

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 알의 분리단백질로부터 제조한 효소 가수분해물의 식품기능 특성 및 생리활성

강상인 · 윤인성 · 김민교¹ · 허민수^{1*}

경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ¹경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소

Food Functionality and Bioactivity of Enzyme Hydrolyzates Prepared Using Protein Isolates from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Roes

Sang in Kang, In Seong Yoon, Min Kyo Kim¹ 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

Roe protein hydrolyzates were prepared from protein isolate of olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using various proteases, and their bioactivity and functional properties were investigated. Pantidase NP-2 (PN, 14.2%) showed the highest degree of hydrolysis, followed by flourzyme (FL, 6.7%) and aroase AP-10 (AA, 6.5%). Free and released amino acid contents were significantly higher in PN (2,931.2 mg/100 g) and FL (2,725.6 mg/100 g) than in the other hydrolyzates (437.3–812.8 mg/100 g). The foaming activities (%) of papain (PA), trypsin (TR), and bromelain (BR) hydrolyzates were 193.4%, 176.7%, and 144.2%, respectively. The emulsifying activity indices of PA, BR, chymotrypsin, and TR (9.5–30.9 m²/g-protein) were superior to those of other the hydrolyzates (2.0–8.0 m²/g-protein, (P<0.05). The 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo- thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺) radical scavenging activities of prota-mex (PR, 108 µg/mL) and AA (115.5 µg/mL) were more potent (P<0.05). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of all enzyme hydrolyzates (52.0–83.3%) were more robust compared with that of control. Among the enzyme hydrolyzates, AA, FL, and PR showed relatively good tyrosinase inhibitory activities compared to that of the control (29.3%). Bioactivity and food functional properties showed that TR, BR, AA, and FL were superior.

Keywords: Enzyme hydrolysates, Food functionality, Protein isolate, Olive flounder, Roe

서 론

우리나라의 대표 양식어류인 넙치(oliver flounder *Paralichthys olivaceus*)는 다소비 어종으로서 우리나라 전체 양식산 어류의 50% 이상을 차지하고 있으며, 조리 및 가공 시 머리, 중골 frame, 비늘, 내장, 껍질, 알 등과 같은 비가식 수산부산물 이 다량 발생한다(Kang et al., 2023a, 2024a). 이러한 수산부산물의 재활용(up-cycling 또는 reuse)은 그 경제적 효과와 영양적 이점으로 인해 수산가공산업에 있어서 큰 관심을 받고 있으며(Lee et al., 2016a, 2016b; Kang et al., 2023a, 2024a), 최

근 몇 년간 다양한 연구를 통해 수산부산물의 기능성 식품소재 또는 단백질 및 지질보충제로서의 이용에 관한 연구가 진행됨으로써, 수산부산물의 무단 폐기로 인한 처리비용 및 발생량을 경감시키는 계기가 될 것이다(Galla et al., 2012; Kim et al., 2016; Kang et al., 2023b). 따라서 수산부산물로부터 주요 구성분인 단백질을 회수하고자 하는 노력은 새로운 단백질 급원을 저비용으로 산업적 생산이 가능하기 때문에 매우 중요하다(Kim et al., 2015; Lee et al., 2016b, 2017; Yoon et al., 2017, 2018a, 2019; Kang et al., 2023a, 2024a). 이러한 수산부산물로부터 단백질 자원의 회수와 이용에 관한 연구는 효소(Kang et

*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.2025.0001>

Korean J Fish Aquat Sci 58(1), 1-14, February 2025

Received 26 August 2024; Revised 7 October 2024; Accepted 12 December 2024

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

al., 2023b) 및 저해제(Kim et al., 2015), 콜라겐 및 젤라틴(Kim et al., 2011), 가공처리수(Lee et al., 2017; Yoon et al., 2017)와 같은 유용 기능성분의 회수, 단백질 농축물(Chalamaiah et al., 2013a; Lee et al., 2016a; Yoon et al., 2018b), 분리 단백질(Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2019; Cha et al., 2020), 효소 가수분해물(Intarasirisawat et al., 2013, 2014; Chalamaiah et al., 2015; Kang et al., 2024b)의 제조 및 식품기능성(Chalamaiah et al., 2015; Park et al., 2016; Yoon et al., 2018b), 항산화성 그리고 이의 생리활성(Intarasirisawat et al., 2013, 2014)에 대하여 연구가 이루어졌다. 이러한 연구를 통하여 단백질 영양강화용 식품소재로 개발한다면 그 가치는 5배 이상 증가할 것이라고 예상된다(Liu et al., 2015).

한편, 단백질의 효소적 변형(enzymatic modification)은 proteases의 작용으로 구조적, 물리화학적, 기능적 특성의 변화를 일으켜, 식품소재로서 사용 가능한 새로운 또는 개선된 기능성을 갖는 펩티드를 얻기 위해 식품 산업에서 널리 활용되고 있다(Sampath Kumar et al., 2012). 현재 효소를 이용한 단백질 가수분해물의 생산에는 동식물 및 미생물 기원의 trypsin (TR), chymotrypsin, pepsin, papain (PA), bromelain (BR), proteinase K, Alcalase® (AL), Protamex® (PR), Flavourzyme® (FL), Neutrase® (NE), Aroase AP-10 (AA) 그리고 pantidase NP-2 (PN)와 같은 시판 proteases는 단백질 가수분해물의 제조에 널리 이용되고 있다(Souissi et al., 2007; Park, 2009; Intarasirisawat et al., 2012, 2013, 2014; Sampath Kumar et al., 2012; Ovisipour et al., 2013).

천연 단백질로부터의 효소적 가수분해는 용해도, 유화 및 거품 형성능을 포함한 식품기능성을 개선하지만(Shahidi, 1994; Intarasirisawat et al., 2012), 과도한 가수분해는 오히려 계면 성질과 같은 기능적 특성에 부정적인 영향을 미칠 수도 있다(Intarasirisawat et al., 2012). 이 같은 기능적 특성의 변화는 효소적 가수분해에 의해 생성된 peptides 및 유리된 아미노산과 관련이 있으며, 이는 주로 저분자화, 소수성 잔기의 노출 그리고 이온성의 증가로 인해, 단백질 가수분해물이 식품에 적용하였을 때, 보수력, 조식감, 겔화능, 용해도, 및 유화능과 같은 기능적 특성이 개선된다고 하였다(Liu et al., 2015; Kang et al., 2024b). 따라서 이들 단백질 가수분해물들은 잠재적인 생리활성과 필수영양소를 회수하는데 효과적인 방법이며, 영양특성 및 생리적인 가치를 잃지 않으면서 식품 단백질의 기능적인 특성을 개선시킬 수 있는 수단이다(Chalamaiah et al., 2013a, 2013b, 2015). 아울러 시험관 질환, 암, 염증을 포함한 여러 질병의 예방 또는 치료효과 때문에 기능식품(nutraceuticals) 및 의약품으로 개발 가능성도 크다고 하였다(Intarasirisawat et al., 2013, 2014).

이 연구에서는 저활용 수산부산물인 넙치 알로부터 등전점 용해/침전공정을 통해 분리한 단백질(roe protein isolate, RPI)을 대상으로, 시판 proteases의 기질특이성에 따른 가수분해물(roe

protein hydrolysate)을 제조하였다. 이를 통해 기능 특성의 개선 및 생리활성에 대해 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

넙치(olive flounder *Paralichthys olivaceus*)는 평균 체장 45–55 cm 그리고 체중 1.2–2 kg 정도로서, 통영시 소재 수산시장에서 20마리 내외로 총 5회에 걸쳐 살아있는 채로 구입하여, 실험실로 운반한 후, 개체당 알 중량(5–10%)은 75–150 g 정도로서 총 6 kg 정도를 채취하였습니다. 채취한 넙치 알(olive flounder roes, OFR)은 흐르는 물에 간단히 수세한 다음, 파우치형 티백(tea bag, polyethylene polypropylene, 16×14.5 cm)에 300 g씩 소분하여 밀봉상태로 분리단백질 회수에 사용할 때까지 -55°C에서 보관하였다.

OFR로부터 효소 가수분해물의 제조에 사용한 효소들은 trypsin (porcine pancreas), α -chymotrypsin (bovine pancreas), bromelain (pineapple stem) 및 papain (papaya latex)은 Sigma-Aldrich Chemical Co., LLC. (St. Louis, MO, USA)의 제품을, Alcalase® 2.5 L type DX (*Bacillus licheniformis*), Flavourzyme® 500 MG (*Aspergillus oryzae*), Neutrase® 0.8 L (*Bacillus amyloliquefaciens*) 그리고 Protamex® (*Bacillus* sp.)은 Novozymes (Bagsvaerd, Denmark)의 제품을, Aroase AP-10 (*Bacillus subtilis*) 그리고 Pantidase NP-2 (*Aspergillus oryzae*)은 Yakult Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)의 제품을 각각 구입하였으며, 이외의 실험에 사용한 시약은 분석급 시약을 구입하여 사용하였다.

OFR로부터 분리단백질의 회수

OFR로부터 등전점 용해/침전 공정(isoelectric solubilization/precipitation process, ISP)을 통한 RPI의 회수는 Lee et al. (2016b)의 방법을 다소 수정한 Kang et al. (2023a)에 따라 제조하였다.

일정량의 동결상태로 보관한 OFR은 부분 해동(4°C, 12 h)하고, 6배량의 탈이온수를 가해, 균질기(POLYTRON® PT 1200E; KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland; 25,000 rpm, 5 min)로 균질화하였다. 여기에 2 N sodium hydroxide 용액을 사용하여 pH 12로 조정하여 알칼리 용해과정(4°C, 1 h)을 통해 단백질의 용해와 내인성 효소의 불활성을 유도하였다. 이어서 냉동 원심분리기(Supra 22K; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)로 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min)하였다. 원심분리 상층액에 대해 2 N HCl을 가하여 pH 4.5가 되도록 재조정하여 산 침전과정(4°C, 1 h)을 진행하였다. 이렇게 목적 pH로 조정된 현탁액을 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min)하고, 이때의 잔사는 ISP 공정을 통해 생성된 NaCl의 제거를 위해 탈이온수로 수세한 다음, 동결 건조하여 최종 넙치 알

RPI를 회수하였다. 회수한 RPI는 일정량씩 소분하여 용기에 담아 보관(-20°C)하면서 효소 가수분해물의 제조에 사용하였다. 이때 RPI의 수율(Kang et al., 2023a)은 13.2 g/100 g-sample 이었다.

RPI의 효소 가수분해물 제조

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPI의 4% (w/v) 분산 용액은 상온(20±2°C)에서 2 h 동안 전 단계반응을 실시하였다. 앞서 서술한 시판 proteases에 대한 정보를 토대로, serine proteases인 TR과 CH의 첨가 비율은 RPI 분산용액의 단백질 함량(4% w/v)에 대해 이들 효소농도가 0.8% (E/S, 1/125)이 되도록 첨가하여 효소반응액을 제조하였다.

또한 cysteine proteases인 BR과 PA 그리고 food-grade proteases인 AL, NE, PR, FL, AA 및 PN의 최종 첨가농도는 4% 분산용액의 단백질 함량에 대하여 이들의 최종 효소농도가 4% (w/w, E/S, 1/25)가 되도록 효소반응액을 각각 제조하였다. 효소반응액은 진탕 항온수조(50°C)에서 150 min 반응(가수분해) 하고, 반응 정지는 80°C에서 20 min 진행하였다. 이들 효소반응액을 원심분리 (1,890 g, 30 min, 4°C)하여 얻은 상층액은 각각의 효소 가수분해물로서 -20°C에서 보관하면서 이후 식품 기능성 및 생리활성의 측정을 위한 시료로 사용하였다.

단백질 농도

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

가수분해율

먼저, RPI는 시료 0.2 g과 40 mL의 1 N NaOH 용액을 사용하여 완전 용해시켜 용액중의 단백질 농도를 Lowry's (1951) 법으로 측정하여 단백질 함량(%)을 구하고, 이를 가수분해물의 제조를 위한 4% (w/v)의 RPI분산용액의 총 단백질함량을 구하였다. 이어서, 효소 가수분해물들은 단백질농도와 총 부피를 측정하여 가수분해물의 총 단백질 함량을 측정하였다. 가수분해율 (degree of hydrolysis, DH)은 아래의 주어진 식에 따라, RPI의 총 단백질함량에 대한 가수분해물들의 단백질 함량비로서 DH를 계산하였다.

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

이때의 control은 효소 처리하지 않은 동일조건 반응혼합액의 단백질함량을 의미하였다.

SDS-PAGE

RPI 및 효소 가수분해물의 단백질 분자량 분포는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 측정하였다. 먼저, 1

mL의 효소 가수분해물(10 mg/mL)과 0.25 mL의 SDS-PAGE 시료조제용 완충액(× 5 sample buffer, pH 6.8)을 혼합하고, 100°C에서 3 min 가열하여 전기영동 시료를 조제하였다. 이렇게 준비한 시료(20 µg의 단백질)는 AnyKDa Mini-PROTEAN® TGX™ Precast gel (Bio-Rad Lab., Inc., Hercules, CA, USA)에 주입하고, Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad Lab. Inc.)에 장착한 다음, 일정한 전류(10 mA per gel)를 통하게 하여 전기영동 실시하였다. 전기영동을 끝낸 겔은 0.125% (w/v) coomassie brilliant blue R-250 용액에 15 min 염색을 실시한 다음, 25% methanol 및 10% acetic acid 혼합 용액에서 바탕이 투명해질 때까지 탈색을 실시하였다.

단백질의 분자량 분포는 Precision Plus Protein™ standards (10-250 K; Bio-Rad Lab., Inc.)를 사용하여 확인하였다.

유리 및 방출된 아미노산

RPI 및 효소 가수분해물의 유리된 아미노산분석은 2.5 mL의 각 효소 가수분해물 시료용액에 0.25 mL의 6% (w/v) 5-sulfosalicylic acid dihydrate를 가하여 제 단백질 실시하고, 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 따른 유리 및 방출된 아미노산(free and released amino acid, FRAA)의 분석결과는 100 g의 RPI 단백질 함량에 대한 개별 아미노산의 조성비(%)로 나타내었다. 또한 각 아미노산의 조성비(%)에 가수분해물의 총 아미노산함량 (mg/100 g-RPI)을 곱하면 각 아미노산의 함량을 환산할 수 있도록 하였다.

거품성과 거품안정성

RPI 효소 가수분해물들의 거품성(foaming capacity, FC)과 거품안정성(foam stability, FS)은 Cha et al. (2020)에 따라 측정하였다. 즉, 25 mL의 메스실린더에 10 mL의 효소 가수분해물을 옮겨 담고, 균질기(POLYTRON® PT 1200E; KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland)로 12,500 rpm에서 1분간 균질화 하였다. 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, 효소 처리 하지 않은 control과 상호비교 하였다.

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

$$\text{Foam stability (\%)} = \frac{Ft/Vt}{FT/VT} \times 100$$

이때 VT는 균질 후 총 부피, V₀는 균질 전의 총 부피, FT는 균

질 직후 거품의 부피, Ft와 Vt는 주어진 시간(t = 15, 30, 60 min) 경과 후의 거품부피 및 총 부피를 의미하였다.

유화능과 유화안정성

효소 가수분해물의 유화능(emulsifying activity index, EAI) 과 유화안정성(emulsion stability index, ESI)은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 각 15 mL의 효소 가수분해 물에 5 mL의 식용유(soybean oil; Ottogi Co., Ltd., Seoul, Korea)를 3:1 (v/v)의 비율로 25 mL의 메스실린더에 담고, 균질화(12,500 rpm, 1 min)하여, 균질액이 담긴 메스실린더의 아래 쪽에서 일정량(50 μ L)의 emulsion을 취한 다음, 5 mL의 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액과 혼합하였다. 이 혼합액은 분광광도계(UV-2900; Hitachi Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하여 파장 500 nm에서 균질화한 직후의 흡광도(A_{0min})와 10분경과 후의 흡광도(A_{10min})를 측정하여 아래의 식으로 각각 EAI (m^2/g protein) 및 ESI (min)를 구하였다.

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

이때, A는 파장 500 nm에서의 흡광도, DF는 희석비(100), l은 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_{0min} 에 대한 A_{10min} 의 흡광도의 차이, Δt 는 10 min를 의미하였다.

ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

ABTS⁺ [(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)] 라디칼 소거활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 각 효소 가수분해물(1 mL)에 3 mL의 ABTS⁺ 용액과 혼합하여, 실온의 암소에서 30 min 동안 반응시킨 후, 파장 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼 소거활성(%)은 아래의 식으로 구하였으며, IC₅₀ value (μ g/mL)는 50%의 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 나타내는 가수분해물의 농도로 정의하였다.

$$ABTS^+ \text{ radical scavenging activity (\%)} = \frac{Control_{734} - Sample_{734}}{Control_{734}}$$

이때의 control은 가수분해물 대신 탈 이온수에 대해 측정된 흡광도를 나타내었다.

Tyrosinase 저해활성

각 효소 가수분해물의 tyrosinase 저해활성은 Cha et al.

(2020)의 방법에 따라 측정하였다. 먼저, 300 μ L의 효소 가수분해물, 900 μ L의 mushroom tyrosinase (50 Unit/mL) 그리고 1.5 mL의 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합하여 실온에서 30분간 전 단계 반응을 실시하였다. 이어서 300 μ L of 10 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 용액을 가하여, 파장 475 nm에서 20 min동안 1 min 간격으로 생성되는 dopachrome의 흡광도를 모니터링하면서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성(%)은 아래의 식을 통하여 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory activity (\%)} = \frac{(Control_{475} - Sample_{475})}{Control_{475}} \times 100$$

여기서 control은 효소 가수분해물 대신 탈 이온수 가하여 측정된 흡광도를 의미하였다.

ACE 저해활성

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다.

100 μ L의 시료용액, 50 μ L의 ACE 용액 그리고 50 μ L의 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 혼합한 반응용액은 실온에서 30분간 전 단계 반응을 실시하였다. 여기에 기질로서 50 μ L의 5 mM hippuryl-his-leu (HHL) acetate salt를 함유한 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 가하고 37°C의 항온수조에서 60 min동안 반응을 진행하였다. 이어서 250 μ L of 1 N HCl을 가해 반응을 정지하고, 반응액 중의 유리된 hippuric acid의 추출을 위하여, 1.5 mL의 ethyl acetate를 가한 다음, 원심분리(1,890 g, 10 min, 4°C)하였다. 1.0 mL의 상층액을 시험관에 옮기고 100°C의 heating block에서 ethyl acetate를 완전히 증발시킨 다음, 1 mL의 탈 이온수로 용해시켜, 파장 228 nm (UV-2900; Hitachi Ltd.)에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성(%)은 아래의 식에 따라 구하였다.

ACE inhibitory activity (%)

$$= \left[1 - \frac{(Sample_{228} - Sample Blank_{228})}{(Control_{228} - Control Blank_{228})} \right] \times 100$$

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

RPI에 대한 효소 가수분해물들의 단백질 함량(hydrolysate protein, HP) 및 DH는 Table 1과 같다.

이들 효소의 가수분해는 pH 4.2 (4% RPI분산용액의 pH), 50°C에서 150 min 동안 모두 동일 반응조건에서 실시하여 제조하였다. 먼저, 4% RPI분산용액의 총 단백질 함량(total protein)은 2,536.0 mg/100 mL이었으며, 이에 대해 효소처리 하지 않은 control의 유리된 HP는 123.2 mg/100 mL이었다.

Serine protease 가수분해물인 TR과 CH의 DH는 각각 1.3과 0.7%로서 효소 가수분해물 중에서 가장 낮은 수준의 DH를 나타내었다. 이는 상대적으로 낮은 효소/기질비에 기인하였으며, 아울러 이들 효소의 기질 특이성이 한정된 것과 효소반응액(pH 4.2부근)이 효소의 최적 pH (pH 8 부근)보다 산성측에서 이루어짐에 따른 결과를 반영한 것으로 판단되었다. 또한 OFR로부터 회수한 RPIs의 아미노산 조성(Kang et al., 2023a) 중에서 Lys (7.1–7.8%) 및 Arg (6.2–7.3%)의 아미노산 조성비가 Tyr (2.5–3.3%) 및 Phe (4.7–5.2%)에 비해 높아, TR의 기질 특이성(Lys 및 Arg의 C-말단 절단)에 따른 가수분해가 CH (Phe, Trp 및 Tyr의 C-말단 절단)보다 더 잘 일어날 것으로 예상됨으로써, 기질 특이성이 반영된 결과라고 판단되었다.

Cysteine proteases 가수분해물인 PA와 BR은 각각 3.4와 4.5%의 DH를 나타내었으며, food-grade proteases인 PN (14.3%)이 RPI 가수분해물 중에서 가장 높은 DH를 나타내었고, 그 다음으로 FL (6.7%) AA (6.5%), PR (5.1%) 순이었으며,

그 외 food-grade proteases 가수분해물의 DH는 4.4–4.6% 범위였다. Food-grade proteases의 DH가 serine 및 cysteine protease에 비해 상대적으로 높은 것은 효소반응액 중의 효소/기질비가 5배 높은 것(Table 1)과 이들의 기질 특이성이 광범위한 것에 기인하였다.

특히 serine protease에 의한 가수분해물의 제조는 analytical-grade의 정제 효소(TR 및 CH)를 사용하여 효소/기질비(Table 1)를 상대적으로 낮게 설정함으로써 이들 가수분해물의 DH가 낮은 원인이 되었다. 아울러 이 연구에서는 각 효소의 측면에서 최적의 반응조건을 반영하여, 각기 다른 효소 반응조건에서 가수분해물을 제조한 것이 아니라, 기질인 넙치 알 분리단백질(산업적 이용 대상)의 측면에서 기질이 기본적으로 가지고 있는 pH (pH 조정에 따른 가공조건을 최소화), 가공온도(에너지의 사용을 최소화) 및 반응시간 등을 고려하여 같은 반응조건에서 효소의 기질 특이성을 바탕으로 한 가수분해물을 제조하고자 하였기에 전반적으로 낮은 DH를 나타낸 것으로 판단되었다.

한편 이 연구의 동물(TR 및 CH) 또는 식물기원의 효소(PA 및 BR)와 달리, 미생물기원의 효소(food-grade proteases)는 다양한 기질 특이성, 광범위한 pH 및 온도 안정성을 포함한 여러 장점이 있어, 산업적으로 널리 이용하고 있다(Diniz and Martin, 1997). Chalamaiyah et al. (2010)은 mrigal (*Cirrhinus mrigala*) egg의 AL 가수분해물이 PA에 비해 월등히 높은 DH를 나타내었으며, AL는 소수성 아미노산 잔기에 대해 우선적으로 가수분해하는 기질 특이성을 나타낸다고 보고하였다(Klompong et al. 2007). 또한 sardinella (*Sardinella aurita*) 가공부산물에 대한 AL과 CH 가수분해물의 DH는 각각 8%와 6.5% (Bougatef

Table 1. Degree of hydrolysis of various enzymatic hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe protein isolate by isoelectric solubilization/precipitation

Commercial proteases	Enzyme/ Substrate ratio	Roe protein isolate (pH 12/4.5)			
		Total protein (mg/100 mL)	Hydrolysate protein (mg/100 mL)	Degree of hydrolysis (%)	End pH
Control	-	2,536.0	123.2±2.1 ⁱ	0.0	4.2
Trypsin (TR)	1/125	-	155.3±4.8 ^g	1.3±0.0 ^g	3.8
Chymotrypsin (CH)	1/125	-	140.8±6.0 ^h	0.7±0.0 ^h	3.8
Papain (PA)	1/25	-	207.4±2.4 ^f	3.4±0.0 ^f	3.8
Bromelain (BR)	1/25	-	237.4±2.1 ^e	4.5±0.0 ^e	3.8
Alcalase (AL)	1/25	-	240.4±5.2 ^e	4.6±0.1 ^e	4.0
Neutrase (NE)	1/25	-	237.0±5.4 ^e	4.4±0.1 ^e	4.0
Flavourzyme (FL)	1/25	-	297.0±5.8 ^o	6.7±0.1 ^b	4.1
Protamex (PR)	1/25	-	252.8±5.9 ^d	5.1±0.1 ^d	4.1
Aroase AP-10 (AA)	1/25	-	289.1±4.9 ^c	6.5±0.1 ^c	4.1
Pantidase NP-2 (PN)	1/25	-	486.4±3.4 ^a	14.3±0.1 ^a	4.1

Degree of hydrolysis (%) = (Each enzyme hydrolysate protein-Control hydrolysate protein)/Total protein×100. Control was the supernatant of 4% (w/v) roe protein isolate 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.

et al., 2010)이었으며, Fang et al. (2012)은 flying squid의 AL, PA 및 TR DH는 13–17%범위, 그리고 10% 이하의 DH를 보인 가수분해물은 pepsin과 FL이라고 하여 이 연구의 결과와 유사한 DH를 보였다. Ovissipour et al. (2013)은 anchovy sprat의 AL, FL, PR, PA, BR 그리고 Promo 가수분해물들의 DH는 30.5–55.8% 범위, 그리고 Liu et al. (2015) 가다랑어 육에 대한 AL, FL, NE, PR, 및 TR 가수분해물은 기질 특이성에 따라 2.43–78.33% 범위의 다양한 DH를 나타낸다고 하였다.

이상의 결과와 연구보고를 통해, 효소에 따른 DH는 사용한 효소의 종류, 효소/기질비, 기질 단백질(대상 시료), 반응조건 그리고 기질 특이성에 따라 다양하였으며, 이에 따른 DH의 차이는 기질 단백질(대상시료)와 이들의 아미노산 조성에 의해 결정된다고 하였다(Sathivel et al., 2003; Chalamaiah et al., 2010).

RPI 가수분해물의 단백질 분자량 분포

등전점 용해/침전(ISP, pH 12/4.5) 공정을 통해 OFR로부터 회수한 분리단백질인 RPI의 시판 proteases 가수분해물들의 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의한 단백질분포(2–250 kDa)는 Fig. 1에 나타내었다.

OFR로부터 회수한 RPI의 단백질 밴드들의 분포는 150–75 kDa에서 2개, 50–75 kDa에서 2개, 37–50 kDa에서 1개, 20–37 kDa에서 2개 그리고 10–20 kDa에서 2개의 명확한 단백질 밴드가 관찰되었다. 이들 밴드 중에서 약 97K부근의 단백질 밴드는 vitellin like protein으로 추정되었으며(DeMan, 1999; Park et al., 2016), 37–50 kDa, 25 kDa 부근 및 10–15 kDa 범위의 단백질 밴드는 actin, troponin-T 및 myosin light chain로 추정되었다. RPI의 단백질 밴드들은 OFR의 진공 동결건조 농축분말인 FDC의 그것들과 유사한 분포를 나타내었으며, 보다 진하게 관찰되었다(Kang et al., 2023a). 또한 ISP 공정에서 분리단백질을 회수한 다음, 발생한 가공처리수(isolate processed water)에서 관찰된 단백질 분포는 50–75 및 37–50 kDa에서 각각 1개의 희미한 밴드이었으며, 15 kDa부근에서 1개 그리고 5–10 kDa에서 1개의 명확한 단백질 밴드가 확인되었다. 효소처리하지 않은 control에는 10–15 kDa 분자량 범위의 단백질 분포만이 확인되었다.

RPI로부터 10종 시판 proteases에 의한, 효소 가수분해물들의 단백질 분포는 RPI의 고분자량 단백질이 효소의 가수분해로 인해 저분자량의 펩타이드로 전환된 것으로 확인되었다(Fig. 1). serine protease 가수분해물들(TR 및 CH)은 일부 기질 특이성에 따른 차이가 관찰되었으며, TR의 경우, 25 kDa과 20 kDa 부근의 단백질 밴드가 관찰된 반면에, CH의 단백질 밴드는 27 kDa 및 10–5 kDa 부근에서 단백질 분포가 확인되었다. cysteine protease 가수분해물들(PA와 BR)의 단백질 밴드는 거의 유사하였으나, PA의 경우, 50 kDa, 25 kDa 부근의 밴드가 그리고 15–5 kDa에서 단백질분포가 확인된 반면에, BR은 50 kDa 밴

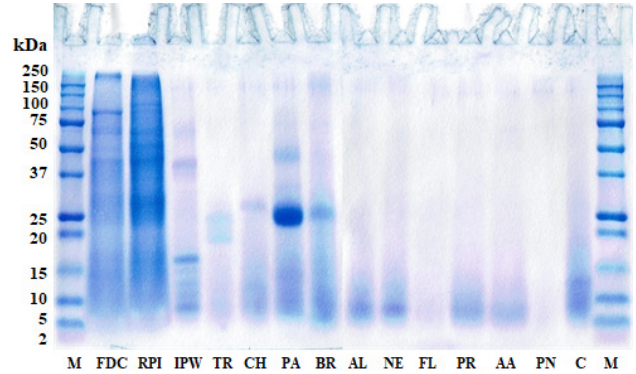


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of various enzymatic hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe protein isolate by isoelectric solubilization/precipitation. M, Protein maker; FDC, Freeze-dried concentrate; RPI, Roe protein isolate; IPW, Isolated process water; TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2; C, Control.

드는 관찰되지 않았으며, 25 kDa 부근의 밴드는 희미하게 나타나, 이들 단백질 밴드는 BR이 보다 잘 분해한다는 것이 확인되어 DH의 결과와 일치하는 경향이였다(Table 1).

Food-grade proteases의 경우, 모든 효소 가수분해물들이 5–10 kDa 저분자량 peptides의 분포만이 관찰되어 기질특이성에 따른 차이가 거의 없으며, 이들 효소의 상대적으로 높은 DH와 일치하는 결과이었다(Table 1). 더욱이 FL과 PN은 전기영동 상에 어떠한 단백질 밴드의 흔적도 관찰되지 않았다.

rohu *Labeo rohita* roe의 pepsin 및 TR 가수분해물은 주로 10 kDa 이하의 저 분자량 peptide만이 관찰될 뿐이며, 기질 특이성에 따른 차이가 거의 없으며(Chalamaiah et al., 2013b), mrigal *Cirrhinus mrigala* egg 가수분해물(Chalamaiah et al., 2010) 그리고 가자미(sole) 및 오징어의 젤라틴 가수분해물(Gimenez et al., 2009)은 단백질 분자량분포가 유사하다고 하여, 단백질의 기원과 사용한 효소에 따른 가수분해물의 전기영동 패턴에는 거의 차이가 없어, 이는 효소의 기질 특이성에 따른 단백질분해가 진행된다고 하더라도 사용한 전기영동 겔의 분자량 한계 이하로 저분자화 되어 전기영동 상에서 관찰되지 않은 것 때문이었다(Gilmartin and Jervis, 2002).

이상의 결과와 보고를 통해서, 효소의 기질 특이성에 따른, RPI 가수분해물들의 단백질 분자량분포의 차이는 한정된 기질 특이성과 상대적으로 낮은 DH를 나타낸 serine 및 cysteine proteases 가수분해물들이 기질 특이성이 상대적으로 광범위하고 DH가 높은 미생물기원의 food-grade proteases 가수분해물들과는 전기영동 상에서도 단백질 분자량분포의 차이가 확인되었다(Gilmartin and Jervis, 2002).

RPI로부터 유리 및 방출된 아미노산 조성

RPI에 대해, 10종의 시판 proteases를 이용하여 제조한 가수분해물들과 효소처리 하지 않은 control의 유리 및 효소에 의해 방출된 아미노산(free and released amino acid, FRAA)의 조성은 Table 2에 나타내었다. 이 표에 나타낸 결과(g/100 g protein)는 control에 대해 효소에 의한 각 아미노산 조성의 순증가율을 알아보기 위해 각 아미노산의 백분율(%)로 나타내었고, 효소 가수분해물의 단백질 함량(hydrolysate protein, HP)를 제시함으로써 각 아미노산의 조성비(%)를 곱하면, 각 아미노산 함량도 환산할 수 있도록 하였다.

먼저, HP (mg/100 g-RPI)는 PN이 12,159.0 mg/100 g-RPI으로 가장 높았으며, control (3,079.6 mg/100 g-RPI)에 비하

여 가수분해로 인해 약 4배가량 증가하였다. Serine proteases 가수분해물의 HP는 TR이 3,883.1 mg/100 g RPI 그리고 CH가 3,518.8 mg/100 g RPI이었고, cysteine proteases인 PA와 BR은 각각 5,184.8 그리고 5,933.8 mg/100 g-RPI이었다. 또한 PN을 제외한 food-grade proteases가수분해물들의 경우, 이들의 HP는 5,926.2-7,425.7 mg/100 g 범위였다. 따라서 효소에 의한 단백질 가수분해로 인해, 모든 효소 가수분해물의 HP 및 FRAA는 control에 비해 증가하였다.

한편, 효소 처리하지 않은 control의 FRAA (mg/100 g-RPI)는 404.4 mg/100 g RPI이었으며, 효소의 가수분해로 인해 가장 많은 FRAA 함량을 나타낸 가수분해물은 PN (2,931.2 mg/100 g-RPI)이었고, 그 다음으로 FL (2,725.6 mg/100 g-RPI)으로, 다른 효소 가수분해물(437.3-812.8 mg/100 g-RPI)과는 현저

Table 2. Free and released amino acid composition (g/100 g protein, %) of various enzymatic hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe protein isolate by isoelectric solubilization/precipitation

Amino acids	RPI ²	Control	TR	CH	PA	BR	AL	NE	FL	PR	AA	PN
1 Thr	5.2	3.2	3.1	3.0	3.1	3.0	2.2	3.6	4.6	3.7	3.8	2.3
2 Val ¹	6.7	7.2	8.5	7.9	6.8	8.2	10.1	7.9	7.7	7.4	7.8	7.3
3 Met ¹	2.7	-	-	-	0.2	0.5	0.8	1.0	0.3	1.5	1.8	2.0
4 ILe ¹	5.8	4.3	4.9	4.8	3.8	4.1	4.2	4.5	4.6	3.8	4.2	3.5
5 Leu ¹	10.0	7.9	9.1	8.6	7.5	7.7	8.0	8.1	10.9	7.5	7.3	10.0
6 Phe ¹	5.2	6.5	9.0	8.5	7.0	8.9	12.9	11.5	7.2	15.4	15.3	15.0
7 His	2.6	2.9	3.5	3.1	2.9	2.6	4.9	2.3	3.5	4.1	4.5	4.3
8 Lys	7.1	11.9	13.7	13.0	10.2	13.0	12.5	11.0	10.2	9.8	8.7	12.8
9 Arg	6.4	8.3	9.8	9.0	6.5	9.2	7.8	6.7	7.7	5.2	5.8	9.8
EAA (%)	51.6	52.1	61.7	58.0	48.0	57.3	63.3	56.5	56.8	58.4	59.1	67.0
1 Asp	9.6	4.7	4.5	4.5	4.1	4.3	4.2	4.3	6.0	5.6	5.6	5.1
2 Ser	5.5	12.8	9.1	8.7	14.6	7.9	12.3	11.8	9.9	8.8	7.9	8.4
3 Glu	12.7	13.3	3.8	8.1	7.5	12.6	6.6	10.5	8.1	8.9	8.7	8.4
4 Pro ¹	4.9	-	-	-	-	-	-	-	4.7	3.4	3.3	-
5 Gly ¹	4.5	3.5	4.3	3.8	11.6	3.5	1.7	3.0	2.8	3.3	3.2	1.6
6 Ala ¹	6.6	8.8	12.0	11.6	10.1	10.5	5.6	8.5	6.3	6.4	6.4	5.4
7 Cys	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 Tyr	3.3	4.8	4.5	5.4	4.1	3.9	6.3	5.4	5.4	5.0	5.9	4.2
NEAA (%)	48.4	47.9	38.3	42.0	52.0	42.7	36.7	43.5	43.2	41.6	40.9	33.0
EAA/NEAA	1.07	1.09	1.61	1.38	0.92	1.34	1.73	1.30	1.32	1.41	1.44	2.03
FRAA (mg/100 g-RPI)		404.4	478.2	437.3	585.6	457.4	487.1	631.5	2,725.6	720.0	812.8	2,931.2
HP (mg/100 g-RPI)		3,079.6	3,883.1	3,518.8	5,184.8	5,933.8	6,009.3	5,926.2	7,425.7	6,320.0	7,228.5	12,159.0
FRAA/HP (%)		13.1	12.3	12.4	11.3	7.7	8.1	10.7	36.7	11.4	11.2	24.1
HAA (%)	46.4	38.2	47.9	45.2	47.0	43.5	43.3	44.4	44.5	48.8	49.2	44.8

¹Hydrophobic amino acid (HAA). ²Quoted from Kang et al. (2023a). 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 nonessential amino acids; FRAA, Total free and released amino acid; HP, Hydrolysate protein content; HAA, Total hydrophobic amino acid; -, Not detected under this analytical condition. Control was the supernatant of 4% (w/v) roe protein isolate dispersion under the same reaction conditions without the enzyme treatment.

히 많은 함량이었다. Serine proteases로서 TR과 CH의 FRAA는 각각 478.2 및 437.3 mg/100 g-RPI이었으며, cysteine proteases인 PA 및 BR은 각각 585.6 및 457.4 mg/100 g-RPI이었다.

또한 food-grade proteases인 AL, NE, PR 및 AA는 487.1–812.8 mg/100 g 범위의 FRAA 함량을 나타내었다. 이 연구의 RPI에 대한 모든 효소 가수분해물들의 주요 아미노산은 필수 아미노산으로서 Val (6.8–10.1%), Leu (7.3–10.9%), Lys (8.7–13.7%), 그리고 Arg (5.2–9.8%) 이었으며, 비 필수 아미노산으로서 Ser (7.9–14.6%), Glu (3.8–12.6%) 및 Ala (5.4–12.0%)으로, 효소의 기질 특이성이 반영된 아미노산의 조성비에서는 차이를 보일 뿐만 아니라 이들의 아미노산함량에 있어서도 전체적으로 증가하였다.

총 비필수 아미노산조성에 대한 필수 아미노산조성비(EAA/NEAA)는 PN이 2.03으로 RPI의 단백질 가수분해를 통해 필수 아미노산의 상대적인 가장 많이 증가하였으며, 그 다음으로 AL (1.73)이었다. control (1.09)보다 증가한 효소 가수분해물은 PA (0.92)를 제외한 모든 효소 가수분해물들(1.30–1.61)이었다. 특히 PA는 비필수 아미노산인 Ser (14.6%)의 두드러진 증가에 의한 영향이었다.

가수분해물의 맛, 용해도, 거품 및 유화 형성에 영향을 주는 소수성 아미노산조성의 변화는 모든 효소 가수분해물이 효소처리하지 않은 control (38.2%)에 비하여 43.3–49.2% 범위로 증가하였으며, 이들 중에는 AA 가수분해물의 소수성 아미노산 조성이 가장 많이 증가하였다.

TR의 아미노산조성에 있어서, control에 비해 필수아미노산들은 Val, Ile, Leu, Phe, His, Lys, Arg이 순 증가하였고, 비필수 아미노산은 Gly과 Ala만이 순증가율을 나타내었다. 이는 TR의 기질특이성과 관련하여 엽기성 아미노산인 Lys 및 Arg의 C-말단 주위에 Thr과 Met를 제외한 필수아미노산들과 Gly 및 Ala이 분포한다는 것을 반영하고 있다.

CH의 경우, TR과 마찬가지로 DH는 낮았으나(Table 1), control에 비해 Val, Ile, Leu, Phe, His, Lys, Arg, Gly, Ala 그리고 Tyr 아미노산들의 순증가율을 보였다. 이는 CH의 기질특이성과 관련하여 방향족 아미노산인 Tyr, Phe 및 Trp의 C-말단에 이들 아미노산들이 상대적으로 많이 분포하고 있다는 것을 시사하고 있다. TR 및 CH는 serine proteases로서 그 기질특이성이 각각 엽기성 및 방향족 아미노산들에 한정되어 있어, 전반적으로 DH가 낮을 뿐만 아니라, 유리되는 아미노산 함량도 상대적으로 낮았다.

PA의 경우, 순증가율을 나타낸 아미노산들은 Phe, Ser, Gly 및 Ala이었으며, BR은 Val, Phe, Lys, Arg 및 Ala이었다. 식물기원의 cysteine protease인 PA 및 BR은 Phe 및 Arg와 소수성 아미노산들의 잔기의 C-말단의 아미노산을 절단하는 비교적 넓은 기질특이성을 가지고 있다. 따라서 순증가율을 보인 이들 아미노산들이 절단부위의 주변에 분포하고 있다는 것을 반영한 것이라고 추정되었다. 또한 이 연구에서, BR이 PA보다 기질특이

성이 상대적으로 광범위한 것으로 확인되었다.

미생물기원의 food-grade protease 가수분해물들의 공통적인 특성은 Val, Leu, Phe, His, Asp 그리고 Tyr 아미노산 잔기의 증가가 두드러졌으나, 가수분해물의 FRAA에는 차이가 있어 각 효소의 기질특이성이 다르다는 것이 확인되었다. 또한 serine 및 cysteine proteases 가수분해물에 비해 현저하게 넓은 기질특이성을 나타내었다.

전반적으로 RPI에 대한 효소 가수분해물들의 FRAA/HP의 비(%)에 있어서, FL (36.7%)과 PN (24.1%)을 제외한 효소 가수분해물들은 7.7–12.4%의 범위로서 control (13.1%)보다 낮은 수준을 나타내어, 이는 RPI로부터 효소 가수분해에 의해 가용성의 oligopeptide 또는 polypeptide 함량은 증가하는 반면에, 저분자량의 amino acids 또는 dipeptide로의 전환이 상대적으로 낮은 것을 시사하고 있다.

또한 가수분해물들의 아미노산 조성은 잠재적으로 항산화 활성에 영향을 끼칠 수 있으며(Klompong et al., 2007), Tyr, His 및 Phe를 포함한 방향족 아미노산, Val, Ala, Pro 및 Leu과 같은 소수성 아미노산, 그리고 Met은 free 라디칼을 제거할 수 있는 것으로 보고된 바 있으며(Rajakakse et al., 2005; Sarmadi and Ismail, 2010), 많은 연구들에서 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). RPI의 방향족 및 소수성 아미노산의 조성비(Kang et al., 2023a)가 46.4%인 것을 감안한다면, 이들 효소 가수분해물의 경우(Table 2)도 유사한 아미노산 조성(43.3–49.2%)을 나타내어, 천연의 생리활성 peptide 소재의 이용가능성이 높을 것으로 판단되었다. 따라서, 기질특이성에 따른 효소 가수분해물의 아미노산 조성의 차이가 식품 기능성, 항산화성, 생리활성 등에 다양한 영향을 미칠 것으로 예상되었다.

거품성 및 거품안정성

OFR로부터 제조한 ISP 공정을 통해 회수한 분리 단백질인 RPI에 대한 시판 proteases 가수분해물의 FC와 FA, EAI 그리고 ESI에 결과는 Table 3에 나타내었다.

먼저, 효소 처리하지 않은 control의 FC는 116.4%이었으며, 이때의 FS는 관찰되지 않았다. Serine protease인 TR의 FC는 176.7%이었으며, FS는 거품 형성 직후, 서서히 감소하여 15분까지 17.5% 그리고 60분에 이르러서는 5.7%의 거품이 유지되었다. 반면에 CH는 FC 및 FS는 관찰되지 않았다. cysteine protease인 PA 가수분해물의 경우, FC는 193.4%로 가장 강한 거품성을 나타내었으며, FS에 있어서도 60분까지 54.6%의 거품이 유지되어 FC 및 FS에 있어서 RPI 효소 가수분해물 중에서 가장 우수하였다. 또한 BR 가수분해물의 경우도 FC (144.2%)와 FS (60 min, 23.2%)가 비교적 우수하였다. 그러나 food-grade proteases 가수분해물의 경우, NE 가수분해물만이 123.9%의 FC가

확인되었을 뿐이었으며, 이를 제외한 가수분해물에서는 모두 FC 및 FS는 확인되지 않았다.

어류 알의 거품 형성능에 관한 연구보고를 통해, 황다랑어 (Yoon et al., 2019), 가다랑어(Cha et al., 2020) 그리고 넙치 (Kang et al., 2024a) 알 분리단백질의 거품 형성능은 115–147% 범위, 알칼리 불용성의 콜라겐 유사 단백질획분(Yoon et al., 2018c)은 121–160%범위를 나타내었다. 또한 ISP 중에 발생하는 가공처리수(Lee et al., 2017)는 107–194%이라고 보고 하였으며, 이때의 양성대조군인 egg white 127% (Park et al., 2016), hemoglobin 120.9% 및 casein 109.4%이었다(Yoon et al., 2018a). 따라서 효소를 활용한 가수분해물의 거품 형성능은 효소처리 하지 않은 control에 대해 기질특이성에 따라 일부 효소에 대해서만 개선 효과가 나타남을 알 수 있었다.

Pacheco-Aguilar et al. (2008)은 Pacific whiting *Merluccius productus* 육으로부터 제조한 AL, TR 및 pepsin가수분해물은 pH 4, 7 및 10에서의 DH 및 용해도에 따라 각기 FC가 다르게 관찰된다고 하였으며, 이는 가수분해물 중의 peptide들이 효소들의 기질특이성에 따른 peptide의 조성, 크기, 순 전하(net charge) 변화로 인한 차이에 기인하기 때문이었다. 또한 DH가 높은 어류 단백질 가수분해물의 FC가 낮은 것은 과도한 가수분해로 친수성 peptide의 증가와 작은 크기의 peptide로 인해 기포 주위에 안정한 막의 생성을 방해하기 때문이며, 가수분해 정도 및 pH의 증가에 따라 거품 형성능은 감소하는 경향을 나타낸다고 하였다(Souissi et al., 2007). 한편 Charmaiah et al. (2015)은 잉어 알 단백질 가수분해물이 상대적으로 더 많은 소수성 peptide를 함유하고 있어, 공기-물 계면(air-water interface)에

빠르게 흡착되어 FC가 개선된다고 보고하였다. Naqash and Nazeer (2013)은 pink perch 육에 대한 TR 가수분해물이 다른 효소 가수분해물 보다 우수한 거품 형성능을 나타내어, 사용 효소에 따른 DH과 peptide의 하전 및 크기로 인해 FC 및 FS에 영향을 미친다고 하였다. 또한 Souissi et al. (2007)은 sardinella *Sardinella aurita* 가수분해물은 pH 증가와 더불어 FC는 감소한다고 하여, pH 변화에 따른 순 전하의 변화에 기인한다고 하였다. 따라서 효소에 의한 단백질 가수분해는 peptide의 크기가 작으면 작을수록 안정한 거품을 유지하는데 요구되는 표면장력을 갖지 못하기 때문에 거품 안정성을 감소시키게 되고, 따라서 과도한 가수분해로 생긴 저분자의 peptide는 계면활성이 낮아져 FC 및 FS의 감소로 이어지게 된다(Mutilangi et al., 1996).

이 연구의 효소 가수분해물은 효소 처리하지 않은 control에 대해, TR, PA 및 BR이 FC와 거품 안정성이 우수한 것으로 나타났다으나, food-grade proteases가수분해물은 상대적으로 높은 DH (Table 1)로 인해 FC 및 FS가 인정되지 않았다.

유화능 및 유화안정성

한편, OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 분리 단백질인 RPI에 대한 시판 proteases 가수분해물의 EAI와 ESI에 대한 결과 (Table 3)는 효소처리 하지 않은 control의 EAI는 8.6 m²/g protein으로 이것의 ESI는 42.8 min이었다. 효소 가수분해물 중에서 serine protease인 TR과 CH의 EAI는 각각 9.6 및 13.6 m²/g protein으로 이때의 ESI는 25.2 및 33.9 min이었다. cysteine proteases인 PA와 BR의 EAI는 각각 30.6 및 30.9 m²/g protein로서 가장 높은 EAI를 나타내었으나, 이들의 ESI는 12 min으로 가장 낮은 수준이었다. 한편 food-grade proteases 가수분해

Table 3. Foaming capacity (FC), foam stability (FS), emulsifying activity index (EAI), and emulsion stability index (ESI) of various enzymatic hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe protein isolate by isoelectric solubilization/precipitation

Commercial proteases	FC (%)	FS (%)			EAI (m ² /g)	ESI (min)
		15 min	30 min	60 min		
Control	116.4±1.8 ^e	-	-	-	8.6±1.5 ^d	42.8±10.6
TR	176.7±0.0 ^b	17.5±0.1 ^d	9.3±0.1 ^d	5.7±0.2 ^d	9.5±0.4 ^c	25.2±1.5
CH	100.0±0.0 ^f	-	-	-	13.6±1.3 ^b	33.9±2.1
PA	193.4±5.9 ^a	74.0±1.0 ^a	61.6±0.5 ^a	54.6±0.2 ^a	30.6±0.6 ^a	12.0±0.3
BR	144.2±1.9 ^c	69.3±0.8 ^b	58.3±2.0 ^b	23.2±0.7 ^b	30.9±0.3 ^a	12.0±0.2
AL	100.0±0.0 ^f	-	-	-	4.8±0.2 ^e	19.8±1.4
NE	123.9±1.1 ^d	-	-	-	8.0±0.7 ^d	26.8±2.5
FL	100.0±0.0 ^f	-	-	-	4.3±0.6 ^{ef}	27.0±0.8
PR	100.0±0.0 ^f	-	-	-	2.9±0.1 ^{gh}	16.2±1.7
AA	100.0±0.0 ^f	-	-	-	2.8±0.1 ^{fg}	20.5±0.5
PN	100.0±0.0 ^f	-	-	-	2.0±0.2 ^g	16.7±0.7

TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2; -, Not detected. Control was the supernatant of 4% (w/v) roe protein isolate dispersion under the same reaction conditions without the enzyme. Values represent the mean±SD of n=3. Means with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

물 중에서는 NE (8.0 m²/g protein), AL (4.8 m²/g protein) 그리고 FL (4.3 m²/g protein)이었으며, 이들의 ESI는 19.8–27.0 min 수준이었다. 따라서 cysteine 및 serine proteases의 가수분해물이 control 및 food-grade proteases 가수분해물보다 유의적으로 우수한 유화 형성능을 나타내었다(P<0.05).

Kang et al. (2024b)은 넙치 알의 증자-건조처리 농축분말로부터 제조한 serine 및 cysteine proteases 가수분해물의 EAI (9.0–34.3 m²/g protein)가 food-grade proteases (1.4–5.3 m²/g protein)에 비해 유의적으로 우수한 EAI를 나타내어, 이 연구의 RPI에 대한 효소 가수분해물들에 대한 기질특이성정도 유사하였다. 또한 이 연구의 넙치 알 분리단백질에 대한 효소의 DH (Table 2)는 넙치 알 증자-건조처리 농축분말의 다양한 효소 가수분해물의 DH (Kang et al., 2024b)에 비해 낮음에도 불구하고 상대적으로 유화 형성능이 우수한 것으로 나타나, 유화 형성능은 DH와 역상관계인 것으로 확인되었다.

잉어알의 pepsin, TR 및 AL 가수분해물(Chalamaiah et al., 2015)은 이들 효소 기질특이성이 반영되어 서로 다른 아미노산 조성을 나타냄으로써, 이러한 아미노산과 peptide 조성의 차이가 가수분해물 내의 순 전하의 차이를 유도하여 EAI와 ESI에도 차이를 가져올 수 있다고 하였다. 또한 DH가 높은 효소 가수분해물은 EAI가 현저히 감소하거나 상실될 수 있으며(Kristinsson and Rasco, 2000; Gbogouri et al., 2004), 어류 알 단백질 가수분해물의 낮은 유화성은 효소의 작용으로 단백질의 4차 구조(Sathivel et al., 2003)와 입체(steric)효과의 상실에 기인한다고도 하였다(Klompong et al., 2007). 이러한 유화 형성능은 DH와 peptide 농도에 따라 다양하게 측정되고, 알 단백질 가수분해물의 농도, 아미노산 조성 및 사슬 길이에 따라 계면에서 ESI에 차이를 나타내는 요인이라고 하였다(Intarasirisawat et al., 2012).

이상의 결과와 연구보고로부터 단백질 기원, 회수-가공처리 방법 및 조건에 따라 식품 기능성으로서 다양한 거품 및 유화 형성능을 나타내었으며, 특히 효소 가수분해물의 경우, DH가 높을수록 거품 및 유화 형성능 공통적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 식품 기능성을 고려한 효소 가수분해물의 제조에 있어서는 가수분해가 과도하게 일어나지 않도록 가수분해 최적조건의 설정에 유의해야 할 것으로 판단되었다. 이 연구에서 RPI 효소 가수분해물의 식품기능성은 DH가 낮은 TR, PA 및 BR이 우수하였다.

항산화 및 항고혈압 활성

RPI에 대한 시판 proteases 가수분해물의 항산화 및 항고혈압 활성은 Table 4에 나타내었다.

ABTS⁺ 라디칼 소거활성

RPI 효소 가수분해물의 ABTS⁺ 라디칼 소거활성(IC₅₀, µg/mL)은 효소 처리하지 않은 control (127.7 µg/mL)이었으며, 효소 가수분해물 중에서는 우수한 소거활성을 보인 효소 가

수분해물은 food-grade proteases인 PR (108.0 µg/mL)과 AA (115.5 µg/mL)로서, 가수분해로 인한 항산화 활성의 개선 효과가 인정되었다. 그러나 그 이외의 가수분해물들(122.2–210.9 µg/mL)에서는 control에 비해 유사하거나 낮은 소거활성을 나타내어 가수분해로 인한 항산화 개선 효과가 거의 없었다. Serine 및 cysteine protease 가수분해물은 소거활성이 128.7–210.9 µg/mL 범위였고, PA가 가장 낮은 수준이었다.

한편, 황다랑어(82 µg/mL; Yoon et al., 2019) 및 가다랑어 알 분리단백질(103 µg/mL; Cha et al., 2020), 새우가공부산물 효소 가수분해물(160–170 µg/mL; Kim et al., 2016), 어류 알의 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 어류 알 분리단백질이나 새우 효소 가수분해물에 비하여는 이 연구의 RPI 가수분해물이 우수한 반면에, 물 추출물 및 가공처리수에 비하여는 유사하거나 다소 낮은 소거활성을 나타내었다.

넙치 알 농축분말의 다양한 효소 가수분해물들(69–99 µg/mL; Kang et al., 2024b)은 효소처리 하지 않은 control (60 µg/mL)에 비해 낮은 소거활성을 보였으며, 효소 가수분해물 중에서는 FL 및 PN 가수분해물이 우수한 소거활성을 나타낸다

Table 4. Anti-oxidative and anti-hypertensive activities of various enzymatic hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe protein isolate by isoelectric solubilization/precipitation

Commercial proteases	ABTS ⁺ , IC ₅₀ (µg/mL)	Tyrosinase inhibitory activity (%)	ACE inhibitory activity (%)
Control	127.2±1.2 ^{de}	29.3±1.4 ^c	38.0±2.0 ^e
TR	146.7±0.6 ^f	25.6±1.5 ^d	67.6±4.5 ^{bc}
CH	128.7±0.9 ^e	25.1±1.5 ^d	52.0±3.3 ^d
PA	210.9±1.1 ^h	28.4±1.4 ^c	63.7±8.8 ^c
BR	184.6±1.6 ^g	24.2±1.5 ^d	67.1±8.2 ^{bc}
AL	122.1±0.8 ^c	24.2±1.5 ^d	67.3±4.9 ^{bc}
NE	123.7±0.7 ^c	25.1±1.5 ^d	64.4±6.9 ^c
FL	125.5±0.8 ^d	33.0±1.3 ^b	79.6±2.6 ^a
PR	108.0±0.9 ^a	33.0±1.3 ^b	78.7±1.0 ^a
AA	115.5±0.9 ^b	38.1±1.2 ^a	74.8±4.0 ^{ab}
PN	183.5±1.5 ^g	24.6±1.5 ^d	83.3±2.2 ^a

IC₅₀, The half maximal inhibitory concentration; TR, Trypsin; CH, Chymotrypsin; PA, Papain; BR, Bromelain; AL, Alcalase; NE, Neutrase; FL, Flavourzyme; PR, Protamax; AA, Aroase AP-10; PN, Pantidase NP-2. Control was the supernatant of 4% (w/v) roe protein isolate dispersion under the same reaction conditions without the enzyme. Values represent the mean±SD of n=3. Means with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

고 하였다. Choonpicharn et al. (2015)의 틸라피아 껍질에 대한 효소 가수분해물은 FL 및 TR 가수분해물에서 가장 우수하였지만 PA와 NE는 상대적으로 소거활성이 낮았다고 보고하였다. Alemán et al. (2011)은 오징어와 참치 껍질에 대한 가수분해물의 항산화 활성은 AL, collagenase, TR 및 pepsin의 경우 ABTS⁺ 소거 활성이 감소하는 경향이라고 하였으며, Ovisipour et al. (2013)은 AL을 사용한 멸치 sprat 단백질 가수분해물이 ABTS⁺ 소거활성이 가장 높았고, FL은 모든 가수분해물 중에서 가장 낮은 활성을 나타낸다고 하였다. 이 연구결과와 보고에 따르면 사용하는 다양한 효소와 기질의 단백질 기원에 따라 효소의 기질 특이성이 반영되어 각기 다른 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 나타내었으나, 효소에 의한 가수분해가 모두 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 개선하는 것만 아니었다. Giménez et al. (2009)은 ABTS⁺ 라디칼 소거활성에 기초하여, 가장 강한 소거능을 보이는 아미노산은 Cys이며, 그 다음으로 Trp, Tyr 및 His이라고 하여, 이들 아미노산을 함유하는 peptide는 더 강한 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 나타내며, ABTS⁺ 라디칼을 소거하는 가수분해물의 능력은 효소의 종류, DH, 용해도, peptides 종류 및 효소에 의해 유리 또는 방출되는 아미노산 조성과 같은 여러 요인에 따라 달라진다고 하여(Bougatef et al., 2010; Chalamaiyah et al., 2013b), 이러한 차이가 가수분해물의 항산화능에 영향을 준다고 판단되었다.

Tyrosinase 저해활성

OFR의 ISP 공정을 통해 회수한 RPI의 시판 proteases 가수분해물들의 tyrosinase 저해활성(Table 4)은 효소 처리하지 않은 control (29.3%)를 포함하여 모든 효소 가수분해물들이 24.2–38.1%의 저해활성을 나타내었으나, control보다 유의적으로 우수한 저해활성을 보인 가수분해물은 FL (33.0%), PR (33.0%) 그리고 AA (38.1%)이었다. Kang et al. (2024b)은 넙치 알 증자-건조처리 농축분말은 저해활성을 없었으나, FL (12.5%), PR (11.1%) 그리고 Aroase-API0 (18.6%)에 의해 tyrosinase 저해활성을 나타내었으나, 다른 효소 가수분해물들에서는 저해활성을 보이지 않았다고 하였다. 따라서 이 연구의 넙치 알 분리단백질의 가수분해물들은 이의 농축분말(Kang et al., 2024b)보다 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타내었을 뿐만 아니라 공통적으로 FL, PR 그리고 AA에 의해 넙치 알로부터 tyrosinase 저해활성이 개선되어 *in vitro* 상의 미백효과가 인정되었다.

그러나 FL, PR 및 AA을 제외한 나머지 효소 가수분해물들의 tyrosinase 저해활성은 효소처리 하지 않은 control에 비하여, 낮은 것으로 나타남으로써 효소의 단백질 가수분해에 따른 추가적인 개선효과는 없는 것으로 확인되었다. 또한 넙치 알 증자-건조처리 농축분말(Kang et al., 2024b)의 가수분해물에 비해 이 연구의 분리단백질의 가수분해물이 우수한 저해활성을 보이는 것은 가열처리에 의한 단백질 구조의 변화보다 ISP 공정의 산/염기를 사용한 화학적 처리로 인한 구조의 변화간의 차

이에 기인하며, 화학적인 구조적 변화가 상대적으로 효소들의 작용이 용이하게 하는 것으로 추정되었다.

넙치(Kang et al., 2024a), 황다랑어(Yoon et al., 2019) 및 가다랑어 알(Cha et al., 2020)로부터 회수한 분리단백질의 tyrosinase 저해활성은 각각 29%, 14.0% 및 13.5%라고 하였으며, 이들의 가공처리수(Lee et al., 2017)에 대해서는 14.6–20.8% 범위의 저해활성을 나타내어, 다소의 미백효과가 기대되었다고 보고하였다. 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 하였으며, 일부 연구에서는 꿀, 밀, 우유, 실크 및 집파리와 같은 천연 자원의 단백질 및 peptide가 Cu²⁺-chelating 작용으로 인해 tyrosinase 활성을 억제할 수 있다고 하였다(Schurink et al., 2007). 따라서 항산화와 관련한 생리활성으로서 tyrosinase 저해활성으로 살펴본 결과, 넙치 알에 대하여 FL, PR 및 AA의 food-grade protease를 이용한 가수분해물을 제조한다면 미백효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다.

ACE 저해활성

RPI의 시판 proteases 가수분해물의 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성(Table 4)은 control (38.0%)에 비하여 모든 효소가수분해물의 ACE 저해활성은 52.0–83.3%범위의 저해활성을 나타내어, 효소처리에 의한 ACE 저해활성의 개선 효과가 뚜렷하였다. Serine protease 가수분해물인 TR 및 CH는 매우 낮은 DH (각각 1.3 및 0.7%, Table 1)임에도 불구하고 상대적으로 강한 저해활성을 나타내어, 이 효소의 기질특이성(염기성 및 방향족 아미노산의 C-말단을 분해)에 따른 영향이라고 추정되었다. 아울러 food-grade proteases 가수분해물은 DH에 준하는 저해활성을 보여, PN (83.3%)이 가장 강한 저해활성을 그 다음으로 FL(79.6%) 및 PR (78.7%) 순이었다. Kang et al. (2024b)은 넙치 알 농축분말의 효소 가수분해물들은 serine proteases에 의한 기질 특이성과 더불어 food-grade proteases에 의한 높은 DH가 ACE 저해활성을 높이는 경향이라고 하였으며, AL, PR 그리고 AA 가수분해물의 ACE 저해활성(87–89%) 개선효과가 두드러진다고 하여, 이 연구의 PN, FL 및 PR과는 다소 차이가 있었다. 이는 넙치 알 농축분말(Kang et al., 2024b)과 이 연구의 분리단백질 제조과정의 차이로 인해 최종 농축분말(pH 6부근) 및 분리단백질(pH 4.2 부근)에 작용하는 효소작용에 영향을 미쳤을 것으로 판단되었다.

넙치(Kang et al., 2024a), 황다랑어(Yoon et al., 2018a) 및 가다랑어(Cha et al., 2020) 알 분리단백질의 ACE 저해활성(%)은 각각 30.8%, 35.7% 및 44.0%의 저해활성을 나타내어, 이 연구의 RPI 가수분해물이 가수분해에 따른 저해활성의 개선 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 수산자원 유래 ACE 저해활성과 관련한 연구에서, Oh et al. (2007)은 가다랑어, 문어 및 굴 자숙수의 가열처리 농축액의 ACE 저해활성은 매우 약하거나 나타

나지 않았다는 보고가 있는 반면에 굴의 다양한 효소 가수분해물들은 1.49–16.31 mg/mL 범위의 저해활성을 보였으며, PR 가수분해물이 가장 우수하다고 하였다(Chung et al., 2006). Kim et al. (2016)은 새우 가공부산물에 대한 효소 가수분해물은 PR이 가장 우수하였고, 그 다음으로 FL, AL, PA 그리고 TR 순이라고 보고한 바 있다.

이상의 연구결과를 통해 OFR로부터 ISP 공정으로 회수한 RPI의 가수분해물들은 PN이 DH에서, FL 및 PR은 효소작용에 따른 유리 및 방출된 아미노산함량에서, TR, CH, PA 및 BR은 식품 기능성에서, FL, PR 및 AA은 항산화, *in vitro* 미백효과 및 항고혈압 활성에서 우수 하였다. 따라서, 이들 넙치 알의 분리단백질에 대한 효소 가수분해물들은 기능성 식품소재로서 새로운 형태의 기능성 강화 음료, 수산가공품 및 식품가공 산업에 적용 가능할 것이다. 뿐만 아니라 자외선 protection 화장품 소재로서 화장품산업에도 응용 가능할 것으로 판단되었다.

References

- Alemán A, Giménez B, Montero P and Gómez-Guillén MC. 2011. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT Food Sci Technol* 44, 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.003>.
- 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. <https://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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1470>.
- Chalamaiah M, Balaswamy K, Rao GN, Rao PP and Jyothirmayi T. 2013a. Chemical composition and functional properties of mrigal (*Cirrhinus mrigala*) egg protein concentrates and their application in pasta. *J Food Sci Technol* 50, 514-520. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0357-5>.
- Chalamaiah M, Hemalatha R, 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. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.08.006>.
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Hemalatha R and Dinesh Kumar B. 2013b. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.020>.
- Chalamaiah M, Rao NG, Rao DG and Jyothirmayi T. 2010. Protein hydrolysates from merigal (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chem* 120, 652-657.
- 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. <https://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. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.7.919>.
- DeMan JM. 1999. Proteins. In: Principles in Food Chemistry. DeMan JM, ed. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A., 111-162.
- 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>.
- 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>.
- Galla NR, Pamidighantam PR, Akula S and Karakala B. 2012. 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>.
- 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>.
- Gilmartin L and Jervis L. 2002. Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. *J Agric Food Chem* 50, 5417-5423. <https://doi.org/10.1021/jf011466j>.
- 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>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S and Visessanguan W. 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.food-chem.2012.06.076>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W and Wu J. 2014. Effects of skipjack roe protein hydrolysate on properties and oxidative stability of fish emulsion sausage. LWT Food Sci Technol 58, 280-286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.036>.
- 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>.
- Kang SI, Kwon IS, Yoon IS, Choe YR, Lee JS, Kim JS and Heu MS. 2023a. Food characteristics of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe by isoelectric solubilization and precipitation process. Korean J Fish Aquat Sci 56, 162-173. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0162>.
- Kang SI, Kwon IS, Yoon IS, Kim JS, Lee JS, Kim HJ and Heu MS. 2024a. Influence of pH-shift on food functionality of protein isolates recovered by isoelectric solubilization and precipitation from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roes. Korean J Fish Aquat Sci 57, 1-14. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0001>.
- Kang SI, Park SY, Yoon IS, Kim JS, Kwon IS and Heu MS. 2023b. Purification and characterization of leucyl aminopeptidase from the *Todarodes pacificus* hepatopancreas. Food Biosci 56, 103139. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103139>.
- Kang SI, Yoon IS, Kim MK, Lee JS and Heu MS. 2024b. Food functionalities of various enzyme hydrolysates prepared from olive flounder *Paralichthys olivaceus* steam-dried roe concentrate. Korean J Fish Aquat Sci 57, 515-529. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0515>.
- Kim HJ, Lee HJ, Park SH, Jeon YJ, Kim JS and Heu MS. 2015. Recovery and fractionation of serine protease inhibitors from bastard halibut *Paralichthys olivaceus* roe. Korean J Fish Aquat Sci 48, 178-186. <https://doi.org/10.5657/kfas.2015.0178>.
- 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.
- 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, 29. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0028-6>.
- 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.food-chem.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. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
- 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, Lee GW, Yoon IS, Park SH, Park SY, Kim JS and Heu MS. 2016b. Preparation and characterization of protein isolate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* roe by isoelectric solubilization/precipitation process. Fish Aquat Sci 19, 14. <https://doi.org/10.1186/S41240-016-0014-Z>.
- Lee HJ, Park SH, Yoon IS, Lee GW, Kim JS and Heu MS. 2016a. Chemical composition of protein concentrate prepared from yellowfin tuna *Thunnus albacores* roe by cook-dried process. Fish Aquat Sci 19, 12. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0012-1>.
- Liu J, 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.
- Mutilangi WAM, Panyam D and Kilara A. 1996. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. J Food Sci 61, 270-274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14174.x>.
- 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>.
- Oh HS, Kang KT, Kim HS, Lee JH, Jee SJ, Ha JH, Kim JS and Heu MS. 2007. Food component characteristics of seafood cooking drips. J Korean Soc Food Sci Nutr 36, 595-602. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.5.595>.
- Ovissipour M, Rasco B, Shiroodi SG, Modanlow M, Gholami S and Nemati M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. J Sci Food Agric 93, 1718-1726. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5888>.

- org/10.1002/jsfa.5957.
- 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.
- Rajapakse N, Mendis E, Byun HG and Kim SK. 2005. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutr Biochem* 16, 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.005>.
- Sampath Kumar NS, Nazeer RA and Jaiganesh R. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis corchyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids* 42, 1641-1649. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0858-6>.
- Sarmadi BH and Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>.
- Sathivel S, Bechtel PJ, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond KD and Prinyawiwatkul W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysates. *J Food Sci* 68, 2196-2200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05746.x>.
- Schurink M, van Berkel WJ, Wichers HJ and Boeriu CG. 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* 28, 485-495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>.
- Shahidi F. 1994. Sea food processing by-products. In: *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Shahidi F and Botta JR, eds. London Blackie Academic & Professional, London, U.K., 321-334.
- Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y and Nasri M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technol Biochnol* 45, 187-194.
- Yoon IS, Kang SI, Park SY, Cha JW, Kim DY, Kim JS and Heu MS. 2018a. Physicochemical properties of alkaline insoluble fractions recovered from bastard halibut *Paralichthys olivaceus* and skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* roes by alkaline solubilization. *Korean J Fish Aquat Sci* 51, 230-237. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0230>.
- Yoon IS, Kim JS and Heu MS. 2018c. Food functionality of collagenous protein fractions recovered from fish roe by alkaline solubilization. *Korean J Fish Aquat Sci* 51, 351-361. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0351>.
- 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. 2018b. 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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.793>.
- 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. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920081>.