 가수분해물의 제조에 사용한 시판 protease는 Table 1과 같고, 2종의 정제 효소와 8종의 food-grade 효소를 사용하였으며, 이외의 실험에 사용한 시약은 분석급(analytical grade)을 사용하였다.

넙치 알 증자-건조처리 농축분말의 제조

OFR로부터 증자-건조처리 농축분말(steam-dried concentrates, SDC)은 Lee et al. (2016)의 방법을 다소 수정한 Kwon et al. (2022)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, tea bag에 300 g씩 소분한 OFR은 시료의 6배량의 탈 이온수로 증자 용기에서 증자처리를 중심온도가 80°C가 되는 시점부터 20 min 실시하고, 이를 건조(70±1°C, 15 h)하였다. 이렇게 증자-건조처리한 OFR은 식품분쇄기(SFM-555SP; Shinil Industrial Co., Ltd., Seoul Korea)로 분쇄하고, 180 mesh의 거름채로 걸러 효소 가수분해물 제조용 SDC를 제조하였다.

SDC의 효소 가수분해물 제조

시판 protease (Table 1)를 이용한 SDC가수분해물 제조는 식품 기능성의 개선 및 생리활성을 부여할 목적으로, OFR로부터 제조한 SDC의 4% (w/v) 분산용액은 상온(20±2°C)에서

Table 1. Details of commercial proteases used to prepare enzyme hydrolysates

Enzyme	EC ¹ number	pH range	Temperature range (°C)	Origin
Trypsin (type II-S, 1,000-2,000 units/mg dry solid)	3.4.21.4	7.0-9.0	30-60	Porcine pancreas
α-Chymotrypsin (type II, ≥40 units/mg protein)	3.4.21.1	7.8	30-60	Bovine pancreas
Bromelain (≥3 units/mg protein)	3.4.22.32	7.0-9.0	35-45	Pineapple stem
Papain	3.4.22.2	6.0-7.0	60-70	Papaya latex
Alcalase® 2.5 L type DX	3.4.21.62	7.0-10.0	30-65	<i>Bacillus licheniformis</i>
Neutrase® 0.8 L	3.4.24.28	7.0	40-50	<i>Bacillus amyloliiensquefaciens</i>
Flavourzyme® 500 MG	3.4.11.1	5.5-7.0	50-70	<i>Aspergillus oryzae</i>
Protamex®	3.4.21.62/ 3.4.24.28	5.5-7.5	35-60	<i>Bacillus</i> sp.
Aroase AP-10		7.0-8.0	50-55	<i>Bacillus subtilis</i>
Pantidase NP-2		7.0	45-50	<i>Aspergillus oryzae</i>

¹EC, Enzyme commission.

2 h 동안 전 단계반응을 실시하였다. 먼저, SDC분산용액의 단백질 함량(4% w/v)에 대한 serine protease인 trypsin (TR)과 chymotrypsin (CH)의 비율은 효소농도가 0.8% (E/S, 1/125) 이 되도록 첨가하여 효소반응액을 제조하였다. 또한 cysteine protease인 bromelain (BR) 및 papain (PA) 그리고 food-grade protease인 alcalase® (AL), neutrase® (NE), protamex® (PR), flavourzyme® (FL), aroase AP-10 (AA) 그리고 pantidase NP-2 (PN)의 최종 첨가농도는 4% SDC의 단백질 함량에 대하여 이들의 최종 효소농도가 4% (w/w, E/S, 1/25)가 되도록 효소 반응액을 각각 제조하였다. 효소반응은 진탕 항온수조(50°C)에서 150 min 가수분해하고, 반응 정지는 80°C에서 20 min 진행하였다. 이들 반응 정지한 효소반응액은 원심분리(1,890 g, 30 min, 4°C)하고, 상층액은 각각의 효소 가수분해물로서 -20°C에서 보관하면서 이후 식품 기능성 및 생리활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

단백질 농도

SDC 및 효소 가수분해물의 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준단백질로서 bovine serum albumin을 사용하여 구한 검량선을 통해 측정하였다.

가수분해율

먼저, SDC는 시료 0.2 g을 40 mL의 1 N NaOH을 사용하여 완전 용해시켜 이들 용액의 단백질 농도를 Lowry's (1951) 방법으로 측정한다 다음, 4% SDC 용액에 대한 단백질 함량으로 환산하여 총 단백질 함량을 구하였다. 이어서, 마찬가지로 가수분해물의 단백질 농도를 Lowry's 법으로 측정하여 각 효소 가수분해물들의 단백질 함량을 구하였다. 가수분해율은 아래의 주어진 식에 따라, SDC의 총 단백질 함량에 대한 가수분해물의 단백질 함량비로서 가수분해율을 계산하였다.

$$DH(\%) = \left[\frac{(\text{Hydrolysate protein, mg}) - (\text{Control protein, mg})}{\text{SDC total protein content, mg}} \right] \times 100$$

이때의 control은 효소 처리하지 않은 동일조건 반응혼합액의 단백질 함량을 의미하였다.

유리 및 방출된 아미노산

효소 가수분해물의 아미노산분석은 각 가수분해물 시료용액 2.5 mL에 단백질 제거를 위해 0.25 mL의 6% (w/v) 5-sulfosalicylic acid dihydrate용액을 가하여 원심분리(1,890 g, 20 min, 4°C)하였다. 원심분리 상층액(1.5 mL)은 0.20 μm syringe filter (hydrophilic type)를 사용하여 여과한 다음, lithium form 칼럼이 장착된 아미노산 분석기(model 6300; Biochrom 30, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)로 분석하였으며, 효소 가수분해에 의한 유리 및 방출된 아미노산(free and released amino

acids, FRAA)의 분석 결과는 100 g의 SDC 단백질 함량에 대한 개별 아미노산의 조성비(%)로 나타내었다.

단백질 분자량 분포

SDC가수분해물의 단백질 분자량분포는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 측정하였다. 먼저, 1 mL의 각 가수분해물 시료(1 mg/mL)와 0.25 mL의 SDS-PAGE 시료조제용 완충액(× 5 sample buffer, pH 6.8)을 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후, 100°C에서 3 min 동안 가열하여 전기영동용 시료를 조제하였다. 이렇게 준비한 시료(20 μg의 단백질)는 AnyKDa Mini-PROTEAN® TGX™ Precast gel (Bio-Rad Lab., Inc., California, USA)에 주입하고, Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad Lab. Inc., California, USA)에 장착한 다음, 일정한 전류(10 mA per gel)를 흘려 전기영동하였다. 전기영동을 완료한 겔은 0.125% (w/v) coomassie brilliant blue R-250 용액에 15 min 염색하고, 이어서 25% methanol 및 10% acetic acid 혼합용액에서 바탕이 투명해질 때까지 탈색하였다. 단백질의 분자량분포는 Precision Plus Protein™ standards (2-250 K; Bio-Rad Lab., Inc., California, USA)를 사용하여 확인하였다.

거품형성능

각 효소 가수분해물들의 거품성(foaming capacity, FC)과 거품안정성(foam stability, FS)은 Park et al. (2016)에 따라 측정하였다. 즉, 각 10 mL의 가수분해물을 25 mL의 메스 실린더에 옮겨 담고, 균질기(POLYTRON® PT 1200E, KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland)로 12,500 rpm에서 1 min 균질화하였다. 거품이 형성된 시료는 주어진 시간(15, 30, 60 min)동안 실온(20±2°C)에서 정치하면서, 총 부피와 거품의 부피를 측정하여 아래의 식에 따라 FC와 FS를 구하였으며, control과 상호 비교 하였다.

$$\text{Foaming capacity (\%)} = \frac{V_t}{V_0} \times 100$$

$$\text{Foam stability (\%)} = \frac{(F_t/V_t)}{(F_T/V_T)} \times 100$$

이때 VT는 균질 후 총 부피, V0는 균질 전의 총 부피, FT는 균질 직후 거품의 부피, Ft와 Vt는 주어진 시간(t= 15, 30, 60 min) 경과 후의 거품부피 및 총 부피를 의미하였다.

유화 형성능

가수분해물의 유화능(emulsifying activity index, EAI)과 유화안정성(emulsion stability index, ESI)은 Park et al. (2016)의 방법에 따라 측정하였다. 각각 15 mL의 가수분해물과 5 mL의 식용유(soybean oil; Ottogi Co., Ltd., Seoul, Korea)는 3:1 (v/v)의 비율로 25 mL의 메스 실린더에 옮겨 담고, 균질화

(12,500 rpm, 1 min)한 다음, 균질액이 담긴 메스 실린더의 아래쪽에서 일정량(50 μ L)의 emulsion을 취하여 5 mL의 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액과 혼합하였다. 이 혼합액은 분광 광도계(UV-2900; Hitachi, Kyoto, Japan)를 사용하여 파장 500 nm에서 균질화 한 직후의 흡광도(A_0 min)와 10 min 경과 후의 흡광도(A_{10} min)를 측정하여 아래의 식으로 각각 EAI (m^2/g protein) 및 ESI (min)를 구하였다.

$$EAI \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times A \times D}{1 \times \Phi \times C}$$

이때, A는 파장 500 nm에서의 흡광도, DF는 희석비(100), 1은 빛이 통과하는 cuvette의 폭(1 cm), Φ 는 혼합액 중에 식용유가 차지하는 비율(0.25) 그리고 C는 단백질의 농도(g/mL)를 각각 나타내었다.

$$ESI \text{ (min)} = \frac{A_0 \times \Delta t}{\Delta A}$$

여기서 ΔA 는 A_0 min에 대한 A_{10} min의 흡광도의 차이, Δt 는 10 min 의미하였다.

ABTS+ 라디칼 소거활성

각 효소 가수분해물의 항산화 활성과 관련한 ABTS+ [(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt)] 라디칼 소거활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mL의 가수분해물과 3 mL의 ABTS+ 용액을 혼합하고, 실온의 암소에서 30 min 반응시킨 후, 파장 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS+ 라디칼 소거활성(%)은 아래의 식으로 계산하였으며, IC50 value (μ g/mL)는 50%의 ABTS+ 라디칼 소거활성을 나타내는 시료의 농도로 정의하였다.

$$ABTS+ \text{ radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Control}_{734} - \text{Sample}_{734})}{\text{Control}_{734}} \times 100$$

이때의 control은 시료용액 대신 탈 이온수에 대해 측정된 흡광도를 나타내었다.

Tyrosinase 저해활성

각 효소 가수분해물의 tyrosinase 저해활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 300 μ L의 가수분해물은 900 μ L의 mushroom tyrosinase (50 Unit/mL) 그리고 1.5 mL의 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합하여 실온에서 30 min 전 단계 반응을 실시하고, 이어서 300 μ L of 10 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 용액을 가하여, 1 min 간격으로 20 min동안 파장 475 nm에서 생성되는 dopach-

rome의 흡광도를 모니터링하면서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성(%)은 아래의 식을 통하여 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory activity (\%)} = \frac{(\text{Control}_{475} - \text{Sample}_{475})}{\text{Control}_{475}} \times 100$$

여기서 control은 시료 대신 탈 이온수 가하여 측정된 흡광도를 의미하였다.

ACE 저해활성

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 100 μ L의 가수분해물, 50 μ L의 ACE 용액 그리고 50 μ L의 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 혼합하고 실온에서 30 min 전 단계 반응을 실시하였다. 이어서 50 μ L의 5 mM hippuryl-his-leu (HHL) acetate salt를 함유한 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 가하여 37°C의 항온수조에서 60 min 반응을 진행하였다. 여기에 250 μ L of 1 N HCl을 가하여 효소반응을 정지시키고, 1.5 mL의 ethyl acetate를 가해 hippuric acid를 추출 및 원심분리 (1,890 g, 10 min, 4°C) 하였다. 1.0 mL의 상층액을 시험관에 옮겨 100°C의 heating block에서 ethyl acetate를 완전히 증발시키고, 1.0 mL의 탈 이온수로 용해하여, 파장 228 nm (UV-2900; Hitachi, Kyoto, Japan)에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성(%)은 아래의 식에 따라 구하였다.

$$ACE \text{ inhibitory activity (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{Sample}_{228} - \text{Sample Blank}_{228})}{(\text{Control}_{228} - \text{Control Blank}_{228})} \right] \times 100$$

이때의 sample blank는 시료에 1 N HCl을 가하여 불활성화한 시료에 HHL을 첨가해 측정된 흡광도이며, control blank는 시료 대신 탈 이온수와 1 N HCl을 혼합한 다음, HHL을 가하여 측정된 흡광도를 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 최소 3회 이상 반복 실시하였으며, 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 데이터는 SPSS 12.0 K (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 ANOVA test를 통해 분산분석을 실시하고, Duncan의 다중 위검정법으로 최소유의차검정($P < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

가수분해율

가수분해율(degree of hydrolysis)은 효소에 의해 peptide 결합이 분해 또는 절단된 백분율로 정의되며(Aderler-Nissen, 1979), 단백질 가수분해물의 기능적 특성을 결정하는데 일반적

인 지표이다(Zhou et al., 2012).

Table 2는 OFR로부터 제조한 증자-건조처리 SDC로부터 기질 특이성이 다양한 10종의 시판 protease를 사용하여, 효소들의 최적반응조건과는 상관없이(Table 1) 동일한 반응조건(pH 5.8, 45°C, 150 min)에서 제조한 SDC가수분해물들의 단백질 함량(mg/100 mL) 및 가수분해율(%)을 나타낸 것이다.

먼저, 4% (w/v) SDC분산용액의 총 단백질 함량(total protein, mg/100 mL)은 2,432.0 mg/100 mL이었으며, 이에 대해 효소 처리 하지 않은 control의 유리된 단백질 함량은 244.7 mg/100 mL이었다. 또한 각 효소 가수분해물의 단백질 함량(hydrolysate protein, mg/100 mL)은 CH (438.1 mg/100 mL)가 가장 낮은 수준이었으며, 이때의 가수분해율은 8.0%이었다. 이에 반해 가장 많은 단백질 함량을 나타낸 PR (773.7 mg/100 mL)의 가수분해율은 21.6%이었다.

Serine proteases의 경우, TR (9.6%)의 DH는 CH (8.0%)에 비하여 유의적으로 높은 수준이었다(P<0.05). Cysteine protease인 PA의 DH는 13.8%로서 4% SDC분산용액으로부터 효소에 의해 유리된 단백질 함량은 578.9 mg/100 mL이었으며, BR의 10.9% (506.9 mg/100 mL)에 비해 유의적으로 높은 DH를 나타내었다(P<0.05). 시판 food-grade protease 중에서는 PR (21.6%)의 DH가 가장 높았으며, 다음으로 AL (21.1%), AA (20.2%) 그리고 NE (17.4%)의 순이었다. 이들의 단백질 함량은 663.6-765.4 mg/100 mL 범위이었다. 그러나 시판 food-grade protease 중에서 FL (11.9%)과 PN (13.1%)는 cysteine protease인 PA에 비해서도 유의적으로 낮은 DH를 나타내었다.

Serine protease인 TR은 염기성 아미노산(Lys 및 Arg)의 C-말단을 절단하는 기질 특이성이 있으며, CH는 방향족 아미노산(Tyr, Phe 및 Trp)의 C-말단을 절단하는 극히 한정적인 기질 특이성을 가지고 있다. 따라서 SDC의 아미노산 조성(Kwon et al., 2022) 중에서 Lys (8.3%)과 Arg (6.5%)의 조성이 Phe (4.6%)과 Tyr (3.9%)에 비해 유의적으로 높아, 이러한 TR과 CH의 기질 특이성이 반영되어 상대적으로 TR의 가수분해율이 CH에 비해 상대적으로 높은 원인이 일 것이라 추정되었다. 또한 시판 food-grade protease의 가수분해율이 serine 및 cysteine protease의 가수분해물에 비해 높은 것은 동일 반응조건에서 이들에 비해 기질 특이성이 상대적으로 광범위하기 때문으로 판단되었다.

동물 또는 식물기원의 효소와 비교하여, 미생물기원의 효소는 다양한 촉매활성(기질 특이성)과 보다 광범위한 pH 및 온도 안정성을 포함한 몇 가지의 장점이 있다(Diniz and Martin, 1997). Chalamaiyah et al. (2010)은 meriga 알 AL가수분해물의 가수분해율(62.%)이 PA (17.1%)에 비해 가수분해율이 월등히 높다고 하였으며, AL은 소수성 아미노산 잔기를 우선적으로 가수분해하는 기질 특이성을 나타낸다고 보고하였다(Klompong et al., 2007). 가다랑어 육에 대한 AL, FL, NE, PR, 그리고 TR의 가수분해율은 2.43-78.33% 범위이며, TR이 가장 낮았고, 기질 특이성에 따라 다양한 가수분해율을 나타낸다고 하였다(Liu et al., 2015). Sardinella Sardinella aurita 가공부산물에 대한 AL와 CH가수분해물의 가수분해율은 각각 8%와 6.5% (Bougatef et al., 2010)라고 하여 이 실험의 결과와 유사하였다.

Table 2. Degree of hydrolysis of commercial proteases hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate by steam-dried process

Commercial proteases	Steam-dried roe concentrate			
	Total protein (mg/100 mL)	Hydrolysate protein (mg/100 mL)	Degree of hydrolysis (%)	End pH
Control	2,432.0	244.7±4.2 ⁱ	0.0	5.8
Trypsin (TR)	-	477.1±9.3 ^b	9.6±0.2 ⁱ	5.7
Chymotrypsin (CH)	-	438.1±16.4 ⁱ	8.0±0.3 ⁱ	5.7
Papain (PA)	-	578.9±4.2 ^d	13.8±0.1 ^e	5.7
Bromelain (BR)	-	506.9±4.7 ^g	10.9±0.1 ^h	5.6
Alcalase (AL)	-	765.4±3.6 ^a	21.1±0.1 ^b	5.6
Neutrase (NE)	-	663.6±19.1 ^c	17.4±0.5 ^d	5.5
Flavourzyme (FL)	-	536.6±4.5 ^f	11.9±0.1 ^g	5.4
Protamex (PR)	-	773.7±3.6 ^a	21.6±0.1 ^a	5.4
Aroase AP-10 (AA)	-	738.9±3.7 ^b	20.2±0.1 ^c	5.3
Pantidase NP-2 (PN)	-	563.2±4.3 ^e	13.1±0.1 ^f	5.8

Degree of hydrolysis (%)=(each enzyme hydrolysate protein - control hydrolysate protein)/total protein×100. Control was the supernatant of 4% (w/v) steam-dried concentrate dispersion under the same reaction conditions without the enzyme treatment. Values represent the mean±SD of n=3. Values with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Fang et al. (2012)은 flying squid의 AL, PA 및 TR 가수분해율은 각각 16.98%, 15.61%과 13.54%이라고 하였으며, 이와 달리 10% 이하의 가수분해율을 보인 가수분해물은 pepsin과 FL이라고 하였다.

이상의 결과로부터 serine protease에 의한 DH가 다른 효소들에 비하여 낮은 것은 분석용 시약급 정제 효소(TR 및 CH)를 사용하면서 효소와 기질비를 상대적으로 낮게 한 것과 이 연구에서는 각 효소의 반응 최적조건을 반영하여 가수분해물을 제조한 것이 아니라, 기질(SDC) 중심으로 동일한 반응조건을 적용하여 효소의 기질 특이성을 바탕으로 한 가수분해물을 제조하고자 하였기에 전반적으로 낮은 가수분해율을 나타낸 것으로 판단되었다. 이는 산업적 이용을 전제로 한다면, 효소 기준으로 한 조건을 설정하기보다는 기질(산업적 이용 대상)을 기준으로

하여 기질이 기본적으로 가지고 있는 pH (pH 조정에 따른 가공 조건을 최소화), 온도(에너지의 사용을 최소화) 및 반응시간 등을 고려하여 이 연구를 진행하였기 때문이었다.

효소에 의해 방출된 아미노산 조성

OFR로부터 증자-건조처리 SDC에 대해 10종의 시판 단백질 분해효소에 의한 가수분해물들과 효소처리 하지 않은 control의 FRAA 조성들은 Table 3과 같다. 이 표에 나타난 결과(g/100 g protein)는 각 아미노산의 백분율(%)로 나타내었으며, 이는 가수분해물의 각 아미노산 함량보다는 효소에 의한 각 아미노산의 조성의 순증가율을 알아보기 위하여 제시하였다. 아울러 효소 가수분해물의 단백질 함량(hydrolysate protein, HP)도 제시함으로써, 각 아미노산의 조성비(%)를 곱하면, 각 아미노산

Table 3. Free and released amino acid composition (g/100 g protein, %) of commercial proteases hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate by steam-dried process

Amino acids	SDC ²	Control	TR	CH	PA	BR	AL	NE	FL	PR	AA	PN
Thr	5.1	3.6	3.9	4.0	3.5	3.5	3.3	4.0	7.3	4.1	3.9	4.3
Val ¹	6.4	7.7	7.2	7.6	6.6	6.5	8.9	8.5	5.4	8.4	8.1	7.3
Met ¹	2.8	3.4	3.3	3.4	3.4	3.3	3.5	4.5	4.0	3.2	3.2	3.7
ILe ¹	5.3	5.2	4.8	5.1	4.2	4.2	4.5	4.9	6.4	4.6	4.9	5.3
Leu ¹	9.2	10.1	9.3	9.9	8.4	8.3	9.1	9.1	11.1	10.5	10.6	12.1
Phe ¹	4.6	5.3	10.9	7.8	10.3	12.2	8.9	9.2	6.5	9.4	8.6	9.8
His	2.6	2.3	3.1	2.3	2.9	2.6	4.1	4.6	3.5	4.7	4.6	3.6
Lys	8.0	9.2	9.0	8.8	7.8	7.9	7.7	9.6	5.6	8.1	8.2	6.7
Arg	6.6	6.7	6.8	6.8	5.9	6.5	5.4	5.9	8.0	6.4	6.5	7.5
EAA (%)	50.7	53.5	58.5	55.8	52.9	54.9	55.5	60.4	57.8	59.3	58.6	60.4
Asp	9.2	6.7	6.2	6.5	5.3	5.3	5.1	5.9	3.2	3.7	4.1	5.3
Ser	5.6	11.7	10.2	11.1	9.9	9.0	8.9	7.8	9.0	7.8	6.7	10.2
Glu	12.9	11.4	9.6	10.3	6.0	6.2	6.2	7.3	8.8	9.0	10.6	8.2
Pro ¹	5.0	-	-	-	11.4	10.8	10.3	5.7	3.4	5.6	5.6	-
Gly ¹	4.8	2.8	2.7	2.8	3.2	2.4	2.3	3.0	3.9	3.3	3.2	3.0
Ala ¹	6.5	8.6	7.5	8.1	6.6	6.6	6.3	5.9	6.8	6.1	6.2	6.8
Cys	1.4	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-
Tyr	3.9	5.3	5.4	5.4	4.6	4.8	5.3	4.0	5.6	5.2	5.0	6.1
NEAA (%)		46.5	41.5	44.2	47.1	45.1	44.5	39.6	42.2	40.7	41.4	39.6
EAA/NEAA		1.15	1.41	1.26	1.12	1.22	1.25	1.52	1.37	1.46	1.42	1.52
FRAA (mg/100 g SDC)		4,385	5,230	4,957	6,464	6,274	7,051	7,300	12,258	6,723	6,436	9,970
HP (mg/100 g SDC)		6,118	11,927	10,952	14,474	12,673	19,136	16,591	13,416	19,344	18,472	14,079
FRAA/HP (%)		71.7	43.9	45.3	44.7	49.5	36.8	44.0	91.4	34.8	34.8	70.8
HAA (%)		43.1	45.7	44.8	54.1	54.3	53.8	50.8	47.6	51.1	50.3	48.1

¹Hydrophobic amino acid (HAA). ²Quoted from Kwon et al. (2022). Control, the supernatant of 4% (w/v) steam-dried concentrate (SDC) dispersion was obtained under the same reaction conditions without the enzyme treatment. TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2; EAA, Total essential amino acids; NEAA, Total non-essential amino acids; FRAA, Total free and released amino acid; HP, Total hydrolysate protein content. -, Not detected under this analytical condition.

함량도 환산할 수 있도록 하였다.

먼저, 효소 가수분해물들의 단백질 함량(HP, mg/100 g SDC) 들은 PR이 19,344 mg/100 g SDC으로 가장 높았으며, control (6,118 mg/100 g SDC)에 비하여 효소가수분해에 의해 약 3.16 배가량 증가하였다. Serine protease의 HP들은 각각 11,926 mg/100 g (TR) 그리고 10,952 mg/100 g (CH)이었고, cysteine protease로서 PA와 BR은 각각 14,474 그리고 12,628 mg/100 g SDC이었다. 또한 food-grade protease의 경우는 13,416–19,344 mg/100 g SDC 범위를 나타내어 가수분해로 인해 큰 폭으로 단백질 함량이 증가하였다.

한편, 효소 처리하지 않은 control의 FRAA (mg/100 g SDC) 은 4,385 mg/100 g SDC이었으며 그리고 효소에 의한 단백질의 분해로 인해, 모든 효소 가수분해물의 FRAA 및 개별 아미노산 함량들은 증가하였다.

따라서 효소의 가수분해 작용을 받아 가장 많은 FRAA 함량을 나타낸 가수분해물은 FL (12,258 mg/100 g SDC)이었고, 그 다음으로 PN (9,970 mg/100 g SDC)이었으며, 다른 효소 가수분해물에 비하여 현저히 높은 함량이었다. TR과 CH의 FRAA 은 각각 5,230 및 4,957 mg/100 g SDC, 그리고 PA 및 BR은 각각 6,464 및 6,274 mg/100 g SDC이었다. 또한 food-grade proteases인 AL, NE, PR 및 AA는 6,435.6–7,299.6 mg/100 g SDC 범위의 FRAA 함량을 나타내었다.

총 비필수 아미노산에 대한 필수 아미노산의 비율(EAA/NEAA)은 PA (1.12)를 제외하고, control (1.15)에 비해 증가하여 가수분해로 인한 필수 아미노산을 증가가 두드러졌으며, 특히 NE와 PN이 1.52로 SDC의 단백질분해를 통해 가장 많이 증가하였으며, 그 다음으로 PR (1.46)이었다.

가수분해물의 맛, 용해도, 거품 및 유화 형성능에 영향을 주는 소수성 아미노산 조성(hydrophobic amino acid, HAA)의 변화는, 모든 효소 가수분해물이 효소처리 하지 않은 control (43.1%)에 비하여 44.8–54.3% 범위로 증가하였다. 이들 중에는 BR (54.3%)이 HAA가 현저하게 증가하였다.

TR 및 CH의 아미노산 조성 중에서 control에 대비해 순 증가율을 보인 아미노산들은 Thr, Phe, His, Arg 및 Tyr이었다. 특히 Phe와 Tyr의 증가가 두드러졌으며, 이는 TR 및 CH가 serine protease로서 기질 특이성이 각각 염기성(Lys 및 Arg) 및 방향족 아미노산(Tyr, Phe 및 Trp)의 C-말단에 한정되어 있어, 이들 아미노산 주위에 Phe 및 Tyr과 같은 아미노산이 상대적으로 많이 분포하고 있는 것을 의미하였다. 또한 한정된 기질 특이성으로 인해 전반적으로 가수분해율이 낮을 뿐만 아니라(Table 2), FRAA도 상대적으로 낮았다.

PA 및 BR은 control보다 순 증가율을 나타낸 아미노산들은 Phe, His, Pro 및 Gly이었으며, 식물기원의 cysteine protease로서 PA 및 BR은 Phe, Pro 및 Gly과 같은 소수성 아미노산 잔기의 C-말단에 주위의 아미노산을 절단하는 비교적 넓은 기질 특이성을 가지고 있다. 따라서 순 증가율을 보인 이들 아미노

산이 절단 부위의 주변에 분포하고 있다는 것을 반영한 것이라 추정되었다. 미생물 기원의 food-grade protease 가수분해물들의 공통적인 특성은 Val, Leu, Phe, His, Pro 그리고 Gly의 순 증가율의 증가가 두드러졌다는 것, 그리고 serine 및 cysteine protease 가수분해물에 비해 현저하게 넓은 기질 특이성을 나타내었다는 것이다. 아울러 NE 및 PN의 필수 아미노산 조성(EAA, %)은 60.4%로서, control (53.5%)와 다른 가수분해물들(52.9–59.3%)에 비하여 높은 수준이었으며, 시판 protease 처리에 따른 필수 아미노산 함량이 증가하여 단백질 영양가를 강화하는 것으로 확인되었다.

전반적으로 가수분해물들의 단백질 함량(HP; mg/100 g protein)에 대한 FRAA의 비(FRAA/HP, %)에 있어서, FL (91.4%)이 가장 높은 비율을 나타내었으며, 그 다음으로 PN (70.8%)이었다. 그 외의 효소 가수분해물들은 34.8–49.5%의 범위였다. 이러한 결과는 효소의 가수분해 작용으로 가용성의 oligopeptide 또는 polypeptide 함량 뿐만 아니라 저 분자량의 아미노산 또는 peptides 함량을 증가시켜, 고 분자량의 단백질 성분들이 저 분자량 peptides로 전환되었음을 시사하였다.

효소 처리한 가수분해물은 초기 단백질 공급원, 사용된 효소 및 적용한 가공조건으로 인해, 기질 특이성에 따라 유리 또는 방출된 peptide는 생리활성에 있어서 서로 다른 양상을 나타내게 된다(Ishak and Sarbon, 2017). Val, Trp, Tyr, Leu, Ile, His 및 Pro와 같은 비극성 지방족 그룹을 갖는 소수성 아미노산은 소수성 다중 불포화 지방산(PUFA)과 반응하며, 고지질 함유 식품에서 라디칼 소거에 상당한 영향을 미치게 되며(Zhang et al., 2012), 방향족 잔기를 갖는 아미노산(Phe, Trp 및 Tyr)은 라디칼 소거에 있어 안정한 반응성 산소 종(ROS)을 형성하기 위해 양성자를 전자-결핍 라디칼(electron-deficient radicals)에 제공한다고 하였다(Sarmadi and Ismail, 2010). 또한 많은 연구에서 강력한 ACE 저해활성을 갖는 peptide는 C- 말단에 Trp, Phe, Tyr 또는 Pro 아미노산을 포함하고, N- 말단에 Val을 포함하는 극성 및 소수성 아미노산을 함유하는 것으로 보고되고 있다(Ghassem et al., 2011).

지금까지 보고된 아미노산 중에서 Gly, Pro, Val, Tyr 및 Glu는 가공부산물에서 유래된 대부분의 단백질 가수분해물에서 더 많이 발견되었으며(Himaya et al., 2012), peptide의 C- 말단에 Tyr, Phe, Trp, Ala, Gly 및 Pro의 존재는 ACE 억제 활성에 기여(Mahmoodani et al., 2014)하고, 반면에 소수성 아미노산 Pro, Tyr, Leu, Ala, Lys 및 Met은 항산화 peptide에 영향을 미친다고 보고한 바 있다(Wiriyaphan et al., 2012). 따라서, 기질 특이성에 따른 효소 가수분해물의 아미노산 조성의 차이와 변화는 식품 기능성, 항산화성 및 생리활성 등에 다양한 영향을 미칠 것으로 예상되었다.

SDC가수분해물의 단백질 분자량 분포

OFR로부터 제조한 증자-건조처리 SDC에 대한 시판 prote-

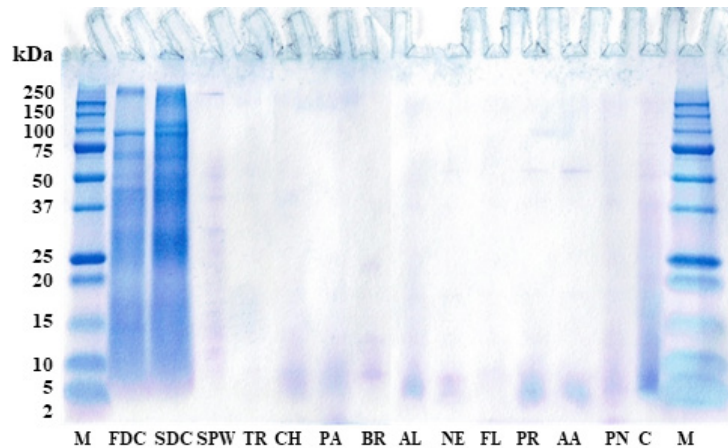


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of commercial proteases hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate by steam-dried process. M, Protein maker; FDC, Freeze-dried concentrate; SDC, Steam-dried concentrate; SPW, Steamed process water; TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2; C, Control.

ase 가수분해물들의 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 따른 단백질 분자량 분포는 Fig. 1에 나타내었다.

진공 동결건조 농축분말로서 FDC는 250 kDa에서 1개, 100–75 kDa에서 1개, 75–50 kDa에서 2개, 50–37 kDa에서 1개 그리고 37–10 kDa 범위에서 단백질 밴드는 아니지만 단백질 분포가 확인되었으며, 증자-건조처리 SDC는 250 kDa에서 1개, 150–100 kDa에서 1개, 100–50 kDa 범위에서 3개, 50–37 kDa에서 1개, 37–10 kDa에서 FDC보다 진한 단백질 분포가 확인되었다. 아울러 증자-건조처리 과정에서 발생하는 가공처리수(steamed processed water, SPW)에는 50–37 kDa에서 1개, 37–25 kDa에서 1개, 20–15 kDa에서 1개의 아주 연한 밴드가 관찰되었을 뿐이었으며, 이들 단백질 밴드들은 가용성의 단백질 것으로 추정되었다. 한편, 효소 처리하지 않은 control은 SDC로부터 유리된 가용성 단백질 분포에 대해 알아보기 위한 것으로 SPW와 유사한 패턴이었으며, 20–5 kDa의 단백질 분포가 SPW에 비해 진하게 관찰되었다.

SDC로부터 10종 시판 protease에 의한, 효소 가수분해물들의 분자량 분포는 SDC를 구성하고 있는 고 분자량 단백질을 저분자의 펩타이드로 분해된 것으로 확인되었다(Fig. 1). TR 및 FL을 제외한 효소 가수분해물들은 모두 10–5 kDa 이하의 단백질 분포가 일부 확인되었을 뿐이었으며, 시판 proteases에 의한 가수분해로 인해 대부분 저분자량 펩타이드는 전기영동 겔 상에서는 관찰되지 않았다. TR 및 FL은 공통적으로 어떠한 단백질 분포도 관찰되지 않았는데, 이는 이들 효소의 가수분해물의 가수분해율이 상대적으로 낮고, 2 kDa 이하의 저분자 peptide만이 생산되어 전기영동 겔의 한계 분자량 이하로 인해 관찰되지 않은 것이라 추정되었다.

rohu roe의 pepsin 및 TR 가수분해물의 SDS-PAGE patterns은 주로 10 kDa 이하의 저 분자량 peptide만이 관찰될 뿐이며, 기질 특이성에 따른 차이는 전기영동 상으로 관찰되지 않았다고 하였으며(Chalamaiah et al., 2013), Chalamaiah et al. (2010)과 그리고 Gimenez et al. (2009)는 각각 mrigal egg 가수분해물과 가자미(sole) 및 오징어의 젤라틴 가수분해물의 전기영동 패턴에 있어서 유사한 경향을 보인다고 하여, 단백질의 기원과 사용한 효소에 따른 가수분해물의 전기영동 패턴에는 차이가 없으며, 이는 효소의 기질 특이성에 따른 단백질분해가 진행된다고 하더라도 사용한 전기영동 겔의 분자량 한계 이하로 저분자화 된 peptide로 인해 전기영동 상에서 확인되지 않은 것에 기인하였다.

따라서 SDC에 대한 시판 proteases 가수분해물들의 단백질 분자량분포는 저분자량의 peptides만이 용해되어 가수분해물에 포함되었기 때문에 효소의 기질 특이성에 따른 단백질 분자량분포에는 거의 차이가 없었다.

거품 형성능

OFR로부터 제조한 증자-건조처리 SDC에 대한 시판 protease 가수분해물들의 식품 기능성으로서 FC, FS, EAI 그리고 ESI에 대하여 Table 4에 나타내었다.

먼저, 효소 처리하지 않은 control의 FC는 119.5%이었으며, 이때의 FS는 거품형성 직후 서서히 감소하여 15 min 이내에 완전히 거품이 사라진 것으로 나타나, 관찰되지 않았다. serine protease인 TR과 CH의 FC는 각각 181.5 및 187.3%이었으며, 거품 형성 직후, TR은 15 min 이내에 거품이 사라졌으나, CH의 경우는 15 min까지 35.8% 정도의 거품이 유지되어 거품안정성이 확인되었다. cysteine protease인 BR의 경우, FC는 187.6%

로 가장 강한 거품 형성능을 나타내었으며, FS도 30 min까지 64.8%의 거품이 유지되었다. 반면에 PA의 FC 및 FS는 관찰되지 않았다. 또한 NE 및 AA의 FC가 각각 151.5 및 141.3%를 나타내었으나, 거품 형성직후, 거품이 서서히 사라져 FS는 관찰되지 않았다. 그 외의 PA, AL, FL, PR 그리고 PN가수분해물들에서는 control보다 낮은 FC와 FS가 모두 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 CH와 BR이 FC 및 FS가 우수하였으나, 가수분해율(Table 2)과 FC 및 거품안정성 간의 상관관계는 확인되지 않았다. 그러나 효소 처리하지 않은 control에 비하여, TR, CH, BR, NE 및 AA가수분해물들의 FC는 효소 작용을 통해 개선되었음을 확인할 수 있었다.

어류 알의 거품 형성능에 관한 연구보고를 통해, 명태, 광어 및 가다랑어(Yoon et al., 2020) 및 황다랑어(Park et al., 2016) 진공 동결건조 농축물은 128–157% 범위, 황다랑어(Park et al., 2016) 및 가다랑어(Yoon et al., 2018) 가열-건조처리 농축물은 108–112% 범위라고 하여, 이 연구의 시판 protease 가수분해물들이 효소처리에 따른 거품형성능을 개선하는 확인되었다.

Intarasirisawat et al. (2012)은 탈지 가다랑어 알로부터 제조한 AL 가수분해물은 200%의 FC를 나타낸다고 하였으며, Pacheco-Aguilar et al. (2008)은 Pacific whiting *Merluccius productus* 육으로부터 제조한 AL, TR 및 pepsin가수분해물은 pH 4, 7 및 10에서의 가수분해율, 용해도에 따라 각기 FC가 다르며, 이는 가수분해물 중의 peptide들이 효소들의 기질 특이성에 따른 peptide의 조성, 크기, 순 전하(net charge) 변화로 인한 차이에 기인하기 때문이었다. 또한 가수분해율이 높은 어류 단백질 가수분해물의 FC가 낮은 것은 작은 크기의 peptide로 인

해 기포 주위에 안정한 거품 막의 생성을 방해하고, 과도한 가수분해로 친수성 peptide의 증가도 그 이유로서, 가수분해 정도 및 pH의 증가에 따라 거품 형성능은 감소하는 경향을 나타낸다(Souissi et al., 2007).

이상의 결과와 연구보고로부터 단백질 기원, 가공처리 방법 및 조건에 따라 다양한 거품 형성능을 나타내었으며, 이를 통해 제조 또는 회수한 단백질원의 FC는 보수력 및 용해도 그리고 가수분해 정도에 따라 영향을 받는 것으로 확인되었다. 특히 가수분해율이 높을수록 FC 및 거품안정성이 공통적으로 감소하는 경향을 나타낼 뿐만 아니라, 거품층이 유지되지 않아 ESI가 관찰되지 않았다. 따라서 식품 기능성을 고려한 효소 가수분해물의 제조에 있어서는 과도한 가수분해가 일어나지 않도록 하는 것이 고려해야 할 것으로 판단되었다.

유화 형성능(emulsifying properties)

한편 시판 protease 가수분해물들의 EAI과 ESI에 대한 결과(Table 4)는 먼저, 효소 처리하지 않은 control의 EAI는 9.7 m²/g protein으로 이때의 ESI는 34.9 min이었다. control에 비하여 유사하거나 우수한 EAI를 보인 가수분해물들은 PA (34.3 m²/g protein), CH (10.6 m²/g protein), BR (9.4 m²/g protein) 그리고 TR (9.0 m²/g protein)이었으며, 이를 제외한 food-grade proteases 가수분해물(1.4–5.3 m²/g protein)은 control보다 낮은 EAI를 나타내어, 효소의 가수분해로 인한 EAI의 개선 효과는 인정되지 않았다. 따라서 serine 및 cysteine 가수분해물들의 EAI (9.0–34.3 m²/g protein)가 food-grade protease 가수분해물에 비하여 유의적으로 우수하였으며, 이들의 ESI는

Table 4. Foaming capacity (FC), foam stability (FS), emulsifying activity index (EAI), emulsion stability index (ESI) of commercial proteases hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate by steam-dried process

Commercial proteases	FC (%)	FS (%)			EAI (m ² /g)	ESI (min)
		15 min	30 min	60 min		
Control	110.5±6.8 ^d	-	-	-	9.7±0.3 ^c	34.6±9.8
TR	181.5±1.6 ^a	-	-	-	9.0±0.3 ^d	35.1±5.7
CH	187.3±12.3 ^a	35.8±9.6	-	-	10.6±0.5 ^b	22.7±1.4
PA	103.7±3.0 ^e	-	-	-	34.3±1.3 ^a	51.5±3.0
BR	187.6±1.0 ^a	70.2±1.6	64.8±2.1	-	9.4±0.2 ^{cd}	25.7±1.6
AL	100.0±0.0 ^e	-	-	-	4.3±0.1 ^f	110.5±13.0
NE	151.5±6.2 ^b	-	-	-	5.3±0.2 ^e	21.3±1.1
FL	100.0±0.0 ^e	-	-	-	2.1±0.1 ^{gh}	50.5±5.2
PR	100.0±0.0 ^e	-	-	-	1.4±0.1 ^h	33.1±1.7
AA	141.3±4.9 ^c	-	-	-	2.6±0.3 ^g	22.6±2.9
PN	100.0±0.0 ^e	-	-	-	5.1±0.1 ^e	99.1±6.1

Control, the supernatant was obtained under the same reaction conditions without the enzyme. TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2; Values represent the mean±SD of n=3. Values with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test. -, Not detected.

22.7–51.5 min 범위로 가수분해율(Table 2)과는 역상관계이었다.

food-grade protease 가수분해물 중에서, 상대적으로 높은 EAI를 나타낸 것은 NE (5.3 m²/g protein)와 PN (5.1 m²/g protein)이었고 이들의 ESI는 각각 21.3 min과 99.1 min으로서 비교적 좋은 안정성을 나타내었다.

한편, 어류알의 유화 형성능에 관한 연구에서, 3종의 진공 동결건조 어류 알 농축물(Yoon et al., 2020)의 EAI는 10.0–20.2 m²/g protein 범위, 황다랑어(Park et al., 2016)와 가다랑어(Yoon et al., 2018) 알 가열-건조처리 농축물은 2.3–3.7 m²/g protein 범위라고 하여, 이 연구의 시판 proteases 가수분해물들에 비해 유사하거나 낮은 유화 형성능을 보여, 가수분해로 인해 전반적으로 유화 형성능은 감소한 것으로 확인되었다.

Chalamaiah et al. (2015)은 잉어 알의 pepsin, TR 및 AL가수분해물은 기질 특이성에 따른 서로 다른 아미노산 조성을 나타냄으로써, 이러한 peptide 조성의 차이는 순 전하의 차이를 유도하여 유화성과 ESI에 영향을 줄 수 있다고 하였으며, 가수분해율이 높으면 유화형성능이 상실될 수도 있다고 하였다(Kristinsson and Rasco, 2000; Gbogouri et al., 2004). 이러한 ESI는 가수분해율과 peptide 농도에 따라 다양하게 측정되고, 알 단백질 가수분해물의 농도, 분자특성, 및 사슬 길이에 따라 계면에서 서로 다른 ESI이 결정된다고 하였다(Intarasirisawat et al., 2012). 또한 Naqash and Nazeer (2013)은 pink perch의 TR가수분해물이 다른 효소 가수분해물에 비해 유화특성이 우수하다고 하여, 이는 효소 기질 특이성에 따른 영향에 기인한다고 하였다.

이상의 결과와 연구보고를 통해, 어종, 가공처리 방법 및 조건에 따라 다양한 유화 형성능을 나타내었으며, 특히 효소처리 가수분해물의 경우, 가수분해율이 높을수록 유화성 및 ESI가 감소하는 경향을 나타내어, 식품 기능성을 고려한 효소 처리는 과도한 가수분해가 일어나지 않는 것이 유화 형성능의 개선에 고려해야 할 것으로 판단되었다. 이 연구에서는 control을 제외한 TR, CH, PA, BR 및 NE 가수분해물들이 유화형성능이 상대적으로 우수하였다.

항산화 및 항고혈압 활성

OFR로부터 제조한 증자-건조처리 SDC의 시판 proteases 가수분해물들의 항산화 활성으로 ABTS+ 라디칼 소거활성(IC₅₀, µg/mL) 및 tyrosinase 저해활성(%) 그리고 항고혈압 활성으로 ACE 저해활성은 Table 5에 나타내었다.

ABTS+ 라디칼 소거활성

먼저 ABTS+ 라디칼 소거활성(IC₅₀, µg/mL)은 효소 처리하지 않은 control (60.4 µg/mL)이었으나, 효소 가수분해물 중에서는 PN이 69.8 µg/mL으로 가장 우수하였으며, 다음으로는 FL (69.8 µg/mL)이었다. 그 외의 다른 효소 가수분해물들은 82.7–98.9 µg/mL 범위의 ABTS+ 라디칼 소거활성을 나타내

었다. 그러나 모든 효소 가수분해물들은 control에 비해 유의적으로 낮은 수준이었다(P<0.05). 한편, serine protease CH가 TR에 비해 우수하였으며, cysteine protease의 경우 BR이 상대적으로 PA보다 우수하였으나, food-grade protease 가수분해물들에 비하여는 전반적으로 낮은 수준이었다.

Yoon et al. (2020)은 어류알로부터 제조한 진공 동결건조 농축물의 ABTS+ 라디칼 소거활성(IC₅₀)은 130–180 µg/mL 범위의 소거활성을 나타내었으며, 어종에 따른 유의적인 차이를 보여, 이들 중에서 넙치 알 진공 동결건조 농축물이 가장 강한 소거활성을 나타내었다고 하였다(P<0.05). 또한 새우 가공부산물 효소 가수분해물 (160–170 µg/mL; Kim et al., 2016), 황다랑어(82 µg/mL; Yoon et al., 2019) 및 가다랑어알 분리단백질(103 µg/mL; Cha et al., 2020), 어류알의 가공 중에 발생하는 가공처리수(33–160 µg/mL; Lee et al., 2017), 그리고 물 추출물(28–45 µg/mL) 및 자숙수(55–110 µg/mL; Yoon et al., 2017)의 ABTS+ 라디칼 소거활성에 따른 항산화능은 어류알 농축물이나 분리단백질에 비하여는 이 연구의 가수분해물이 우수한 반면에, 추출물 및 가공처리수에 비하여는 유사하거나 다소 낮은 활성을 나타내었다.

Alemán et al. (2011a, 2011b)는 오징어와 참치 껍질에 대한 가수분해물의 항산화 활성은 AL, collagenase, TR 및 pepsin의 경우 가수분해율의 증가에 따라 ABTS+ 소거 활성이 감소하는

Table 5. Anti-oxidative and anti-hypertensive activities of commercial proteases hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrate by steam-dried process

Commercial proteases	ABTS ⁺ , IC ₅₀ (µg/mL)	Tyrosinase inhibitory activity (%)	ACE inhibitory activity (%)
Control	60.4±0.5 ^a	-	80.9±1.8 ^c
TR	91.6±0.5 ^g	-	82.2±2.5 ^{bc}
CH	82.2±0.7 ^d	-	90.7±3.7 ^a
PA	98.9±0.3 ^h	1.9±2.1 ^c	64.6±7.2 ^d
BR	85.2±0.6 ^f	-	80.4±2.6 ^c
AL	83.6±0.5 ^e	-	87.6±3.3 ^{ab}
NE	84.7±0.5 ^f	-	80.4±2.9 ^c
FL	69.8±0.8 ^c	12.5±1.9 ^b	77.6±3.4 ^c
PR	83.1±0.6 ^{de}	11.1±1.9 ^b	89.0±3.8 ^a
AA	82.7±0.7 ^{de}	18.6±1.8 ^a	89.2±1.6 ^b
PN	68.1±0.9 ^b	-	82.3±1.4 ^{bc}

IC₅₀, The half maximal inhibitory concentration. Control, The supernatant was obtained under the same reaction conditions without the enzyme. TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2. Values represent the mean±SD of n=3. Values with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

경향이라고 하였으며, Choopicharn et al. (2015)는 티라피아 껍질에 대한 효소 가수분해물의 ABTS+ 소거활성은 FL 및 TR 가수분해물에서 가장 높았지만 PA와 Neurase는 상대적으로 소거활성이 낮았다고 보고하였다. Chalamaiah et al. (2013)은 rohu roe로부터의 TR 및 pepsin 가수분해물이 우수한 ABTS+ 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 서로 다른 농도에서 TR 가수분해물이 32–91%, 그리고 pepsin은 37–80%의 라디칼 소거활성을 나타낸다고 하였다. ABTS+ 라디칼을 소거하는 가수분해물의 능력은 효소의 종류, 가수분해율, 용해도, peptides 종류 및 효소에 의해 유리 또는 방출되는 아미노산의 조성과 같은 여러 요인에 따라 달라진다고 하였다(Phanturat et al., 2010).

Tyrosinase 저해활성

OFR로부터 제조한 증자-건조처리 농축물(SDC)의 시판 protease 가수분해물들의 tyrosinase 저해활성(Table 5)은 먼저 효소 처리하지 않은 control, serine (CH 및 TR) cysteine (PA 및 BR) protease 가수분해물에서는 저해활성을 나타내지 않았으나, food-grade proteases 가수분해물 중에서 FL (12.5%), PR (11.1%) 그리고 AA (18.6%)만이 저해활성을 나타내어 *in vitro* 상의 미백효과가 일부 인정되었다.

황다랑어(Yoon et al., 2019) 및 가다랑어(Cha et al., 2020) 알로부터 회수한 분리 단백질의 tyrosinase 저해활성은 각각 14.0% 및 13.5%라고 하였으며, 이들의 가공처리수(Lee et al., 2017)에 대해서는 14.6–20.8% 범위의 저해활성을 나타내어, 다소의 미백효과가 기대된다고 보고하였다. 반면에 Yoon et al. (2017)은 어류 알 추출물과 이의 가공처리 자숙수의 tyrosinase 저해활성은 각각 7.5–14.2% 및 0.4–2.5% 수준으로, tyrosinase 저해활성으로 살펴본 결과로는 미백효과를 기대하기 어렵다고 하였다. 그러나 Zhuang et al. (2009)은 해파리 콜라겐에 대한 TR 가수분해물의 tyrosinase 저해활성은 단백질농도가 5 mg/mL에서 50%의 저해활성을 나타내 강한 항산화활성과 Cu²⁺-chelating 활성을 보인다고 하여, 이 연구의 결과에 비해 상대적으로 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 항산화와 관련한 생리활성으로서 tyrosinase 저해활성으로 살펴본 결과, SDC에 대하여 FL, PR 및 Aroase-AP10의 식품급 효소를 이용한 가수분해물을 제조한다면 일부 미백효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다.

또한 항산화 peptides의 대부분은 5–16개의 극성(Asp, Glu 및 Lys) 및 소수성 아미노산(Gly, Ala, Leu, His, Pro, Tyr 및 Phe)을 포함하는 비교적 짧은 사슬의 peptides라고 하였으나, peptides의 항산화 활성에 대한 개별 아미노산 잔기의 특이적 기여는 반응성 산소종(ROS) 또는 유리 라디칼 및 반응 medium의 성질에 따라 크게 달라진다고 하였다(Ishak and Sarbon, 2017).

ACE 저해활성

OFR로부터 제조한 증자-건조처리 농축물(SDC)의 시판 proteases 가수분해물들의 angiotensin converting enzyme (ACE)

저해활성(Table 5)은 control을 포함하여 모든 효소 가수분해물의 ACE 저해활성은 64.6–90.7% 범위의 강한 저해활성을 나타내었으며, control (80.9%)보다 상대적으로 약한 저해활성을 나타낸 효소 가수분해물들은 PA (64.6%), NE (80.4%) 및 FL (77.6%)이었으며, 나머지 효소 가수분해물들은 control보다 강한 저해활성을 나타내었다. 특히 TR 및 CH는 가수분해율(Table 2)이 낮음에도 불구하고 강한 저해활성을 나타내어, 이들 효소의 기질 특이성(염기성 및 방향족 아미노산의 C-말단을 분해)에 따른 영향이라고 추정되었다. 아울러 가수분해율이 20% 이상인 AL, PR 그리고 AA 가수분해물들이 ACE 저해활성(87–89%)에서도 높은 경향을 나타내었다. 따라서 SDC에 대한 효소처리 가수분해물은 serine protease에 의한 기질 특이성과 더불어 food-grade proteases에 의한 가수분해율이 높을수록 ACE 저해활성이 강해지는 경향이었으며, 이를 통해 항고혈압 활성을 기대할 수 있었다.

Yoon et al. (2020)은 진공 동결건조 어류 알 농축물의 ACE 저해활성(IC50, mg protein/mL)은 황다랑어(0.92 mg/mL)가 다른 어종에 비해 유의적으로 강한 저해활성을 나타낸다고 하였으며, 황다랑어(Yoon et al., 2019) 및 가다랑어알 분리 단백질(Cha et al., 2020)의 ACE 저해활성(%)은 각각 35.7% 및 44.0%의 저해활성을 나타내어, 이 연구의 SDC의 가수분해물들보다 저해활성이 유사하거나 다소 약한 것으로 확인되었다.

굴의 다양한 효소 가수분해물의 경우, 1.49–16.31 mg/mL 범위로서, PR 가수분해물이 가장 우수하다고 하였고(Chung et al., 2006), 효소분해 붉은 대게 자숙수(Kang et al., 2007)의 ACE 저해능은 1.40–1.74 mg/mL 범위라고 하였다. Kim et al. (2016)은 새우 가공부산물에 대한 효소 가수분해물의 ACE 저해활성은 PR 가수분해물이 가장 우수하였고, 그 다음으로 FL, AL, PA 그리고 TR 순이라고 보고한 바 있다. 수산 가공부산물의 단백질 자원인 skate 껍질 gelatin (Ngo et al., 2014), yellow sole 프레임(Jung et al., 2006), 가다랑어알(Intarasirisawat et al., 2013) 그리고 태평양 대구 껍질(Himaya et al., 2012)의 효소 가수분해물은 35–86%의 ACE 저해활성을 나타낸다고 보고하여, 이 실험의 결과가 우수한 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 통해 OFR로부터 증자-건조처리로 제조한 SDC의 가수분해물들은 FL, PR, AA 및 PN이 항산화 활성에서, CH, AL, PR, AA에서 강한 항고혈압활성을 보였고, TR, CH, PA 및 BR의 식품 기능성이 우수하였다.

아울러 FL, PR 및 AA 가수분해물들은 *in vitro* 미백효과가 일부 확인됨으로써, 자외선 protection 화장품 소재의 일부로서 이용될 수 있으리라 기대되었다. 전반적으로 식품 기능성 및 생리활성에 따르면 TR, BR, FL 및 PR 가수분해물이 우수하였다. 따라서, 이들 가수분해물은 기능성 식품소재로서 새로운 형태의 기능성 강화 음료, 수산가공품 및 전통식품 가공산업에 적용 가능할 것이다.

References

- Adebiyi AP, Adebiyi AO, Hasegawa Y, Ogawa T and Muramoto K. 2009. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *Eur Food Res Technol* 228, 391-401. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0945-4>.
- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27, 1256-1262. <http://doi.org/10.1021/jf60226a042>.
- Ahn CB, Je JY and Cho YS. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Res Int* 49, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.002>.
- Alemán A, Giménez B, Montero P and Gómez-Guillén MC. 2011a. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT Food Sci Technol* 44, 407-413. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.003>.
- Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudín I, Gómez-Guillén MC and Montero P. 2011b. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res Int* 44, 1044-1051. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.010>.
- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D and Nasri M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem* 118, 559-565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.
- Cha JW, Yoon IS, Lee GW, Kang SI, Park SY, Kim JS and Heu MS. 2020. Food functionalities and bioactivities of protein isolates recovered from skipjack tuna roe by isoelectric solubilization and precipitation. *Food Sci Nutri* 8, 1874-1887. <http://doi.org/10.1002/fsn3.1470>.
- Chalamaiah M, Hemalatha MD, Jyothirmayi T, Diwan PV, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Ramesh Kumar R and Dinesh Kumar B. 2015. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition* 31, 388-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.08.006>.
- Chalamaiah M, Narsing Rao G, Govardhana Rao D and Jyothirmayi T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chem* 120, 652-657. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.057>.
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Hemalatha R and Dinesh Kumar B. 2013. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Res Int* 52, 221-229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.020>.
- Choonpicharn S, Jaturasitha S, Rakariyatham N, Suree N and Niamsup H. 2015. Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *J Food Sci Technol* 52, 3134-3139. <http://doi.org/10.1007/s13197-014-1581-6>.
- Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS and Heu MS. 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 919-925. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.7.919>.
- Diniz FM and Martin AM. 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT Food Sci Technol* 30, 266-272. <https://doi.org/10.1006/food.1996.0184>.
- Dong FD and Bechtel P. 2010. Fish Leftovers: New Life Ahead for Today's Discards?. Retrieved from <https://agresearch-mag.ars.usda.gov/2010/oct/leftovers> on Jul 22, 2024.
- Fang X, Xie N, Chen X, Yu H and Chen J. 2012. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food Bioprod Process* 90, 676-682. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.001>.
- Foh MBK, Wenshui X, Amadou I and Jiang Q. 2012. Influence of pH shift on functional properties of protein isolated of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscles and of soy protein isolate. *Food Bioprocess Technol* 5, 2192-2200. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0496-0>.
- Galla NR. 2014. Physico-chemical, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates from *Cyprinus carpio* and *Epinephelus tauvina*. *J Food Pharm Sci* 2, 15-22.
- Galla NR, Karakala B, Akula S and Pamidighantam PR. 2012a. Physico-chemical, amino acid composition, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates obtained from *Channa striatus* and *Lates calcarifer*. *Food Chem* 132, 1171-1176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.055>.
- Galla NR, Pamidighantam PR, Akula S and Karakala B. 2012b. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chem* 135, 1479-1484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.098>.
- Gehring CK, Gigliotti JC, Moritz JS, Tou JC and Jaczynski J. 2011. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review. *Food Chem* 124, 422-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.078>.
- Gbogouri GA, Linder M, Fanni J and Parmentier M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *J Food Sci* 69, 615-622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>.
- Ghassem M, Arihara K, Babji AS, Said M and Ibrahim S. 2011. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food Chem* 129, 1770-

1777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.051>.
- Giménez B, Alemán A, Montero P and Gómez-Guillén MC. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem* 114, 976-983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.050>.
- Heu MS, Kim HS, Jung SC, Park CH, Park HJ, Yeum DM, Park HS, Kim CG and Kim JS. 2006. Food component characteristics of skipjack (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) roes. *J Kor Fish Soc* 39, 1-8. <https://doi.org/10.5657/kfas.2006.39.1.001>.
- Himaya SWA, Ngo DH, Ryu BM and Kim SK. 2012. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chem* 132, 1872-1882. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.020>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W and Wu J. 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chem* 135, 3039-3048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.076>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S and Visessanguan W. 2011. Chemical compositions of the roes from skipjack, tongol and bonito. *Food Chem* 124, 1328-1334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.076>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S, Wu J and Visessanguan W. 2013. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *J Funct Foods* 5, 1854-1862. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.006>.
- Ishak NH and Sarbon NM. 2017. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food Bioprocess Technol* 11, 2-16. <http://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>.
- Jung WK, Mendis E, Je JY, Park PJ, Son BW, Kim HC, Choi YK and Kim SK. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 94, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.048>.
- Kang KT, Heu MS and Kim JS. 2007. Improvement on the quality and functionality of red tanner crab cooking drip using commercial enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36, 1022-1030. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.8.1022>.
- Kim HJ, Park KH, Shin JH, Lee JS, Heu MS, Lee DH and Kim JS. 2011. Antioxidant and ACE inhibiting activities of the rockfish *Sebastes hubbsi* skin gelatin hydrolysates produced by sequential two-step enzymatic hydrolysis. *Fish Aquat Sci* 14, 1-10. <http://doi.org/10.5657/fas.2011.14.1.001>.
- Kim SB, Yoon NY, Shim KB and Lim CW. 2016. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of northern shrimp (*Pandalus borealis*) by-products hydrolysate by enzymatic hydrolysis. *Fish Aquat Sci* 19, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0028-6>.
- Klomklao S and Benjakul S. 2016. Utilization of tuna processing byproducts: Protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera. *J Food Process Preserv* 41, e12970. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12970>.
- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D and Shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem* 102, 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>.
- Kristinsson HG and Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40, 43-81. <http://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
- Kwon IS, Yoon IS, Kang SI, Kim JS, Kim HJ and Heu MS. 2022. Food characteristics of olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrates prepared using a cook-dried process. *Korean J Fish Aquat Sci* 55, 791-801. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0791>.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lee GW, Yoon IS, Kang SI, Lee SG, Kim JI, Kim JS and Heu MS. 2017. Functionality and biological activity of isolate processed water generated during protein isolate preparation of fish roes using an isoelectric solubilization and precipitation process. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 694-706. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0694>.
- Lee HJ, Park SH, Yoon IS, Lee GW, Kim YJ, Kim JS and Heu MS. 2016. Chemical composition of protein concentrate prepared from yellowfin tuna *Thunnus albacores* roe by cook-dried process. *Fish Aquat Sci* 19, 12. <http://dx.doi.org/10.1186/s41240-016-0012-1>.
- Li GH, Le GW, Shi YH and Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res* 24, 469-486. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>.
- Jianhua L, Lyu F, Zhou X, Wang B, Wang X and Ding Y. 2015. Preparation of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysate using combined controlled enzymatic hydrolysis and glycation for improved solubility and emulsifying properties. *J Food Nutr Res* 3, 471-477. <https://doi.org/10.12691/jfnr-3-7-9>.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Mahmoodani F, Ghassem M, Babji AS, Yusop SM and Khos-

- rokhavar R. 2014. ACE inhibitory activity of pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) skin and bone gelatin hydrolysate. *J Food Sci Technol* 51, 1847-1856. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0742-8>.
- Mahmoud KA, Linder M, Fanni J and Parmentier M. 2008. Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. *Process Biochem* 43, 376-383. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.011>.
- Mariod AA, Fathy SF and Ismail M. 2010. Preparation and characterisation of protein concentrates from defatted kenaf seed. *Food Chem* 123, 747-752. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.045>.
- MOF (Ministry of Ocean and Fisheries). 2023. Statistical Yearbook of Oceans and Fisheries. Retrieved from https://www.mof.go.kr/statPortal/bbs/publication/view.do?ntt_id=1226&pageIndex=&searchType=&searchQuery= on Jul 22, 2024.
- Naqash SY and Nazeer RA. 2013. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *J Food Sci Technol* 50, 972-978. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0416-y>.
- Ngo DH, Ryu B and Kim SK. 2014. Active peptides from skate (*Okamejei kenoei*) skin gelatin diminish angiotensin-I converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. *Food Chem* 143, 246-255. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.067>.
- Pacheco-Aguilar R, Mazorra-Manzano MA and Ramírez-Suárez JC. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chem* 109, 782-789. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.047>.
- Park SH, Lee HJ, Yoon IS, Lee GW, Kim JS and Heu MS. 2016. Protein functionality of concentrates prepared from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) roe by cook-dried process. *Food Sci Biotechnol* 25, 1569-1575. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0242-0>.
- Park YB. 2009. Characteristics of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from Aroase AP10 hydrolysate of octopus. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38, 177-181. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.2.177>.
- Phanturat P, Benjakul S, Visessanguan W and Roytrakul S. 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT Food Sci Technol* 43, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.010>.
- Sarmadi BH and Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949-1956. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>.
- Shahidi F. 1994. Sea food processing by-products. In: *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Shahidi F and Botta JR, eds. Springer, New York, NY, U.S.A., 321-334. <http://doi.org/10.1007/978-1-4615-2181-5>.
- Sikorski ZE. 1994. The contents of proteins and other nitrogenous compounds in marine animals. In: *Seafood Proteins*. Sikorski ZE, Pan BE and Shahidi F, eds. Springer, New York, NY, U.S.A., 6-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7828-4_2.
- Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y and Nasri M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technol Biochem* 45, 187-194.
- Thiansilakul Y, Benjakul S and Shahidi F. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J Food Biochem* 31, 266-287. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00111.x>.
- Wiriyaphan C, Chitsomboon B and Yongsawadigul J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chem* 132, 104-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.040>.
- Yoon IS, Kim HJ, Kang SI, Kim DY, Lee CY, Jeong UC, Kim JS and Heu MS. 2020. Food functionality and bioactivity of vacuum freeze-dried fish roe concentrates. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 403-416. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0403>.
- Yoon IS, Lee GW, Kang SI, Park SY, Kim JS and Heu MS. 2017. Food functionality and biological activity of processed waters produced during the preparation of fish roe concentrates by cook-dried process. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 506-519. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0506>.
- Yoon IS, Lee GW, Kang SI, Park SY, Lee JS, Kim JS and Heu MS. 2018. Chemical composition and functional properties of roe concentrates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) by cook-dried process. *Food Sci Nutr* 6, 1276-1286. <https://doi.org/10.1002/fsn3.676>.
- Yoon IS, Lee HJ, Kang SI, Park SY, Kang YM, Kim JS and Heu MS. 2019. Food functionality of protein isolates extracted from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) roe using alkaline solubilization and acid precipitation process. *Food Sci Nutr* 7, 412-424. <http://doi.org/10.1002/fsn3.793>.
- Yoon IS, Kang SI, Kim JS, Kwon IS, Kim HJ and Heu MS. 2023. Food functionality and *in vitro* bioactivity of olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe concentrates prepared by cook-dried process. *Korean J Fish Aquat Sci* 56, 7-20. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0007>.
- Zhang Y, Duan X and Zhuang Y. 2012. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides* 38, 13-21. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>.
- Zhou D, Qin L, Zhu B, Li D, Yang J, Dong X and Murata Y. 2012. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of *in vitro* antioxidant activity

of the hydrolysate. J Sci Food Agric 92, 1694-1701. <http://doi.org/10.1002/jsfa.5534>.

Zhuang YL, Zhao X and Li BF. 2009. Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. J Zhejiang Univ Sci B 10, 572-579. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0920081>.