

# 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 알로부터 등전점 가용화/침전공정으로 회수한 분리단백질의 식품기능성에 미치는 pH-shift의 영향

강상인 · 권인상<sup>1</sup> · 윤인성 · 김진수 · 이정석 · 김형준<sup>2</sup> · 허민수<sup>1\*</sup>

경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, <sup>1</sup>경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소, <sup>2</sup>식품의약품안전처

## Influence of pH-shift on Food Functionality of Protein Isolates Recovered by Isoelectric Solubilization and Precipitation from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Roes

Sang In Kang, In Sang Kwon<sup>1</sup>, In Seong Yoon, Jin-Soo Kim, Jung Suck Lee, Hyeung Jun Kim<sup>2</sup> and Min Soo Heu<sup>1\*</sup>

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

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

<sup>2</sup>Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Republic of Korea

We investigated the functional properties and *in vitro* bioactivity of protein isolates (RPIs) recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roes by isoelectric solubilization/precipitation process, according to pH-shift treatments. The buffer capacity of RPIs was shown to be stronger in alkaline pH than in acidic pH. Water holding capacity of RPIs was in range of 4.5–5.2 g/g protein with no significant differences ( $P>0.05$ ). The foaming capacity and emulsifying activity index of RPIs did not show any significant differences between RPI-1 (pH 11/4.5) and 3 (pH 12/4.5), however they were superior to RPI-2 (pH 11/5.5) and 4 (pH 12/5.5). The 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging activity of RPI-3 (2.5 mg protein/mL) was 102.4  $\mu\text{g/mL}$ , and the angiotensin I converting enzyme inhibitory activity was 30.8%. Among the RPIs, RPI-3 was relatively superior in protein functional properties such as buffer capacity, foaming capacity, emulsification, and anti-oxidative activity. Therefore, we suggest that RPI prepared from olive flounder roes could serve as a potential food resource.

Keywords: Olive flounder, Roe protein isolates, Isoelectric solubilization/precipitation, pH-shift treatment, Food functionality

### 서론

수산가공산업은 가공과정 중에 필연적으로 가식부를 제외한 원료의 30–60%에 이르는 머리, 껍질, 중골 프레임, 지느러미, 비늘, 알, 내장 그리고 폐각과 같은 비가식 부산물들이 다량으로 발생한다(Galla et al., 2012b; Park et al., 2016). 이러한 가공부산물의 영양적 가치는 가식부와 유사하지만(Dong and Bechtel, 2010), 대부분은 산업적 응용이나 동물 및 인간의 소비를 위한 식품소재나 부가가치 부여한 제품으로 활용되

지 못하고, 폐기됨으로써 환경문제를 초래하기도 한다(Heu et al., 2006; Galla et al., 2012b). 그러나 수산가공부산물의 식품소재로서 활용은 그 경제적 및 영양적 측면에서 수산가공산업계에서 큰 관심을 가지고 있으며(Lee et al., 2016), 이들 가공 부산물은 뼈로부터 칼슘소재(Kim et al., 2000), 간으로부터 단백질 및 고도불포화지방산 소재(Kang et al., 2007b), 알로부터 단백질소재(Heu et al., 2006; Dong and Bechtel, 2010; Park et al., 2016; Yoon et al., 2019, 2023; Cha et al., 2020; Kwon et al., 2022), 이들의 단백질 가수분해물로부터 항고혈압, 항산

\*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.2024.0001>

Korean J Fish Aquat Sci 57(1), 1-14, February 2024

Received 3 July 2023; Revised 18 August 2023; Accepted 12 January 2024

저자 직위: 강상인(대학원생), 권인상(대학원생), 윤인성(대학원생), 김진수(교수), 이정석(교수), 김형준(주무관), 허민수(교수)

화, 비타민 및 무기질소재와 같은 기능성 식품소재(Galla et al., 2012b; Kim et al., 2016) 또는 단백질 및 지질추출소재(Heu et al., 2006; Mahmoud et al., 2008)로서의 이용에 관한 연구(Guerard et al., 2010; Kadam and Prabhasankar, 2010)를 통해 식품 또는 식품소재로 개발될 경우 그 가치는 5배 이상 증가할 것이라고 예상하였다(Liu et al., 2015).

최근 수산가공 부산물의 식량자원화 또는 소재화를 위해, 고 영양원이면서 저 활용 식품자원인 어류 알의 식품기능성과 생리활성에 대한 관심 또한 높아지고 있으나(Intarasirisawat et al., 2014; Park et al., 2016; Cha et al., 2020; Yoon et al., 2020, 2023; Kang et al., 2023), 명태, 대구, 송어, 가다랑어 등 일부의 어류 알만이 염장 발효식품인 알젓의 형태로 소비되고 있을 뿐, 대부분의 어류 알은 식품소재로 이용되지 못하고 있다.

이러한 일면에서 어류 알로부터 영양 강화를 위한 단백질 소재로 이용하고자 하는 노력(Yoon et al., 2019, 2020, 2023; Cha et al., 2020; Kwon et al., 2022; Kang et al., 2023)과 더불어 이들 단백질소재를 이용한 새로운 형태의 수산용합식품의 개발이 절실하다. 아울러 식품가공소재로서의 이용을 위해서는 식품기능성에 대한 연구도 뒷받침되어야 할 것이다.

수산가공원료 구성분의 물리화학적 물성 변화로 인해, 품질에 영향을 주는 식품기능성에는 먼저, 가공원료의 완충능(buffer capacity) 및 보수력(water holding capacity, WHC)은 수화(hydration)와 관련한 단백질 기능성으로서 단백질과 함께 물 또는 기름 간의 상호작용으로 식품의 향 및 texture에 영향을 미치며(Galla et al., 2012b; Mohamed et al., 2012; Park et al., 2016), 특히 단백질 용해도(protein solubility)는 거품, 유화 및 겔 형성과 같은 식품단백질 기능성에 영향을 미치는 중요한 인자이기도 하다(Kristinsson and Rasco, 2000; Mohan et al., 2007; Azadian et al., 2012). 한편, 거품성(foaming capacity, FC) 및 거품안정성(foam stability, FS)은 식품의 신선감(refreshment), 부드러운 촉감(softening) 그리고 방향성분의 분산과 같은 독특한 특성을 부여하며(Mutilangi et al., 1996; Damodaran, 1997; Klonpong et al., 2007), 그리고 유화능(emulsifying activity index, EAI)과 유화 안정성(emulsion stability index, ESI)은 water-oil 계면에서 단백질이 oil을 흡착하여 유화층의 형성 및 이를 유지시키는 능력을 말한다(Karaca et al., 2011). 또한 식품소재의 생리활성(bioactivity)에는 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼(Klonpong et al., 2007) 및 ABTS<sup>+</sup> (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 라디칼 소거활성(You et al., 2010) 그리고 SOD (superoxide dismutase) 유사활성과 환원력(reducing power) 등의 항산화활성과 ACE (angiotensin-I converting enzyme) 저해활성을 통한 항고혈압 활성이 대표적이다.

한편, 등전점 가용화/침전(isoelectric solubilization/precipitation, ISP) 공정은 수산 및 육상가공 원료뿐만 아니라 이들 원료의 가공 시 발생하는 가공부산물로부터 단백질의 회수율을

높이기 위한 처리방법이다. 이 ISP 공정은 미이용/저활용 원료와 그 부산물로부터, 기능성 분리단백질(protein isolates)을 효율적으로 생산하고자 개발된 기술이다(Hultin and Kelleher, 2011). 즉, pH-shift에 따른 단백질 가용성의 변화를 이용하여 가공부산물과 같은 비가식 원료로부터 목적하는 단백질의 회수 및 분리를 가능하게 한다(Mohan et al., 2007; Lee et al., 2016; Yoon et al., 2019). 앞서의 연구에서는 넙치 알을 대상으로 하여, 가열건조 농축물의 식품성분(Kwon et al., 2022)과 식품기능성(Yoon et al., 2023), 그리고 ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질의 식품성분 특성(Kang et al., 2023)에 대해 검토한 바 있으며, 영양 강화용 단백질소재로서의 활용 가능성이 크다고 하였다.

이 연구에서는 넙치(olive flounder *Paralichthys olivaceus*) 알로부터 등전점 용해/침전 공정을 통해 회수한 분리단백질(roe protein isolates, RPIs)의 pH-shift에 따른 식품기능성을 검토하여, 영양 강화 단백질소재의 가공적성에 대한 정보를 제공함으로써 산업적 활용 가능성에 대해 제시하고, 아울러 *in vitro* 항산화성과 항고혈압에 대한 생리활성의 측정을 통해 기능성 소재로서 이용가능성에 대해서도 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 넙치 알로부터 분리단백질의 제조

넙치 알(olive flounder *P. olivaceus* roe)는 2020년 4월 통영시 소재 수산시장에서 살아있는 넙치를 구입하여, 실험실로 운반한 후, 알을 적출하여 실험에 사용하였다. RPIs의 제조는 Kang et al. (2023)의 방법에 따라 제조하였다. 먼저, 일정량의 동결상태로 보관한 넙치 알은 부분 해동(4°C, 12 h)하고, 여기에 6배량(w/v)의 탈 이온수를 가해, 균질화(25,000 rpm, 5 min; POLYTRON® PT 1200E; KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland)한 균질액에 2 N sodium hydroxide 용액을 사용하여 각각 pH 11 및 12로 조절하여, 용해과정(4°C, 1 h)을 실시하였다. 이어서 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min; Supra 22K; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)를 진행하여 얻은 상층액에 대해 2 N HCl을 사용하여 각각 pH 4.5와 5.5로 재조정된 다음, 목적 pH로 조정된 현탁액을 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min)하였다. 이들 원심분리 잔사는 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs로서 동결 건조(FDU-8612; Operone Co., Ltd., Gimpo, Korea; -55°C, 48 h)를 실시하여 분말화한 다음, 각각 RPI-1 (pH 11/4.5), RPI-2 (pH 11/5.5), RPI-3 (pH 12/4.5), 그리고 RPI-4 (pH 12/5.5)로 표시하였다. 이들 RPIs는 일정량씩 나누어 용기에 담아 보관(-20°C)하면서 식품기능성 및 생리활성실험에 사용하였다.

### 단백질농도

Lowry et al. (1951)의 방법에 따라, 단백질 농도는 bovine se-

rum albumin을 표준단백질로 사용하여 구한 검량선으로 측정하였다.

**완충능**

RPIs의 완충능(buffer capacity)은 Park et al. (2016)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 1% (w/v) RPIs 분산액에 대해 초기 pH를 측정하고, pH-shift 처리조건 (pH 2-12 범위)에 따라 0.5 N NaOH 또는 HCl을 사용하여, 1 단위씩의 pH를 변화하는데 소요되는 NaOH 또는 HCl의 부피를 기록하고, 1 g의 시료에 대하여 1 단위의 pH를 변화하는데 필요한 평균 mM NaOH 또는 HCl의 농도로 나타내었다.

**보수력**

RPIs의 WHC는 Park et al. (2016)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mL의 원심관에 300 mg의 시료와 30 mL의 탈 이온수를 가해 1% 분산액(대조구)을 제조하고, 아울러 pH-shift 처리조건(pH 2-12 범위)에 따라 0.5 N NaOH 또는 HCl을 사용하여 2단위씩의 pH를 조정하고 각 pH별 분산액도 조제하였다. 각각의 분산액은 원심분리(12,000 g, 20 min; 4°C)한 다음, 그 잔사(pellet)의 무게를 측정하여 대조군과 각 pH별 실험구에 대한 WHC를 아래의 식을 통하여 나타내었다.

$$\text{WHC (g/g protein)} = \frac{\text{Weight of pellet (g)} - \text{Weight of sample (g)}}{\text{Weight of sample (g)}} \times 100$$

여기서 C는 단백질 함량(%)를 의미하였다.

**단백질 용해도**

RPIs의 단백질 용해도(protein solubility)는 Park et al. (2016)의 방법에 따라 측정하였다. 1% RPIs 분산액을 조제한 다음, 0.5 N HCl 또는 NaOH로 분산액을 2단위씩 pH를 조정하였다. 이들 각 pH별 분산액은 실온에서 30 min 동안 안정화시킨 다음, 원심분리(12,000 g, 20 min)을 실시하였다. 대조구와 각 pH별 분산액의 상층액에 대한 단백질의 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 측정하고, 분산액의 부피를 곱하여 상층액의 총 단백질함량을 계산하였다. 이때의 용해도는 아래의 식으로 구하였다.

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{Protein content in supernatant}}{\text{Total protein content in sample}} \times 100$$

**거품 형성능**

RPIs의 FC와 FS는 Park et al. (2016)에 따라 측정하였다. 즉, 1% 분산액에 대해 0.5 N HCl 또는 NaOH로 분산액을 2단위씩 pH를 조정하고, 10 mL의 각 pH별 분산액은 25 mL의 메스 실린더에 옮겨 담고, 균질화(12,500 rpm, 1 min)하여 거품 형성을 유도하였다.

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 구하였다.

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

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

이때 VT는 균질 후 총 부피, V<sub>0</sub>는 균질 전의 총 부피, FT는 균질 직후 거품의 부피, Ft와 Vt는 주어진 시간(t=15, 30, 60 min) 경과 후의 거품부피 및 총 부피로 각각 나타내었다.

**유화 형성능**

RPIs의 EAI와 ESI는 Park et al. (2016)의 방법에 따라 측정하였다. 각 pH별로 조정하고 1% RPI 분산액(w/v)과 식용유(soybean oil; Ottogi Co., Ltd., Seoul, Korea)는 각각 3:1 (v/v)의 비율로 혼합하고 균질화(12,500 rpm, 1 min)하여 emulsion 형성을 유도하였다. 일정량(50 µL)의 emulsion을 취해 5 mL의 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액과 혼합하여 분광광도계(UV-2900; Hitachi, Kyoto, Japan)를 사용하여 파장 500 nm에서 균질화한 직후의 흡광도(A<sub>0min</sub>)와 10 min 경과 후의 흡광도(A<sub>10min</sub>)를 측정하여 아래의 식으로 각각 EAI (m<sup>2</sup>/g protein) 및 ESI (min)를 구하였다.

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

이때, A는 파장 500 nm에서의 흡광도, D는 회석비(100), l은 빛이 통과하는 cuvette의 폭(1 cm), φ는 혼합액 중에 식용유가 차지하는 비율(0.25) 그리고 C는 단백질의 농도(g/mL)를 각각 나타내었다.

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

여기서 ΔA는 A<sub>0min</sub>에 대한 A<sub>10min</sub>의 흡광도의 차이, Δt는 10 min을 의미하였다.

**ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성**

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 1% RPIs의 분산액(1 mL)에 3 mL의 ABTS<sup>+</sup> 용액과 혼합하여, 실온의 암소에서 30 min 동안 반응시킨 후, 파장 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성(%)은 아래의 식으로 계산하였으며, IC<sub>50</sub> value (mg/mL)는 50%의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity(%) =

$$\frac{\text{Control}_{734} - \text{Sample}_{734}}{\text{Control}_{734}} \times 100$$

이때의 대조구(control<sub>734</sub>)는 시료용액 대신 탈 이온수에 대해 측정된 흡광도를 나타내었다.

### Tyrosinase 저해활성

RPIs의 tyrosinase 저해활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 300  $\mu\text{L}$ 의 1% RPIs의 분산액은 900  $\mu\text{L}$ 의 mushroom tyrosinase (50 Unit/mL)와 1.5 mL의 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합하여 실온에서 30 min 동안 전 단계 반응을 실시한 후, 300  $\mu\text{L}$  of 10 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 용액을 가하여, 파장 475 nm에서 20 min 동안 1 min 간격으로 생성되는 dopachrome의 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 대조구(control<sub>475</sub>)는 시료 대신 탈 이온수를 가하여 측정한 흡광도를 의미하였다.

### ACE 저해활성

ACE 저해활성은 Cha et al. (2020)의 방법에 따라 측정하였다. 100  $\mu\text{L}$ 의 1% RPIs 분산액, 50  $\mu\text{L}$ 의 ACE 용액 그리고 50  $\mu\text{L}$ 의 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 혼합한 반응용액은 실온에서 30 min 동안 전 단계 반응을 실시하였다. 여기에 50  $\mu\text{L}$ 의 5 mM hippuryl-his-leu (HHL) acetate salt를 함유한 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 가하여 37°C에서 60 min 동안 반응하였다.

250  $\mu\text{L}$ 의 1 N HCl을 가해 반응을 정지시키고, 여기에 1.5 mL의 ethyl acetate를 가하여 hippuric acid의 추출, 원심분리(1,890 g, 10 min, 4°C)하여 파장 228 nm (UV-2900; Hitachi, Kyoto, Japan)에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성(%)은 아래의 식에 따라 구하였으며, IC<sub>50</sub> 값(mg/mL)은 ACE 활성의 50%를 저해하는 시료의 농도로 정의하였다.

ACE 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, 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터는 SPSS 12.0 K (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 ANOVA test를 통해 분산 분석을 실시하고, Duncan의 다중위 검정법으로 최소유의차검정(P<0.05)을 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 완충능

넙치 알로부터 ISP를 통해 회수한 RPIs의 pH-shift 처리에 따른 완충능(buffer capacity)에 대한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 먼저, pH-shift 처리 전 1% 분산액(control)의 pH는 RPIs는 pH 4.3–5.1 범위를 나타내었다(데이터 미제시). 가다랑어 알(Cha et al., 2020)과 황다랑어(Yoon et al., 2019)로부터 알칼리 가용화 및 산 침전공정을 통해 회수한 분리단백질은 pH 3.5–5.3 범위로 산 침전공정의 최종목적 pH에 따라 차이가 있다고 하였고, 이들의 양성대조군으로서 casein 및 hemoglobin의 pH는

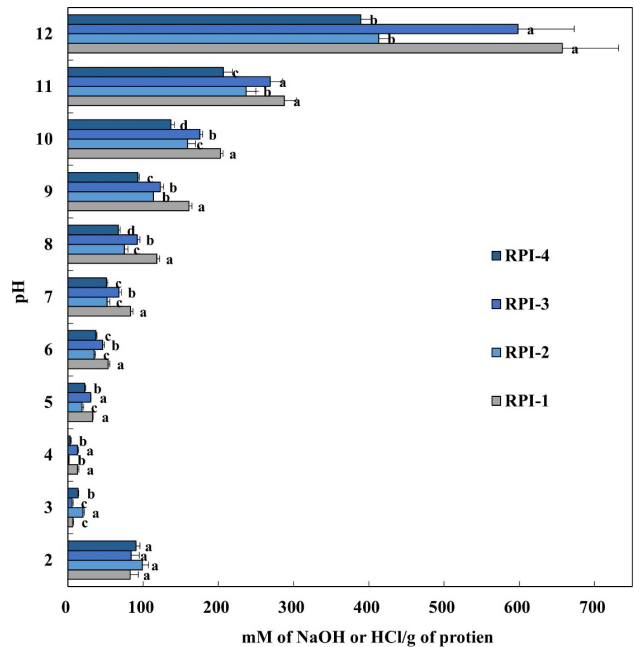


Fig. 1. Buffer capacity of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation according to pH-shift treatment. RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12. Data are given as mean values  $\pm$  SD (n=3). Means with different letters within the pH are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

5.2 및 7.1이라고 하였다. 한편 넙치 알(Yoon et al., 2023)과 가다랑어 알(Yoon et al., 2018b)의 가열-건조처리 농축물은 이들의 1% 분산액에 대한 초기 pH는 5.8–6.2범위이었다. Park et al. (2016)은 황다랑어 알 농축물과 난백(egg white)의 1% 분산액의 초기 pH는 각각 pH 5.9와 7.4이며, 이들 초기 pH 부근에서, 양성 대조군을 포함한 모든 시료(1% 분산액)의 완충능은 최소화 되어 등전점 근처에 있는 것으로 추정하였다(Lee et al., 2016; Alvarez et al., 2018). 따라서 어류 알 농축물 또는 분리단백질의 식품소재로서 활용하기 위한 가공처리 조건에 따라 이들의 초기 pH에는 다소 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 이는 열처리 또는 산/알칼리 처리에 따른 차이에 기인한다고 판단되었다.

ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질인 RPIs의 완충능은 pH-shift 2–6구간에서의 경우, RPI-2와 RPI-4가 1단위의 pH를 변화시키는데 22.6–24.7 mM HCl/g protein이 소요되어 다른 RPIs에 비하여 유의적으로 우수한 것으로 확인되었으나 ( $P < 0.05$ ), pH-shift 6–12구간에서는 오히려 RPI-1과 RPI-3이 99.7–109.5 mM NaOH/g protein으로 RPI-2와 RPI-4 (64.9–68.8 mM NaOH/g protein)에 비하여 우수한 완충능을 나타내었다. 한편 RPI-1과 RPI-3은 pH 3에서 그리고 RPI-2와 RPI-4는 pH 4에서 최소의 완충능을 나타냄으로서, 이들의 pH는 ISP 공정 처리조건에 따른 각각의 분리단백질의 등전점 부근으로 판단되었다(Lee et al., 2016; Alvarez et al., 2018; Yoon et al., 2019; Cha et al., 2020).

가다랑어 알 분리단백질(Cha et al., 2020)은 1단위의 pH를 변화시키는데 pH-shift 2–6구간에서 19.9–23.2 mM HCl/g protein 그리고 pH-shift 6–12에서 39.9–63.9 mM NaOH/g protein의 완충능을 나타내었으며, 황다랑어 알 분리단백질(Yoon et al., 2019)은 각각 15.0–28.2 mM HCl/g protein (pH-shift 2–6구간) 및 53.5–69.6 mM NaOH/g protein (pH-shift 6–12)이었으며, 공통적으로 pH 4–6구간에서 최소의 완충능을 나타내었다. 따라서, 이 연구의 넙치 알 분리단백질이 다랑어류 알에 비해 완충능이 우수하였으며, 같은 조건의 pH-shift 처리에 있어서도 어종에 따른 최소 완충능을 나타내는 pH에서는 다소 차이가 있었다.

Chalamaiah et al. (2013a)에 의하면, mrigal알 농축분말은 탈지한 농축분말에 비하여 완충능이 우수하며, 이는 농축분말 중의 지질성분이 산과 알칼리 요구량을 높여 완충능에 영향을 미친 결과라고 보고하였다. 또한 1 단위의 pH를 변화시키는데 소요되는 산과 알칼리의 평균필요량이 각각 0.65 mM HCl 및 1.22 mM NaOH/g으로, 본 연구결과에 비해 현저히 낮은 수준이었다. *Cyprinus carpio*와 *Epinephelus tauvina* (Galla, 2013), 넙치 알(Yoon et al., 2023), 가다랑어 알(Yoon et al., 2018b) 및 황다랑어 알(Park et al., 2016)의 가열-건조처리 농축분말, 그리고 gum karaya seed 분말(Galla and Dubasi, 2010)의 알칼리 pH 조건에서의 완충능이 산성에 비해서 유의적으로 높

다고 하여, 이 실험결과와도 일치하였다. 다만 단백질 기원에 따른 최소 완충능(등전점)을 나타내는 pH에서는 차이가 있었다. 한편 우유와 혈액의 분리단백질인 casein과 hemoglobin은 1단위의 pH를 변화시키는데 각각 17.6 및 25.2 mM/g protein (pH 2–6구간), 그리고 33.5 및 21.0 mM NaOH mM/g protein (pH 6–12)이 소요되었으며, 각각 pH 5와 pH 7에서 최소의 완충능을 나타낸다고 보고하였다(Yoon et al., 2019; Cha et al., 2020). 이상의 결과와 보고에 따르면, 산성 pH구간에서 넙치의 완충능이 가다랑어 및 황다랑어에 비하여 강한 것으로 나타난 반면에 알칼리성 pH구간에서는 넙치가 낮은 것으로 확인되어, 이는 어종 간의 구성단백질의 분포와 더불어 지방함량의 차이(Kang et al., 2023)가 반영된 결과라고 추정할 수 있었다. 이상의 결과와 보고를 통해 어류 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질들의 완충능은 동결건조 농축분말, 알칼리 불용성획분 및 가열-건조처리 농축분말에 비해 상대적으로 우수한 완충능을 나타내어 외부 pH 환경의 변화에 영향을 받지 않을 것으로 예상되었다. 이는 가공공정 중에 pH 조정에 의한 변화에 대해 안정하다는 것을 의미한다. 또한 이러한 식품소재의 완충능력은 농축단백질, 분리단백질 및 가수 분해물의 스케일업(scale-up)공정의 절차 설계에 기여할 것으로 기대되었다(Galla et al., 2012a, 2012b; Park et al., 2016; Yoon et al., 2019, 2023; Cha et al., 2020).

### 보수력

넙치 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 pH-shift처리에 따른 WHC에 대한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. pH-shift 처리하지 않은 대조군(control)으로서, RPIs는 4.6–5.2 g/g protein 범위로서 RPIs 상호간의 유의성은 인정되지 않았다 ( $P > 0.05$ ). casein과 hemoglobin의 WHC가 각각 3.8 및 0.9 g/g protein (Yoon et al., 2019)으로서 이 연구의 RPIs가 상대적으로 우수하였다.

황다랑어 알(Yoon et al., 2019)과 가다랑어 알(Cha et al., 2020)에서 회수한 분리단백질의 WHC는 각각 3.7–4.0 g/g 및 3.3–5.4 g/g으로 알칼리 용해과정 후에, 이어지는 pH 4.5의 산 침전과정에서 회수한 분리단백질이 pH 5.5에서 회수한 것보다 WHC가 우수하다고 하여, 이 연구의 RPIs와 유사한 경향이었다. tilapia로부터 회수한 분리단백질(2.5–2.6 mL/g, Mohamed et al., 2012), mrigal 알(1.79 g/g, Chalamaiah et al., 2013a), 황다랑어 알(4.1–4.7 g/g, Park et al., 2016), 그리고 가다랑어 알 농축분말(3.7–3.9 g/g protein, Yoon et al., 2018b)의 경우도 이 실험의 결과에 비해 낮은 WHC를 나타내었다. Galla et al. (2012a)와 Chalamaiah et al. (2013b)는 어류 알 농축단백질이 기름보다 많은 수분을 흡수하며, 이것은 농축단백질의 극성기(COO- 및 NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)의 존재로 인해 보다 쉽게 물 분자와 결합하는 특성에 기인한다고 보고하였다. 따라서 이상의 결과와 연구 보고에서, ISP 공정을 통해 회수한 어류 알 분리단백질의 WHC

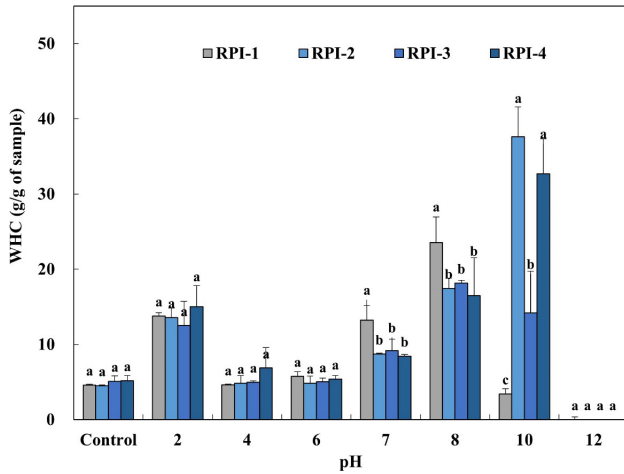


Fig. 2. Water holding capacity of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation according to pH-shift treatment. RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12. Data are given as mean values $\pm$ SD (n=3). Means with different letters within the same pH are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

가 어종 간의 차이를 감안하더라도, 농축단백질에 비하여 상대적으로 우수한 것으로 확인되었다.

한편 넙치 알 분리단백질인 RPIs의 pH-shift 처리에 따른 WHC의 변화는, 먼저 산성(pH 2)에서 RPIs는 12.5–15.0 g/g 범위의 WHC를 나타내었으며, RPI-1 (23.5 g/g)과 RPI-3 (18.2 g/g)은 pH 8에서 그리고 RPI-2 (37.6 g/g)와 RPI-4 (32.7 g/g)는 pH 10에서 최대의 WHC를 갖는 것으로 확인되었다. 그러나 pH 4–6에서는 최소 WHC를 나타냄으로써 등전점 부근인 것으로 추정되며, pH-shift 처리하지 않은 대조구보다 유사하거나 우수한 WHC를 보임으로서 pH-shift 처리에 따른 개선효과는 인정되었다. 또한 알칼리 용해과정 이후, 이어지는 산 침전과정에서 pH 5.5 (RPI-2 및 4)에서 회수한 분리단백질이 pH 4.5 (RPI-1 및 3)에서 회수한 것보다 유의적으로 우수한 WHC를 나타내었다( $P<0.05$ ). 그러나 pH-shift 12처리에서 RPIs는 모두 용해되어 WHC가 나타나지 않았으며, Yoon et al. (2019)의 casein (pH-shift 8–12구간)과 hemoglobin (pH-shift 전 구간)도 0.0–0.6 g/g 수준의 WHC를 나타냄으로써 해당 pH-shift 처리 구간에서 단백질이 대부분 용해되었음을 유추할 수 있었다.

Cha et al. (2020)은 가다랑어 알에서 회수한 분리단백질의 경우 pH 10–12 (19.8–40.6 g/g)에서의 WHC가 pH 2 (20.7–36.7 g/g)에서 보다 우수하다고 하였으며, pH 4–8(3–6 g/g)에서는 pH-shift 처리하지 않은 대조구와 유사하다고 하였다. 또한 Yoon et al. (2019)은 황다랑어 알에서 회수한 분리단백질의 경

우도 20–23 g/g (pH 2), 20–34 g/g (pH 12) 그리고 3–8 g/g (pH 4–8구간)의 WHC를 나타내어, 가다랑어 알 분리단백질과 유사한 경향이였다.

따라서 이 연구의 넙치 RPIs는 다랑어류 알에 대한 연구결과와는 pH-shift에 따른 WHC에 차이가 있었으나, 넙치가 WHC 측면에서 다랑어류에 비하여 우수한 경향을 나타내었다. 한편, 등전점(pH 4–6) 부근의 pH-shift 처리에 따른 WHC는 정전기적 반발력(electrostatic repulsion)의 증가로 WHC는 감소하게 되고, 등전점보다 더 낮은 pH ( $< \text{pH } 4$ ) 또는 높은 pH ( $> \text{pH } 10$ )로 조정하였을 때, 정전기적 반발력이 감소하게 되어 WHC는 증가한다고 보고하였다(Azadian et al., 2012).

따라서 산 또는 알칼리 영역의 pH-shift 처리로, RPIs의 입체구조 변화가 일어남으로써 표면에 노출되는 친수성 아미노산이 주변 물에 쉽게 접근하여 WHC가 증가하는 것으로 판단된다. 아울러 Azadian et al. (2012)은 silver carp 분리단백질의 최소 WHC는 등전점 부근인 어류 육(pH 6.3)의 pH에서 관찰되었다고 보고한 바 있으며, 이상의 결과와 연구보고에서도 어류 알의 등전점 부근인 pH 4–6 범위에서, 단백질의 응집(protein aggregation) 또는 침전(precipitation)으로 인해 WHC가 감소하여 최소의 WHC를 나타내었다. 이러한 WHC의 감소는 단백질과 물(protein-water)간의 상호작용에 있어, 단백질 및 아미노산 극성기(polar groups)의 존재가 중요한 역할을 하기 때문에, 특히 등전점부근에서는 극성기의 노출이나 분포의 감소가 인한 결과로 판단되었다(Tan et al., 2014).

### 단백질 용해도

넙치 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 pH 2–12구간의 pH-shift 처리 유무에 따른 용해도(protein solubility)를 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 단백질 용해도는 거품, 유향 및 겔 형성능 등과 같은 단백질 기능성에 영향을 미치는 중요한 인자이다(Kinsella and Melachouris, 1976; Mohan et al., 2006; Azadian et al., 2012).

넙치 알 분리단백질인 RPIs의 용해도는 pH-shift 처리하지 않은 대조구(control)의 경우, 6.6–9.8% 범위로서, RPI-2 (9.8%)가 다른 RPIs에 비해 상대적으로 높은 용해도를 나타내었으나, ISP 처리조건에 따른 유의적인 차이는 아니었다( $P>0.05$ ). 이들 RPIs는 pH 4의 pH-shift 처리에서 공통적으로 이들의 대조구와 유사한 수준(5.4–9.7%)으로 가장 낮은 용해도를 나타내었으나, pH 2에서 22.2–34.2%의 용해도를, 그리고 RPI-1과 3은 pH 10–12에서 102.3–134.0%, RPI-2와 4는 pH 12에서 122.3–132.2%의 용해도를 나타내어 ISP 공정의 처리조건에 따른 차이가 확인되었으며, 알칼리 용해과정(pH 11과 12) 이후에 이어지는 산 침전과정에서는 pH 4.5에서 회수한 분리단백질(RPI-1 및 3)은 알칼리 pH-shift 처리에서, 반면에 pH 5.5에서 회수한 분리단백질(RPI-2 및 4)은 산성 pH-shift 처리에서 상대적으로 우수한 용해도를 나타내었다.

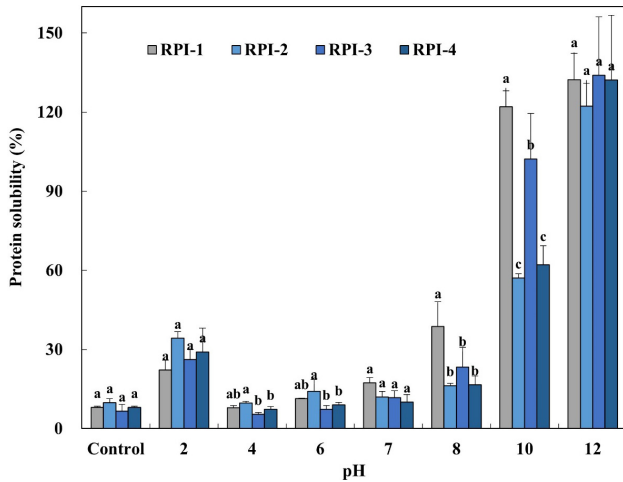


Fig. 3. Protein solubility of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation according to pH-shift treatment. RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12. Data are given as mean values±SD (n=3). Means with different letters within the same pH are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Yoon et al. (2019)은 황다랑어 알 분리단백질의 용해도는 2.3–3.2%이며, pH-shift 2에서 12.6–24.5% 그리고 pH-shift 12에서 20.4–41.6%의 용해도를 나타내어 알칼리성 pH-shift 처리가 상대적으로 우수하지만, pH 4–6구간에서 최소 용해도를 보인다고 하였다. 또한 Cha et al. (2020)은 가다랑어 알 분리단백질들은 1.7–6.7%의 용해도를 나타내었으며, 이들의 pH-shift 처리를 통해 pH 2에서 17.8–33.1% 그리고 pH 12에서 69.1–92.9%의 용해도로 알칼리 pH-shift 처리가 용해도 개선효과 면에서 우수하다고 하였다. 이 연구의 넙치 알 분리단백질이 다랑어류보다 대조구 및 pH-shift 처리에 따른 단백질 용해도가 우수하였다.

한편, 황다랑어 알(Park et al., 2016)과 가다랑어 알(Yoon et al., 2018b)의 가열-건조(cook-dried) 공정을 통해 제조한 단백질 농축분말의 용해도는 pH-shift 12에서 각각 8.9–9.5% 및 12.9–14.2%이었으며, 이 실험결과에 비추어, 넙치 RPIs의 용해도보다 현저히 낮은 것으로 확인되었다. 이러한 차이는 가열-건조 과정에서의 단백질의 가열변성에 비해, ISP 공정 중 소수성잔기의 노출이 보다 많이 일어남에 따른 용해도 감소가 반영된 것이라 판단되었다(Sikorski and Naczka, 1981). 따라서 등전점 부근(pH 4–6)의 pH를 제외한 pH-shift 처리는 단백질의 용해도를 개선하는 것으로 확인되었다(Kinsella and Melachouris, 1976; Yoon et al., 2018b; 2019; 2020; Cha et al., 2020). 이상의 결과와 연구보고에서 pH 2와 pH 12와 같은 극단의 pH-

shift 처리는 물(water) 주변의 단백질이 더 많은 하전을 띠게 되거나, 보다 많은 극성기가 노출됨으로서 단백질 용해도를 향상시킬 수 있음을 의미하였다. 아울러 단백질 용해도는 단백질-단백질 및 단백질-용매 간의 상호 작용에 의해 영향을 받으며, 단백질의 표면 소수성-친수성 균형에 의해 영향을 받는다고 하였다(Kristinsson et al., 2005; Mohan et al., 2006; Yoon et al., 2018a).

Yoon et al. (2018a)은 ISP 공정의 알칼리 용해과정 중에서 넙치, 가다랑어 및 황다랑어 알의 알칼리 불용성획분의 용해도는 넙치(17.2–21.5%)가 다랑어류(1.7–2.7%)에 비하여 월등히 높은 용해도를 나타내었으며, pH-shift pH 2 및 12 처리에서의 용해도는 넙치가 각각 14.0–16.3% 및 20.3–23.0%범위로서 pH-shift 처리하지 않은 대조구와 유의적인 차이가 없는 반면에, 다랑어류의 알칼리불용성 획분(각각 7.8–8.3% 및 12.1–21.1% 범위)은 pH-shift 처리 전 구간에서 이들의 대조구보다 우수한 용해도를 나타내었다고 하였다. 또한 Yoon et al. (2019)은 pH-shift 처리하지 않은 우유의 분리단백질인 casein의 용해도(0.4%)가 거의 불용성인 것으로 확인되었으며, pH-shift 처리를 통해 pH 4–6구간을 제외하고, 42.8% (pH 2)에서 83.8–90.35 (pH 7–12)에 이르는 용해도 개선 효과가 있었으며, hemoglobin의 경우 pH-shift 처리하지 않은 대조구(77.3%)를 포함하여 pH-shift 처리 전 구간에서 82.3–99.9%에 이르는 용해도를 나타내어, pH-shift 처리에 따른 용해도 개선 효과뿐만 아니라 단백질기원의 차이도 인정되었다.

### 거품 형성능

Table 1은 넙치 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질인 RPIs의 식품 기능 특성으로서 거품 형성능에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다.

먼저, FC의 경우, pH-shift 처리하지 않은 대조구(control)는 RPI-2 (100%)를 제외한 RPIs (114.0–119.6%)에서 FC가 유의적으로 인정되었으며(P<0.05), 이들의 FS는 모두 거품형성 후 60이내에 거품은 사라져 안정성이 유지되지 않았다. 한편 양성 대조구로서 우유의 분리단백질인 casein (109%)과 송아지 혈액의 분리단백질인 hemoglobin (120.9%)은 거품형성 직후 60 min까지 hemoglobin에서만 81.1%의 거품이 유지된다고 하였다(Yoon et al., 2019). 따라서 넙치 알의 RPIs는 ISP 공정의 조건에 따라 FC의 유의적인 차이가 있으며, hemoglobin과는 유사한 수준이었으나 casein보다 우수한 FC를 나타내었다.

한편, pH-shift 처리에 따른 넙치알 분리단백질인 RPIs는 pH-shift 4에서 모두 최소의 FC (100.0–116.8%)을 나타내었으나, 그 외의 pH-shift 처리에서 대조구보다 우수한 FC를 나타내었다. 특히 pH-shift 2에서는 147.7–171.2%의 FC로 RPI-3 (171.2%)이 다른 RPIs에 비하여 유의적으로 우수한 FC를 나타내었으나(P<0.05), 이들의 FS는 RPI-2 (37.3%)와 RPI-3 (21.8%)에서만 확인되었다. pH-shift 10–12구간에서는 RPIs

모두 186.3–234.9% 범위로서, casein (130.5–135.6%)과 hemoglobin (129.7–140.0%)보다 우수한 FC를 나타내었다 (Yoon et al., 2019).

또한 pH-shift 처리에 따른 FS는 RPI-1 (62.5–70.9%)과 4 (42.8–75.2%)의 경우 pH-shift 7–12범위에서, RPI-2는 pH-shift 2 (37.2%) 및 7–12 (50.8–75.1%)범위에서, RPI-3은 pH-shift 2 (21.8%) 및 6–12 (52.8–71.6%)범위에서 관찰되었다. 따라서 FC를 고려한 FS의 측면에서는 RPI-3가 가장 우수한 것으로 판단되었으며, 그 다음으로 RPI-2이었다.

한편, Yoon et al. (2018a)은 넙치 알로부터 회수한 알칼리 불용성획분의 FC가 145.8–159.5%이며, 이들의 FS는 거품형성 후 60 min까지 41.9–69.9%의 거품이 유지되었다고 하였다. 아울러 pH-shift 처리에 따른 이들 알칼리 불용성획분은 pH-shift 10–12구간에서 142.3–188.7%의 FC를 나타내었으며, 이때의 FS는 61.4–79.1% 수준이라고 하여 pH-shift 처리에 따른 거품형성능의 개선이 기대된다고 하였다. 또한 다량어류 알로부터 회수한 알칼리 불용성획분의 FC는 가다랑어(120.7%)에서만 인정되었으며, 이들의 FS는 황다랑어와 가다랑어 모두에서 관찰되지 않았고, pH 4에서 넙치 그리고 pH 6에서 가다랑어와 황다랑어의 FC가 관찰되지 않아 등전점 부근인 pH 4와 6에서의 WHC 그리고 단백질 용해도의 결과와 일치한다고 보고하였다 (Yoon et al., 2018a).

황다랑어(Yoon et al., 2019) 및 가다랑어 알(Cha et al., 2020)의 분리단백질의 거품 형성능은 각각 128.1–141.9%와 135.8–147.0% 범위였으나, 이들 분리단백질은 거품 형성 직후 15 min 이 지난 후에 거품층이 사라졌다고 하였으나, pH-shift 12에서, 황다랑어 및 가다랑어 알로부터 회수한 분리단백질의 FC는 166.8–199.6% 및 183.6–208.7%로 증가하여, 다른 pH-shift 처리구간에 비해 유의적으로 높은 FC가 관찰되었으며, 이들은 FS에 있어서도 pH 7–12구간이 pH 2–6구간보다 거품 형성 직후 60 min까지 안정하다고 보고하였다.

가열-건조처리 황다랑어 알(Park et al., 2016)과 가다랑어 알(Yoon et al., 2018b)의 농축분말은 109% 내외의 FC를 보일 뿐이었으며, 거품 형성 직후, 곧바로 거품층이 사라짐으로써 안정성 또한 인정되지 않아, 이는 가열처리에 따른 단백질 응고로 인한 단백질 용해도가 감소함으로써, 나타난 결과라 하였다. 또한 pH-shift 처리에 있어서도 FC는 104.0–119.0% 정도로 pH-shift 처리 전의 대조구와 유사하다고 보고하였다.

식품 기능성에서 FC 및 FS는 식품의 부드러운 촉감(softening), 신선감(refreshment), 그리고 방향성분의 분산과 같은 독특한 특성을 부여하며, 거품이 형성되는 동안, 새로 생성된 공기-액상의 계면(interface)에 신속히 흡착되는 단백질이 계면에서 단백질의 되풀림(unfolding) 및 단백질 분자의 재배치를 거치게 되어, 단백질이 유연해짐으로서 거품 형성능이 향상된다

Table 1. Foaming capacity (FC, %) and foaming stability (FS, %) of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation according to pH-shift treatment

Sample		RPI-1 (pH 11/4.5)	RPI-2 (pH 11/5.5)	RPI-3 (pH 12/4.5)	RPI-4 (pH 12/5.5)
FC (%)	Control	114.0±3.4 <sup>ABb</sup>	100.0±0.0 <sup>Bf</sup>	115.0±17.8 <sup>ABd</sup>	119.6±1.2 <sup>Afg</sup>
	pH 2	148.8±12.6 <sup>Bd</sup>	152.6±5.2 <sup>ABbc</sup>	171.2±10.2 <sup>Ac</sup>	147.7±17.4 <sup>Bcd</sup>
	pH 4	100.0±0.0 <sup>Bd</sup>	116.8±9.2 <sup>Ade</sup>	106.7±7.8 <sup>ABd</sup>	110.7±12.5 <sup>ABg</sup>
	pH 6	127.8±3.7 <sup>ABc</sup>	153.2±31.5 <sup>ABc</sup>	129.8±4.9 <sup>ABd</sup>	128.6±5.4 <sup>ABef</sup>
	pH 7	157.8±7.7 <sup>ABc</sup>	137.6±7.8 <sup>BCcd</sup>	178.3±31.9 <sup>Abc</sup>	143.9±1.9 <sup>ABCde</sup>
	pH 8	172.3±4.6 <sup>ABc</sup>	169.4±21.8 <sup>ABCb</sup>	189.7±25.2 <sup>Aabc</sup>	162.3±6.8 <sup>ABCc</sup>
	pH 10	207.2±4.7 <sup>ABb</sup>	218.7±16.0 <sup>Aa</sup>	205.7±14.4 <sup>ABab</sup>	186.3±9.7 <sup>Bb</sup>
	pH 12	208.4±0.9 <sup>Ca</sup>	234.9±7.8 <sup>Aa</sup>	218.8±10.0 <sup>BCa</sup>	220.8±5.3 <sup>Ba</sup>
	FS 60 min (%)	Control	-	-	-
pH 2		-	37.3±4.5 <sup>Ad</sup>	21.8±7.9 <sup>Be</sup>	-
pH 4		-	-	-	-
pH 6		-	-	52.8±2.9 <sup>d</sup>	-
pH 7		62.5±3.4 <sup>Ab</sup>	50.8±5.5 <sup>Bc</sup>	55.4±2.6 <sup>Bcd</sup>	42.8±2.7 <sup>Cc</sup>
pH 8		70.9±3.0 <sup>Aa</sup>	54.0±6.7 <sup>Bc</sup>	68.4±3.4 <sup>ABab</sup>	63.3±4.1 <sup>ABb</sup>
pH 10		68.5±2.6 <sup>Ba</sup>	75.1±3.9 <sup>Aa</sup>	71.6±2.3 <sup>ABa</sup>	75.2±3.4 <sup>Aa</sup>
pH 12		62.6±2.4 <sup>Ab</sup>	63.7±4.5 <sup>Ab</sup>	61.6±2.6 <sup>Abc</sup>	57.8±9.0 <sup>Ab</sup>

RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12; -, Not detected. Data are given as mean values±SD (n=3). Means with different capital letters within same row and small letters within same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.



(Damodaran, 1997; Klompong et al., 2007). Lee et al. (2017) 과 Yoon et al. (2017)은 단백질의 농도가 높을수록 상대적으로 FC가 우수한 경향을 나타내며, 시료중의 단백질 농도가 식품기능성으로서 거품 형성에 있어 중요한 인자라고 보고한 바 있다. Intarasirisawat et al. (2012)은 효소작용에 의해 단백질분자가 단편화(fragmentation)된 어류 알 단백질 가수분해물은 가수분해로 인한 용해도가 증가함으로써 FC가 개선되었다고 하였으며, 또한 소수성(hydrophobic) 아미노산의 증가로 인해 물-공기 계면에서 급속히 흡착되어 FC가 개선된다고 보고하였다. Mutilangi et al. (1996)은 단백질의 FC는 단백질내의 소수성 잔기노출 증가나 표면장력(surface tension)의 감소를 통하여, 보다 유연성(flexibility)을 증가시킴으로써 개선된다고 하였다. 따라서 이상의 보고와 연구결과에서 넙치 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질의 거품 형성능은 알칼리 불용성획분, 진공 동결건조 농축물, 가열-건조처리 농축분말에 비해서 우수한 것으로 확인되었다. 한편 이들의 pH-shift 처리에 따른 결과에서도 어종 및 적용 pH에 대한 차이가 일부 인정되기도 하였으나, 대체로 pH 7-12구간이 pH 2-4구간에서보다 FC 및 FS에 우수하였다.

**유화 형성능**

수중 유적형(oil in water)의 EAI (m<sup>2</sup>/g protein)은 단백질 중

량(g)에 대한 안정화된 계면의 면적 단위로 표시하며, 이는 새로 생성된 유화층의 형성 및 안정성에 관여하는 단백질의 능력을 평가하는 것으로 500 nm에서 탁도에 의해 측정이 가능하다 (Pearce and Kinsella, 1978).

넙치 알로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 EAI 및 ESI은 Table 2에 나타내었다. pH-shift 처리하지 않은 대조구(controls)는 RPI-1과 3 (각각 9.2 및 8.6 m<sup>2</sup>/g protein)이 RPI-2와 4 (각각 3.7 및 2.6 m<sup>2</sup>/g protein)에 비하여 유의적으로 우수한 EAI를 나타내어(P<0.05), 알칼리 용해과정(pH 11 및 12)에 이어 분리단백질을 회수하기 위한 산 침전과정에서는 pH 4.5에서 회수한 분리단백질이 pH 5.5에서보다 우수하였다. 아울러 RPI-1과 3은 casein (7.0 m<sup>2</sup>/g protein)에 비해 우수한 반면에 hemoglobin (19.1 m<sup>2</sup>/g protein)에 비하여는 45% 수준의 EAI를 나타낼 뿐이었다(Yoon et al., 2019).

Yoon et al. (2019)과 Cha et al. (2020)은 각각 황다랑어 및 가다랑어 알로부터 등전점 용해/침전 공정에서 회수한 분리단백질의 EAI는 각각 4.2-10.0 및 3.9-15.9 m<sup>2</sup>/g protein 범위였으며, 이 실험의 넙치 RPIs가 다랑어류 알 분리단백질의 EAI와 유사한 수준이었다. Yoon et al. (2020)은 진공 동결건조 명태 알 농축물(19.5 m<sup>2</sup>/g protein)이 가다랑어(9.98 m<sup>2</sup>/g protein)에 비하여 유의적으로 우수한 EAI를 나타낸다고 하였으나, Park et al. (2016)과 Yoon et al. (2018b)은 황다랑어 및 가다랑어

Table 2. Emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation according to pH-shift treatment

Sample	RPI-1 (11/4.5)	RPI-2 (11/5.5)	RPI-3 (12/4.5)	RPI-4 (12/5.5)	
EAI (m <sup>2</sup> /g of protein)	Control	9.2±2.4 <sup>Af</sup>	3.7±1.3 <sup>Be</sup>	8.6±1.7 <sup>Ae</sup>	2.6±0.3 <sup>Bf</sup>
	pH 2	25.4±2.0 <sup>Ad</sup>	22.3±2.4 <sup>ABd</sup>	20.3±3.3 <sup>Bd</sup>	9.3±1.0 <sup>Cd</sup>
	pH 4	2.7±0.6 <sup>BCg</sup>	6.1±0.9 <sup>Ae</sup>	3.5±0.4 <sup>Be</sup>	1.7±0.3 <sup>Cf</sup>
	pH 6	15.6±1.4 <sup>Ae</sup>	18.1±4.8 <sup>Ad</sup>	20.1±4.6 <sup>Ad</sup>	5.4±0.5 <sup>Be</sup>
	pH 7	35.7±4.0 <sup>Ac</sup>	25.3±5.6 <sup>Bd</sup>	32.0±3.6 <sup>ABC</sup>	9.7±0.3 <sup>Cd</sup>
	pH 8	45.1±1.6 <sup>Ab</sup>	36.4±3.7 <sup>Bc</sup>	39.6±3.9 <sup>Bb</sup>	15.0±1.5 <sup>Cc</sup>
	pH 10	72.8±3.8 <sup>Aa</sup>	56.6±7.5 <sup>Bb</sup>	68.1±4.5 <sup>Aa</sup>	25.1±1.6 <sup>Cb</sup>
	pH 12	73.0±3.1 <sup>Aa</sup>	69.5±3.1 <sup>Aa</sup>	71.5±2.6 <sup>Aa</sup>	29.8±1.8 <sup>Ba</sup>
ESI (min)	Control	32.1±9.5 <sup>Abcd</sup>	30.0±9.3 <sup>abc</sup>	42.9±10.5 <sup>Abcd</sup>	33.3±10.5 <sup>Ade</sup>
	pH 2	17.0±2.3 <sup>BCDd</sup>	15.1±1.9 <sup>CDc</sup>	19.2±3.3 <sup>ABd</sup>	18.4±2.3 <sup>ABCe</sup>
	pH 4	38.6±6.4 <sup>Aabcd</sup>	44.7±29.5 <sup>Aabc</sup>	67.6±43.6 <sup>Aabc</sup>	63.0±21.1 <sup>Abcd</sup>
	pH 6	73.3±59.1 <sup>Bab</sup>	58.9±17.3 <sup>Bab</sup>	57.3±18.7 <sup>Babc</sup>	165.4±5.5 <sup>Aa</sup>
	pH 7	23.2±3.6 <sup>Ccd</sup>	47.1±17.9 <sup>ABab</sup>	42.0±7.3 <sup>Bbcd</sup>	87.6±31.0 <sup>Ab</sup>
	pH 8	25.9±3.8 <sup>Bcd</sup>	37.1±5.6 <sup>abc</sup>	35.6±8.1 <sup>acd</sup>	37.9±10.5 <sup>Ade</sup>
	pH 10	79.9±27.4 <sup>Aa</sup>	46.7±10.6 <sup>Bab</sup>	72.9±9.4 <sup>ABab</sup>	51.6±14.6 <sup>ABode</sup>
	pH 12	65.0±15.5 <sup>Aabc</sup>	69.7±19.3 <sup>Aa</sup>	84.2±20.1 <sup>Aa</sup>	77.7±26.4 <sup>Abc</sup>

RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12. Data are given as mean values ± SD (n = 3). Means with different capital letters within same row and small letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

알 가열-건조처리 농축분말의 EAI는 각각 2.3–2.5 및 3.1–3.7  $\text{m}^2/\text{g protein}$  범위이며, egg white (14.7–15.2  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )에 비해 현저히 낮은 EAI를 보인다고 하였다. 이상의 결과와 연구 보고에서, ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질은 가열-건조처리 농축물보다는 우수하였지만, 진공 동결건조 농축물에 비하여는 낮은 수준이었다. 또한 어류 알 가열-건조처리(Yoon et al., 2017) 및 등전점 용해/침전공정(Lee et al., 2017)에서 발생하는 가공처리수에도 0.7–3.3% 수준의 단백질이 존재하고 3.9–46.1  $\text{m}^2/\text{g protein}$  범위의 EAI를 나타내어, 이들 가공처리수를 적절히 농축하여 분말화한다면 식품기능성 소재로서의 이용가능성이 있음을 보고한 바 있다.

한편, pH-shift 처리(pH 2–12)에 따른 EAI의 변화는 pH 4에서 모두 최소의 EAI (1.7–6.7  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )을 나타내었으며, 이는 완충능, WHC, 용해도 및 FC와의 결과와도 일치하여 등전점 부근에서의 전형적인 단백질 기능성을 나타낸 것으로 확인되었다. pH 4를 제외한 pH-shift처리 전 구간에서 RPIs는 대조구에 비해 유의적으로 우수한 EAI를 나타내어 EAI 개선 효과가 인정되었다( $P < 0.05$ ). 또한 pH-shift 처리에 있어서도 RPI-1과 3이 RPI-2와 4에 비하여 전 pH구간에서 유의적으로 우수한 EAI를 나타내었으며, 이 중에서도 RPI-1이 가장 우수하였고, RPI-4가 가장 낮은 EAI를 나타내었다.

Yoon et al. (2018a)은 어류 알에서 회수한 알칼리 불용성의 단백질획분은 pH 12-shift 처리에서 18.8–30.2  $\text{m}^2/\text{g protein}$  범위로 pH-shift 처리하지 않은 대조군에 비해, 그리고 가다랑어와 황다랑어가 넙치에 비해 우수하여, 알칼리 가용화 조건 및 어종에 따라 유의적인 차이가 있다고 보고하였다. 그러나 Yoon et al. (2019)과 Cha et al. (2020)은 황다랑어 및 가다랑어 알의 분리단백질의 경우, pH 10–12구간 (31.2–55.0  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )에서의 EAI가 pH 2 (14.2–20.3  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )에 비하여 상대적으로 높은 EAI를 나타낸다고 하여, 본 연구결과와 같은 경향으로 EAI에 있어서는 상대적으로 넙치가 우수한 것으로 확인되었다.

Yoon et al. (2020)은 어류 알 진공 동결건조 농축물들은 pH 10–12에서 22.5–62.7  $\text{m}^2/\text{g protein}$ 의 EAI를 나타내었으며, 넙치가 명태 및 가다랑어에 비하여 유의적으로 우수하다고 하였다. 또한 황다랑어(Park et al., 2016)와 가다랑어 알(Yoon et al., 2018b)의 가열-건조처리 농축분말의 경우도 알칼리 pH-shift 처리에서(15.4–21.9  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )의 EAI가 산성(5.2–5.9  $\text{m}^2/\text{g protein}$ )에서보다 높은 EAI를 나타낸다고 하여, 이 실험의 결과와 유사하였다.

이상의 결과와 보고에서 pH-shift 처리에 의한 EAI는 알칼리성(pH 10–12)측이 산성(pH 2)측에서 보다 상대적으로 우수하였으며, 대체로 pH 4–6의 EAI가 대조군보다 낮은 것으로 나타나, 어류 알의 등전점 부근(pH 4–6)에서 완충능, WHC, 단백질 용해도가 최소가 되어, 단백질의 침전, 응고 또는 응집으로 인해, FC 및 유화 형성능에 영향을 미친 결과라고 판단되었다

(Yoon et al., 2023).

한편, 생성된 유화층이 유지되는 시간으로 나타난 대조구의 ESI (min)은 RPI-3이 42.9 min으로 상대적으로 안정하였으나, RPIs (30.0–42.9 min)간에 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다 ( $P > 0.05$ ). pH-shift 처리에 따른 ESI는 대조구에 비해 pH 2-shift처리 (13.2–19.2 min)에서 유의적으로 낮았으나, 그 외의 pH-shift처리에서는 EAI의 개선에 따라 유의적으로 ESI도 개선되는 것으로 확인되었다( $P < 0.05$ ). 반면에 pH 12-shift 처리(26.4–84.2 min)에서는 EAI의 증가에 따른 ESI에 있어서도 유의적인 증가를 나타냄으로써, pH-shift 처리에 따른 단백질 구조의 변화가 알칼리측 pH에서 산성측보다 활발히 일어난 결과를 반영한 것이라 추정되었다.

pH-shift 처리에 따른 유화형성능에 관한 보고에서, Yoon et al. (2018a)은 15  $\text{m}^2/\text{g protein}$  이상의 EAI를 나타내는 알칼리 불용성 단백질획분(pH 12-shift)에서 넙치 26.4–28.9 min, 가다랑어 24.4–31.5 min 그리고 황다랑어 23.5–26.3 min 범위로 어종 간 ESI의 차이는 인정되지 않았다고 하였다. 그러나 황다랑어(Yoon et al., 2019) 및 가다랑어 알(Cha et al., 2020)의 분리단백질은 30  $\text{m}^2/\text{g protein}$  이상의 EAI를 보이는 pH 10–12구간에서의 ESI가 각각 27.5–127.2 min 및 18.0–33.6 min으로, 황다랑어 알 분리단백질의 안정성이 가다랑어 알에 비해 상대적으로 우수하였다.

Park et al. (2016)은 15  $\text{m}^2/\text{g protein}$  이상의 EAI를 보이는 황다랑어 알 가열-건조 농축분말의 ESI는 18.2–20.3 min 그리고 positive control로서 egg white (16.3–26.2  $\text{m}^2/\text{g of protein}$ )의 경우 20.2–26.3 min의 ESI를 나타낸다고 하였으며, 가다랑어 알 가열-건조 농축분말(Yoon et al., 2018b)의 경우는 18.1–20.1 min이라고 보고하였다. 이에 비해 hemoglobin은 pH-shift 처리에 상관없이 16.1–20.8  $\text{m}^2/\text{g protein}$ 의 EAI와 16.6–21.2 min의 ESI를 나타내어 주변 환경변화에 따른 단백질의 구조가 안정하여, 완충능, WHC, 용해도 및 FC를 비롯한 유화형성능의 결과에서도 이러한 단백질의 성질이 반영된 것으로 판단되었다 (Park et al., 2016; Cha et al., 2020). 이 연구의 RPIs가 어류 알 가열-건조 농축분말, 알칼리 불용성 단백질획분 및 hemoglobin에 비해 상대적으로 ESI가 우수하였다(Park et al., 2016; Yoon et al., 2018a, 2019; Cha et al., 2020).

### 항산화 및 항고혈압 활성

이상의 연구결과로부터, ISP 공정을 통해 회수한 4종의 넙치 알 분리단백질 중에서 RPI-3은 완충능, 단백질 용해도, 거품 및 유화형성능과 같은 식품기능성이 다른 RPIs에 비해 유사하거나 우수한 것으로 확인됨으로써, 4% (w/v) RPI-3 분산액에 대하여 항산화성 및 항고혈압 활성과 같은 생리활성에 대해 검토한 결과는 Table 3과 같다. 4% 분산액의 단백질농도는 2.5  $\text{mg/mL}$ 이었으며, 친수성(hydrophilic) 및 친유성(oleophilic) 화합물 모두에 적용할 수 있어 항산화활성의 측정에 널리 활용

(You et al., 2010)되는 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성(IC<sub>50</sub>, µg protein/mL)은 102.7 µg/mL이었다. 이 연구의 RPI-3는 Yoon et al. (2020)의 진공 동결건조 어류 알 농축물(130–180 µg/mL) 및 Cha et al. (2020)의 가다랑어 알 분리단백질(103 µg/mL), 그리고 Kim et al. (2016)의 새우가공부산물(160–170 µg/mL)에 비해 우수하였으나, Yoon et al. (2023)의 넙치 알 농축물(60.4 µg/mL), Yoon et al. (2019)의 황다랑어 알 분리단백질(83 µg/mL), Lee et al. (2017)의 어류 알 분리단백질의 회수에 사용된 가공처리수(33–97 µg/mL) 그리고 Yoon et al. (2017)의 어류 알 물 추출물(28–45 µg/mL) 및 자숙수(55–110 µg/mL)에 비하여는 유사하거나 낮은 소거활성을 나타내었다(Yoon et al., 2023).

최근 미백효과 또는 과도한 색소침착의 예방과 관련하여 의약 및 화장품 산업에서 tyrosinase inhibitor에 대한 관심이 증가하고 있다(Schurink et al., 2007; Choi et al., 2011). 이러한 일면에서 이 연구의 RPI-3에 대한 tyrosinase 저해활성(%)은 29.3% 수준으로 확인되었다. 어류 알의 tyrosinase 저해활성에 관한 연구에서 가다랑어 알(Cha et al., 2020) 및 황다랑어 알(Yoon et al., 2019) 분리단백질, 그리고 넙치 알 농축물(Yoon et al., 2023)은 저해활성이 거의 없는 것으로 보고한 바 있다. 또한 어류 알 물 추출물의 경우 7.5–14.2% 범위의 저해활성이 있으며, 이의 가열처리 자숙수(0.4–2.5%)에는 저해활성이 거의 없다고 하여, tyrosinase 저해성분은 열에 불안정하다고 보고하였다(Yoon et al., 2017). 그러나 감마선 조사에 따른 참치 자숙수(Choi et al., 2011)의 tyrosinase 저해활성은 31%이며, 감마선 노출정도에 따라 저해활성은 증가한다는 보고, 어류 알 분리단백질 가공 중에 발생하는 가공처리수(Lee et al., 2017)에는 14.6–20.8% 범위, 그리고 아임계수 가수분해에 의한 멸치 가수분해물(Choi et al., 2017)에는 14.7%의 tyrosinase 저해활성을 나타내어 미백효과가 일부 인정된다고 하였다. 이 연구결과와 보고를 통해 tyrosinase 저해활성은 단백질이나 peptide를 포함하는 단백질성 물질에서도 확인되었으나, 그 저해활성은 30% 미만으로 강하지 않은 것으로 나타났다. 이러한 넙치 알 분리단백질의 항산화 활성은 원료의 열처리, 산 및 알칼리 처리 여부, 감마선 조사, 효소처리 등 처리조건 및 방법에 따라, 단백질 구

성분인 아미노산 및 peptide의 조성, peptide의 길이 및 소수성 등과 밀접한 관련이 있으며, 이러한 차이가 라디칼 소거활성에 영향을 주는 것으로 추정되었다(Wu et al., 2003).

이 연구의 4% RPI-3 분산액(2.5 mg protein/mL)에 대한 ACE 저해활성은 30.8%이었다. 황다랑어 알(35.7%; Yoon et al., 2019) 및 가다랑어 알(44.0%; Cha et al., 2020) 분리단백질에 비해 다소 낮은 저해활성을 나타내었으며, 넙치 알 가열처리 농축물(80.9%; Yoon et al., 2023)에 비하여는 현저히 낮은 수준이었다. 또한 IC<sub>50</sub> (mg/mL)으로 ACE 저해활성은 어류 알 진공 동결건조 농축물(Yoon et al., 2020)이 0.92–1.89 mg/mL 범위로, ISP 공정을 통해 회수한 어류 알 분리 단백질은 이들의 동결 또는 가열-건조처리 농축물들에 비해 항고혈압 활성은 전반적으로 낮은 수준으로 분리단백질에 비해 농축물이 ACE 저해활성이 우수하다고 하였다(Yoon et al., 2020, 2023). 어류 알 가열-건조처리 가공처리수(Yoon et al., 2017) 그리고 분리단백질 회수를 위해 사용한 알칼리/산 가공처리수(Lee et al., 2017)의 IC<sub>50</sub>은 1.2–2.0 mg/mL 범위라고 하여, 이 연구 결과에 비해 상대적으로 우수한 저해활성을 나타내었으며, 이는 가공공정에서 저분자의 단백질성분 가공처리수로 이행한 결과라고 추정되었다.

한편, skate 껍질 젤라틴(Ngo et al., 2014), 가다랑어 알 가수분해물(Intarasirisawat et al., 2012, 2013, 2014) 그리고 대구 껍질 젤라틴 가수분해물(Himaya et al., 2012)은 35%–86%의 ACE 저해활성을 나타내어, 이 연구결과에 비해 대체로 우수하였다. 이상의 연구결과와 보고에서 어류 알 분리단백질은 이의 농축물에 비해 항산화 및 항고혈압 활성이 유사하거나 다소 낮은 것으로 확인되어, 이는 단백질의 기원 및 가공 처리방법에 따른 차이에 기인하는 것으로 판단되었고, 단백질 및 식품기능성 강화를 위한 수산가공 및 식품가공 소재로 활용이 가능할 것으로 기대되었다.

## 사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(PJT200885, 해역별 특성을 고려한 전통 수산가공식품 개발 및 상품화).

## References

- Alvarez C, Lelu P, Lynch SA and Tiwari BK. 2018. Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. LWT Food Sci Technol 88, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.045>.
- Azadian M, Nasab MM and Abedi E. 2012. Comparison of functional properties and SDS-PAGE patterns between fish protein isolate and surimi produced from silver carp. Eur Food Res Technol 235, 83–90. <https://doi.org/10.1007/>

Table 3. *In vitro* bioactivities of protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe using isoelectric solubilization and precipitation

Sample	Protein <sup>1</sup> (mg/mL)	ABTS <sup>+</sup> , IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Tyrosinase inhibition (%)	ACE inhibition (%)
RPI-3	2.5±0.1	102.7±1.5	29.3±1.4	30.8±2.0

<sup>1</sup>Protein concentration of the supernatant of 4% RPI-3 dispersion (w/v) after centrifugation. ABTS<sup>+</sup>, 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging activity; IC<sub>50</sub>, The half maximal inhibitory concentration; ACE, Angiotensin-I-converting enzyme. Values represent the mean±SD of n=3.

- s00217-012-1721-z.
- 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 PGP 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, 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>.
- Choi JI, Kim JH and Lee JW. 2011. Physiological properties of tuna cooking drip hydrolysate prepared with gamma irradiation. *Process Biochem* 46, 1875-1878. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.005>.
- Choi JS, Jang DB, Moon HE, Roh MK, Kim YD, Cho KK and Choi IS. 2017. Physiological properties of *Engraulis japonicus* muscle protein hydrolysates prepared by subcritical water hydrolysis. *J Environ Biol* 38, 283-289. <https://doi.org/10.22438/jeb/38/2/MRN-973>.
- Damodaran S. 1997. Protein-stabilised foams and emulsions. In: *Food Proteins and Their Applications*. Damodaran S and Paraf A, eds. Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A., 57-110. <https://doi.org/10.1080/10408398109527315>.
- Dong FD and Bechtel P. 2010. New Fish Feeds Made from Fish Byproducts. Retrieved from <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/oct10/leftovers1010.htm> on 24 Feb, 2019.
- Galla NR. 2013. Physico-chemical, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates from *Cyprinus carpio* and *Epinephelus tauvina*. *J Food Pharm Sci* 1, 81-88.
- Galla NR and Dubasi GR. 2010. Chemical and functional characterization of gum karaya (*Sterculia urens L.*) seed meal. *Food Hydrocoll* 24, 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.12.003>.
- 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>.
- Guerard F, Decourcelle N, Sabourin C, Floch-Laiet C, Le Grel L, Le Floch P, Gourlay F, Le Delezir R, Jaouen P and Bourseau P. 2010. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. *J Sci Hal Aquat* 2, 21-27.
- 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 B 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>.
- Hultin HO and Kelleher SD. 2011. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. US Patent No. 6,288,216 B1, Advanced Protein Technologies Inc., Ipswich, MA, U.S.A.
- 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.foodchem.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>.
- Kadam SU and Prabhasankar P. 2010. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Res Int* 43, 1975-1980. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.007>.
- Kang KT, Heu MS, Jee SJ, Lee JH, Kim HS and Kim JS. 2007b. Food component characteristics of tuna livers. *Food Sci Biotechnol* 16, 367-373.
- Kang SI, Kwon IS, Yoon IS, Choe YR, Lee JS, Kim JS and Heu MS. 2023. 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>.
- Karaca AC, Low N and Nickerson M. 2011. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res Int* 44, 2742-2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
- Kim JS, Cho MR and Heu MS. 2000. Preparation off calcium powder from cooking skipjack tuna bone and its characteris-

- tics. J Korean Fish Soc 33, 158-163.
- 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>.
- Kinsella JE and Melachouris N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. Crit Rev Food Sci Nutr 7, 219-280. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- 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. <http://dx.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. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
- Kristinsson HG, Theodore AE, Demir N and Ingadottir B. 2005. A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. J Food Sci 70, C298-C306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07177.x>.
- 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>.
- 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. 2016. Preparation and characterization of protein isolate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* roe by isoelectric solubilization/precipitation process. Fish Aquat Sci 19, 14. <http://dx.doi.org/10.1186/S41240-016-0014-Z>.
- 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. <http://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.
- 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>.
- Mohamed BKF, Xia W, Issoufou A and Qixing J. 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>.
- Mohan M, Ramachandran D and Sankar TV. 2006. Functional properties of rohu (*Labeo rohita*) proteins during iced storage. Food Res Int 39, 847-854. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.003>.
- Mohan M, Ramachandran D, Sankar TV and Anandan R. 2007. Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*). Process Biochem 42, 1056-1062. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.005>.
- 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>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.067>.
- 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>.
- Pearce KN and Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins. Evaluation of a turbidimetric technique. J Agric Food Chem 26, 716-723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>.
- Schurink M, van Berkel WJ, Wichers HJ and Boeriu CG. 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. Peptides 28, 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>.
- Sikorski ZE and Naczki M. 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrates. Crit Rev Food Sci Nutr 14, 201-230. <https://doi.org/10.1080/10408398109527305>.
- Tan ES, Ngho YY and Gan CY. 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. Food Chem 152, 447-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.008>.
- Wu HC, Chen HM and Shiau CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Res Int 36, 949-957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2).
- 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. <https://doi.org/10.5657/>

KFAS.2020.0403.

- Yoon IS, Kim JS and Heu MS. 2018a. Food functionality of collagenous protein fractions recovered from fish roe by alkaline solubilization. *Korean J Fish and 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 Nutri* 7, 412-424. <https://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>.
- You L, Zhao M, Regenstein JM and Ren J. 2010. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Res Int* 43, 1167-1173. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.009>.