

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 알로부터 등전점 용해/침전공정에 의해 회수한 분리단백질의 식품특성

강상인 · 권인상¹ · 김형준² · 윤인성 · 최유리 · 이정석 · 김진수 · 허민수^{1*}

경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ¹경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소, ²식품의약품안전처

Food Characteristics of Protein Isolates Recovered from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Roe by Isoelectric Solubilization and Precipitation Process

Sang in Kang, In Sang Kwon¹, Hyeung Jun Kim², In Seong Yoon, Yu Ri Choe, Jung Suck Lee, Jin-Soo Kim 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

²Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Republic of Korea

Four roe protein isolates (RPIs) from olive flounder *Paralichthys olivaceus* roes (OFR) were recovered by isoelectric solubilization (pH 11 and 12) and precipitation (pH 4.5 and 5.5) and investigated for their food characteristics. RPIs contained 4.5–9.6% moisture, 64.1–69.5% protein, 16.1–19.8% lipid, and 1.0–3.9% ash. The protein yields of RPIs ranged from 50.1 to 56.8%, which was significantly different depending on the recovery conditions. A difference was observed in the SDS-PAGE protein band (25–100 kDa) between the alkaline solubilization at pH 11 (RPI-1 and 2) and pH 12 (RPI-3 and 4). The major amino acids of RPIs were Leu, Lys, Asp, Glu and Ala and major mineral components were sulfur, sodium, phosphorus, and magnesium, which were significantly different from OFR ($P < 0.05$). Additionally, the lead and cadmium content was below the chemical hazard standard of the Korean food standards code. The Hunter color and whiteness of RPIs also showed significant differences according to the treatment conditions of the ISP process ($P < 0.05$). This suggests that protein isolates recovered from olive flounder roes have high potential as nutritional supplements.

Keywords: Olive flounder, Roe protein isolates, Isoelectric solubilization/precipitation, Food characteristics

서론

유엔식량농업기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)에 따르면, 2018년 총 어업생산량은 약 1.8억톤이며(FAO, 2020), 최근 10년(2009–2018)간, 우리나라의 총 어업생산량은 평균 327만톤 수준이다(MOF, 2019). 이들 어업생산물의 가공 및 제품 제조 시 발생하는 머리, 껍질, 프레임, 비늘, 지느러미, 내장, 알 그리고 폐각 등의 가공부산물은 총 어류 생산량의 약 30–60%를 차지하여(Galla, 2013; Klomklao

and Benjakul, 2016), 세계적으로는 약 8천만톤, 그리고 우리나라는 연간 약 120만톤 이상의 가공부산물이 발생하고 있다. 아울러 가공과정 중에서 사용하는 세척수 및 자숙수와 같은 가공처리수들이 원료 처리량의 약 10배 이상 발생한다(Kang et al., 2007; Lee et al., 2017; Yoon et al., 2017). 이러한 수산가공부산물들은 단백질과 지질의 영양원이지만, 어분(fish meal)이나 어유(fish oil) 등으로 질소비료용어나 동물사료용으로 일부분만이 이용될 뿐이며(Dong and Bechtel, 2010), 세척수 및 자숙수 등 가공처리수와 함께 대부분 폐기됨으로서 환경문제를 야기하게

*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.2023.0162>

Korean J Fish Aquat Sci 56(2), 162-173, April 2023

Received 3 February 2023; Revised 1 March 2023; Accepted 28 March 2023

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

된다(Galla et al., 2012).

등전점 용해/침전(isoelectric solubilization/precipitation, ISP) 공정은 수산 및 육상동물의 가공 시 발생하는 가공부산물로부터 단백질의 회수율을 높일 수 있는 처리방법이다. 이 ISP 공정은 1999년에 미이용/저활용 어류 원료(dark muscle fish 및 fatty fish)와 그 부산물(fish cutoffs 및 fish frame 등)로부터, 기능성 분리단백질(protein isolates)을 경제적으로 생산하고자 개발된 기술이다(Hultin and Kelleher, 2001). 즉, 다양한 원료로부터 알칼리 용해과정을 통해 단백질 성분을 가용화한 후, 이어 산 침전의 공정을 통해 단백질의 용해도가 최소가 되는 등전점 부근에서 단백질을 회수하는 방법이다(Lee et al., 2016b; Alvarez et al., 2018). 이와 같은 ISP 공정의 장점은 기계적으로 분리가 어려운 뼈와 껍질에 붙은 단백질 성분을 알칼리 또는 산으로 용해하여, 밀도가 서로 다른 오염물질을 중력에 의한 원심분리를 통해 제거가 가능하고, 알칼리-산 가용화 과정을 통해 sarcoplasmic proteins, hemoglobin, myoglobin, proteolytic enzymes 등 다른 단백질 성분의 회수가 가능함으로써 단백질의 회수율을 높일 수 있다는 점이다(Kinsella and Melachouris, 1976; Kim et al., 2003). 이 과정에서 중성지질과 막 지질의 감소로 지질 산화의 위험성이 줄어들어, 보관안정성을 연장시키는 효과가 있다. 이외에도 원료처리량에 대해 약 10배량에 해당하는 가공처리수를 사용하는 수리미(surimi) 생산 공정과 비교해서, 고형물, 질소함량 및 화학적 산소요구량이 감소시킴으로써 환경오염을 줄일 수 있다(Park et al., 2003).

이러한 장점을 가진 ISP 공정을 활용한 연구들에는 Undeland et al. (2002)은 herring *Clupea harengus* light muscle의 기능성 단백질의 회수에 알칼리-산 가용화 공정을 이용하였으며, Palafox et al. (2009)은 pH-shift 공정을 이용한 jumbo squid *Dosidicus gigas*의 분리단백질에 대해, Chaijan et al. (2010)은 short-bodied mackerel *Rastrelliger brachysoma*의 분리 단백질의 회수에 대해 보고한 바 있다. 또한 어류(Chen and Jaczynski 2007; Tahergorabi et al., 2012a), 닭(Tahergorabi et al., 2012b), 소(DeWitt et al., 2002)의 가공부산물로부터 회수된 분리단백질에는 지질의 감소가 현저하였으며, 회수된 분리단백질은 기능적 특성과 영양성분이 유지되었다고 하였다. 이 ISP 공정을 통해 회수된 분리단백질은 기존의 수리미 제조공정을 통해 얻어진 수리미보다 일부 겔 형성능에 있어 우수하다고 하였다(Kristinsson et al., 2005; Chaijan et al., 2010). 이외에도 legumes (Horax et al., 2004), oilseeds (Horax et al., 2011), cereals (Agboola et al., 2005; Paraman et al., 2007) 그리고 어류 단백질(Azadian et al., 2012)을 포함한 다양한 단백질 기원으로부터 단백질의 용해도에 기초한 분리단백질의 회수에 대한 보고가 있다.

따라서 수산가공부산물로부터 주요 구성성분인 단백질을 회수하고자 하는 노력은 산업적 이용을 위한 저비용의 단백질소재를 생산하는 것이 가능하기 때문에 매우 중요하다(Heu et al.,

2006; Kang et al., 2015; Lee et al., 2016b, 2017; Yoon et al., 2017). 이 연구에서는 다소비 양식어종으로 잠재적으로 활용 가치가 높은 수산가공 부산물인 넙치 알을 대상으로 식품소재 또는 단백질 강화소재로서의 활용을 위하여 ISP 공정을 통해 회수한 분리단백질의 식품학적 특성에 대하여 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

넙치 알(olive flounder *Paralichthys olivaceus* roe, OFR)는 2020년 4월 통영시 소재 수산시장에서 살아있는 넙치를 구입하여, 실험실로 운반한 후, 알을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 OFR은 흐르는 물에 간단히 수세한 후, 파우치형 티백(tea bag, polyethylene polypropylene, 16×14.5 cm; Tea & Chemical Electronics Co., Ltd., Gimpo, Korea)에 300 g씩 나누어 밀봉상태로 분리단백질의 제조에 사용할 때까지 -55°C에서 보관하였다.

OFR로부터 등전점 용해/침전 공정을 통한 분리단백질의 제조

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 넙치 알 분리단백질(roe protein isolates, RPIs)의 제조는 Lee et al. (2016b)의 방법에 따라 제조하였다. 일정량의 동결상태로 보관한 OFR은 부분해동(4°C, 12 h)하고, 여기에 6배량의 탈이온수를 가해, 균질기(POLYTRON® PT 1200E; KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland)로 25,000 rpm에서 5 min 동안 균질화하였다. 이들 균질액은 2 N sodium hydroxide 용액을 사용하여 각각 pH 11 (35–36 mL, 최종농도 4.9 mM) 및 12 (43 mL, 최종농도 5.9 mM)로 조절하였다. 각각의 목적 pH로 조절하여, 용해과정이 4°C에서 1시간 동안 이루어지도록 한 다음, 이어서 냉동원심분리기(Supra 22K; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)를 사용하여 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min)하였다. 이어서 원심분리 상층액(pH 11 및 12의 알칼리 가용성획분)으로부터 산 침전과정을 통한 RPIs의 제조는 2 N HCl을 가하여 어류 단백질의 등전점 부근(pH 4–6; Perez-Mateos et al., 2004; Yongsawatdigul and Park, 2004; Chaijan et al., 2010)인 pH 4.5와 5.5로 재조정된 다음, 목적 pH로 조정된 현탁액을 원심분리(12,000 g, 4°C, 30 min)하였다. 이들 원심분리 잔사가 ISP 공정의 처리조건을 통해 회수한 RPIs로서 알칼리 용해 및 산 침전과정을 통해 생성된 NaCl의 제거를 위해 추가적인 수세과정을 진행하였다. 이렇게 수세한 RPIs는 동결건조하여 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. ISP 공정을 통해 회수한 RPIs는 일정량씩 소분하여 용기에 담아 보관(-20°C)하면서 분석실험에 사용하였다. Fig. 1은 OFR로부터 회수한 RPIs의 제조공정을 나타낸 것이다.

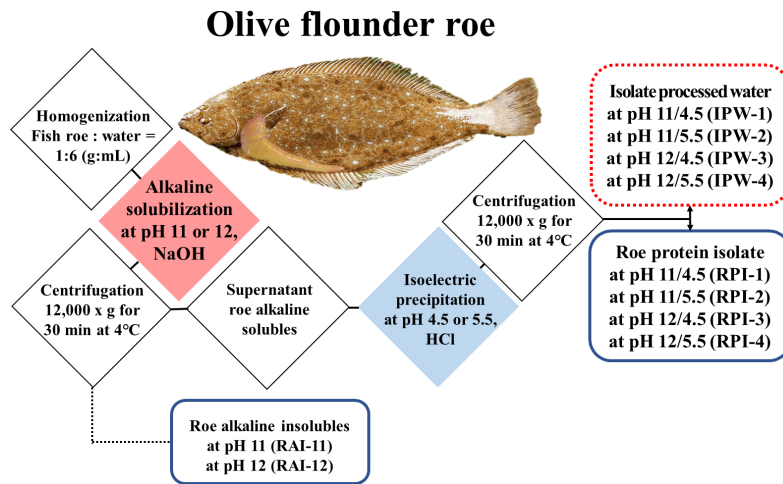


Fig. 1. Production process of roe protein isolates (RPIs) from olive flounder *Paralichthys olivaceus* by isoelectric solubilization and precipitation process.

단백질 분자량 분포

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 단백질 분자량 분포는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분석하였다. 먼저, 시료(10 mg)는 1 mL의 2% β -mercaptoethanol (v/v) 및 2% sodium dodecyl sulfate (w/v)를 함유하는 8 M urea 용액과 혼합하여 용해하였다. 이 용액에 SDS-PAGE 시료조제용 완충액($\times 5$ sample buffer, pH 6.8; Bio-Rad Lab., Inc., Hercules, CA, USA)과 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후, 100°C에서 3분 동안 가열하여 전기영동 시료를 조제하였다. 이렇게 준비한 시료(20 μ g의 단백질)는 10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast gel에 주입하고, Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, USA)에 장착한 다음, 일정한 전류(10 mA per gel)를 통하게 하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 겔은 0.125% (w/v) coomassie brilliant blue R-250 용액에 15분간 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 kDa; Bio-Rad Lab., Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 확인하였다.

일반성분

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 수분(No. 950.46), 회분(No. 920.153), 조단백질(No. 928.08) 및 조지방 함량(No. 960.39)을 분석하여 시료 100 g에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

수율

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 수율(Yield, g)은

100 g의 OFR로부터 얻어진 RPIs의 중량으로 나타내었으며, 이들의 단백질 수율(protein yield, g)은 수율(g)에 단백질 함량(%)을 곱하여 나타내었다.

단백질 농도

단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준단백질로서 bovine serum albumin을 사용하여 구한 검량선을 통해 측정하였다.

총 아미노산

총 아미노산 분석은 AOAC (2005) 법에 따라 측정하였다. 즉, 각 시료(20 mg)는 2 mL의 6 N 염산과 혼합 및 밀봉한 후, 110°C의 정온가열기(HF21; Yamoto Science Co, Tokyo, Japan)에서 24시간 동안 가수분해를 실시하였다. 각 시료의 산 가수분해물은 glass filter를 장착한 감압여과장치(Aspirator A-3S; EYELA, Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 이를 구연산나트륨 완충액(pH 2.2)를 이용하여 50 mL로 정용하였다. 이렇게 제조한 시료는 0.2 μ m syringe filter (13HP020AN, hydrophilic type; AVANTEC, Tokyo, Japan)로 여과하여 아미노산 분석기(model 6300, Biochrom 30; Biochrom Ltd., Cambridge, UK)로 총아미노산을 분석하였으며, 분석 결과는 100 g의 단백질에 대한 개별 아미노산의 조성비(%)로 나타내었다.

무기성분

RPIs의 무기질 및 중속금 함량은 유도결합 플라즈마 분석기(inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer, Optima 4300 DV; Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)로 분석하였다. 즉, 테프론 분해용기에 1 g의 시료를 담아 10 mL의 중속금 분석용 고순도 70% (v/v) 질산을 가해 시료가 완전히 분해될 때까지 hot plate에서 가열하였다. 가열 분해한 시료에 5

mL의 2% 질산을 가하고, 여과지(Advantec No. 2; Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 다음, 2% 질산으로 최종 100 mL로 정용하여, 이를 분석에 사용하였다. 무기질 및 중금속의 함량은 각각 mg/100 g sample 및 mg/kg sample로 나타내었다.

Hunter's color

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 색차는 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 갈색도(brownness, b)에 대해 직시색차계(ZE-2000; Nippon Denshoku Industries Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 색차를 측정 전에 보정용 white plate (L=96.92, a= -0.38, b=0.64)를 이용하여 보정하였다. 또한 백색도는 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{Whiteness} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

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 분산분석을 실시하고, Duncan의 다중위 검정법으로 최소유의차검정(P<0.05)을 실시하였다.

결과 및 고찰

식품성분

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 식품성분 분석 결과는 Table 1과 같다.

OFR로부터 알칼리 용해과정(pH 11 및 12)에 이어서 산 침전과정(pH 4.5 및 5.5)로부터 회수한 분리단백질은 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 표시하고, 이들의 겔보기 수율은 원료 100 g에 대해 pH 4.5의 산 침전공정을 거친 RPI-1과 3이 13.2 g으로 pH 5.5의 산 침전공정을 거친 RPI-2와 4 (12.6 및 12.9 g)에 비하여 상대적으로 높은 수율을 나타내었으며, 이때의 단백질 수율은 8.1–9.2 g/100 g수준으로 OFR 단백질의 50.0–56.8%가 회수되었다.

Yoon et al. (2018a)은 OFR의 알칼리 불용성획분은 원료에 대해 3.5–3.7 g/100 g이었으며, 이때의 단백질 수율은 2.7 g/100 g으로, OFR 단백질의 16.0–16.7%가 불용성 단백질이라고 하였다. 또한 가다랑어 알의 알칼리 불용성획분은 회수율이 7.1–9.5 g/100 g이며, 이때의 단백질 수율은 5.6–6.8 g /100 g으로, 70% 이상이 단백질로서 단백질 강화소재로의 이용가능성이 있다고 하였다. 이 연구의 ISP 공정에서 약 50%가량 회수하지 못한 단백질은 알칼리 용해과정에서 생긴 불용성잔사(Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2018a)와 산 침전과정에서 가공처리수에 용해되어 있는 저분자의 가용성 단백질 성분(Lee et al., 2017)이라고 추정되었다.

RPIs의 수분함량(%)은 4.5–9.6% 범위였으며, 단백질 함량은 64.1–69.5% 범위로 pH 12에서 진행한 알칼리 용해과정(RPI-3 및 4)의 분리단백질이 pH 11에서의 경우보다 조단백질 함량이 유의적으로 높았으며(P<0.05), RPI-3 (pH 12/4.5)이 RPIs 중에서 가장 높은 단백질 함량을 나타내었다. 조지방 함량의 경우, RPIs는 16.1–19.8% 범위로서, 알칼리 용해과정에 이어서 pH 5.5의 산 침전과정이 pH 4.5에서보다 조지방 함량이 유의적으로 높은 것으로 나타나, 이는 원료 알의 지방성분이 알칼리 용해과정에서 비누화(saponification)와 산 침전과정에서 부분적 용해가 상대적으로 낮은 pH (4.5)에서 많이 일어난 것에 기인하는 것으로 추정되었다. 또한 회분의 경우, RPI-1 및 2 (3.9 및 3.6%)가 RPI-3 및 4 (1.0 및 1.5%)에 비하여 유의적으로 높은 함량을 나타내었으며, pH 12의 알칼리 용해과정에서 보다 많은 양의 양하전을 띤 무기질성분들이 음하전을 띤 성분과 반응하여 ISP 공정의 가공처리수로 이행되었음을 의미하였다. OFR의

Table 1. Yield and proximate composition (g/100 g sample) of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* by isoelectric solubilization and precipitation process

Sample	Yield		Proximate composition (%)			
	Yield ¹ (g)	Protein yield ² (g)	Moisture	Protein	Lipid	Ash
OFR ³	100.0	16.2	76.7±0.2 ^a	16.2±0.0 ^e	4.4±0.1 ^c	1.2±0.1 ^{bc}
RPI-1 (pH 11/4.5)	13.2	8.7	9.6±0.0 ^b	66.2±0.8 ^c	16.2±2.1 ^b	3.9±0.3 ^a
RPI-2 (pH 11/5.5)	12.6	8.1	7.7±0.8 ^c	64.1±0.4 ^d	19.6±0.4 ^a	3.6±0.5 ^a
RPI-3 (pH 12/4.5)	13.2	9.2	8.1±0.3 ^c	69.5±0.4 ^a	16.1±0.2 ^b	1.0±0.1 ^{bc}
RPI-4 (pH 12/5.5)	12.9	8.9	4.5±1.3 ^d	68.7±0.3 ^b	19.8±0.1 ^a	1.5±0.3 ^b

¹Yield is weight (g) of each samples obtained from 100 g of raw OFR. ²Protein yield (g)=yield×protein (%). ³Quoted from Kwon et al. (2022). OFR, Olive flounder roe; RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusted to pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusted to 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 column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

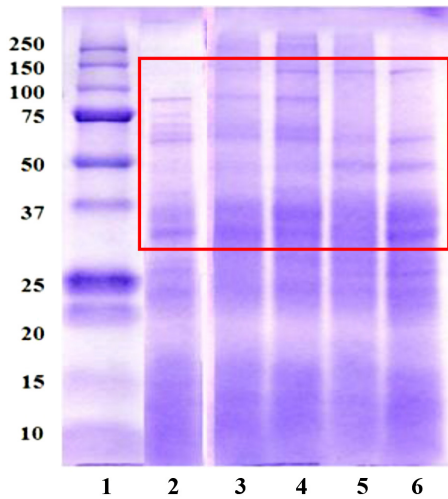


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* using isoelectric solubilization and precipitation process. Lane 1, Protein maker; Lane 2, Olive flounder roe; Lane 3-4, RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; Lane 5-6, RPI-3 and RPI-4 roe protein isolate adjusting at pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12.

조지방(4.4%)과 회분(1.2%)에 비하여, 각 RPIs의 지방 수율은 2.1–2.9% 범위 그리고 회분수율이 0.2–0.5% 범위로 나타나 각각 50%내외의 지방과 42–83%의 회분 함량이 감소함으로써, ISP 공정 중에 가공처리수로 이들 성분이 이행함에 따른 결과이며, 분리단백질의 제조에 있어 지방성분과 무기질성분의 제거에 효과적인 방법인 것으로 확인되었다(Pires et al., 2012; Lee et al., 2016b, 2017).

Lee et al. (2016b)은 황다랑어 알 분리단백질의 수율은 11.6–14.1% 범위, 조단백질 함량은 79.1–87.8% 범위이며, ISP 공정조건에 따라 단백질 수율(9.7–11.1 g)에서 유의적인 차이를 나타내어, pH 12/4.5 조건의 ISP 공정이 우수하다고 하였다 ($P < 0.05$). 또한 Cha et al. (2020)은 가다랑어 알에서 회수한 분리단백질이 10.3–13.0%의 겔보기 수율과 7.8–9.2 g/100 g의 단백질 수율로, 이때의 단백질 회수율은 54.2–68.4%이며, pH 12/4.5와 5.5의 ISP 공정이 단백질 회수율 면에서 우수하다고 하여, 이 실험의 결과와 유사한 경향이었다. 아울러 이 연구의 RPIs는 다양한 어류 단백질 분말 arrowtooth flounder (Sathivel et al., 2004), herring (Sathivel et al., 2004), salmon (Sathivel et al., 2006) 그리고 Alaska pollock (Sathivel and Bechtel, 2006) 보다는 우수하였으며, 어류 알(Sathivel et al., 2009) 또는 surimi (Huda et al., 2001)로 제조한 단백질 분말과는 단백질 함량에 있어서 유사한 경향이었다.

이상의 결과와 연구보고에 비추어, OFR에서 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs는 단백질의 회수율 측면에서 pH 12에서의 알

칼리 용해과정(alkaline solubilization)을 거친 다음, pH 4.5에서 산 침전과정(acid precipitation)을 행하는 조건이 유리할 것으로 판단되었다.

단백질 분자량 분포

OFR 및 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 SDS-PAGE에 의한 단백질분자량 분포는 Fig. 2에 나타내었다. OFR (Lane 2)은 100–75 kDa에서 3개, 75–50 kDa에서 2개, 그리고 50–25 kDa에서 5개로 모두 10개의 단백질 밴드의 분포를 확인할 수 있었다. RPIs의 단백질분포(Lane 3-6)는 150–100 kDa 범위에서 1개, 75–50 kDa 범위 1개, 50–37 kDa 범위에서 1개의 희미한 단백질밴드가 관찰되었고, 37–25 kDa 범위에서 3개와 25–20 및 15–10 kDa 범위에서 보다 진한 단백질 분포가 관찰되었다. ISP 공정의 처리조건 간에는 RPI-3 및 RPI-4가 50–37 및 37–25 kDa 범위의 단백질분포에서 RPI-1 및 RPI-2와 일부 차이가 확인되었다. 100–75 kDa 범위에서 관찰된 단백질 밴드는 skipjack, tongol 및 bonito 알(Intarasirisawat et al., 2011), salmon 및 sturgeon roes (Al-Holy and Rasco, 2006), 그리고 egg yolk (DeMan, 1999)에서 확인된 97 kDa의 단백질 분자량을 갖는 vitellin like protein, 50–37 kDa 범위와 15 kDa 부근의 단백질 밴드는 각각 actin, troponin-T 및 myosin light chain (MLC)으로 추정되었다(Intarasirisawat et al., 2011).

총 아미노산

OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 총 아미노산 조성(g/100 g protein, %)은 Table 2에 나타내었다. OFR 및 RPIs의 건조중량으로 환산한 단백질 함량은 69.4–78.1%로써, 우유와 송아지 혈액의 분리단백질인 casein (89.1%)과 hemoglobin (96.4%)에 비하여 낮은 수준이었다(Lee et al., 2016b). OFR로부터 ISP공정을 통해 회수한 분리단백질 RPIs의 건조중량에 대한 단백질 함량은 RPI-3 (75.6%, pH 12/4.5)이 다른 RPIs보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었으며($P < 0.05$), 이들의 주요 아미노산(7% 이상)은 필수아미노산에서 Leu 및 Lys 그리고 비필수 아미노산에서는 Asp, Glu 및 Ala로서, OFR의 알칼리성 불용성 획분과는 아미노산 조성과 조성비에서 확연한 차이를 나타내었다(Lee et al., 2017).

황다랑어 알로부터 회수한 분리단백질은 ISP 공정의 처리조건에 따른 단백질 함량(86.9–90.1%)에는 유의적인 차이가 없다고 하였으나(Lee et al., 2016b), 가다랑어의 경우에는 알칼리 용해과정 후, pH 5.5 (79.3–80.4%)에서의 산 침전과정이 pH 4.5 (75.6–75.7%)보다 유의적으로 단백질 함량이 높다고 하였다(Cha et al., 2020). 이 연구의 경우는 알칼리 용해과정 후 pH 4.5에서의 산 침전과정이 pH 5.5보다 우수한 것으로 나타나, ISP 공정의 조건 차이는 어중에 따른 단백질 및 아미노산의 조성 차이가 반영된 결과라고 판단되었다. 아울러 OFR에서 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs는 Val, Leu, Phe, Arg, Asp 및 Pro 유의적으로 증가한 반면에 Lys, Met, Glu 및 Tys는 감소하였다

Table 2. Amino acid composition (g/100 g protein) of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* using isoelectric solubilization and precipitation process

Amino acid	OFR ³	RPI-1 (pH 11/4.5)	RPI-2 (pH 11/5.5)	RPI-3 (pH 12/4.5)	RPI-4 (pH 12/5.5)
Protein content (%) ¹	78.1	73.2	69.4	75.6	71.9
Thr	5.1 ^b	5.2 ^a	4.9 ^c	5.2 ^a	5.1 ^b
Val ²	6.5 ^e	6.7 ^d	6.4 ^f	6.7 ^d	6.8 ^c
Met ²	2.9 ^a	2.5 ^c	2.7 ^b	2.7 ^b	2.7 ^b
lLe ²	5.6 ^c	5.6 ^c	5.3 ^d	5.8 ^a	5.7 ^b
Leu ²	9.2 ^e	9.6 ^b	8.9 ^e	10.0 ^a	9.5 ^c
Phe ²	4.6 ^e	4.8 ^c	4.7 ^d	5.2 ^a	4.9 ^b
His	2.6 ^b	2.6 ^b	2.7 ^a	2.6 ^b	2.7 ^a
Lys	8.4 ^a	7.2 ^c	7.1 ^d	7.1 ^d	7.8 ^b
Arg	6.0 ^e	6.2 ^d	7.3 ^a	6.4 ^c	6.5 ^b
EAAAs (%)	50.9	50.3	50.0	51.6	51.7
Asp	9.1 ^d	9.9 ^a	9.3 ^c	9.6 ^b	9.6 ^b
Ser	6.1 ^a	5.8 ^b	5.0 ^d	5.5 ^c	4.9 ^e
Glu	13.5 ^a	12.5 ^e	12.6 ^d	12.7 ^c	13.0 ^b
Pro ²	4.1 ^d	5.6 ^a	5.3 ^b	4.9 ^c	4.9 ^c
Gly ²	4.5 ^c	5.2 ^b	6.5 ^a	4.5 ^c	4.5 ^c
Ala ²	6.7 ^c	7.1 ^a	6.9 ^b	6.6 ^d	6.6 ^d
Cys	1.2 ^c	1.1 ^d	1.2 ^c	1.3 ^b	1.5 ^a
Tyr	3.9 ^a	2.5 ^d	3.2 ^c	3.3 ^b	3.3 ^b
NEAAAs (%)	49.1	49.7	50.0	48.4	48.3
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
EAAAs/ NEAAAs	1.04	1.01	1.00	1.07	1.07
HAAAs (%)	44.1	47.1	46.7	46.4	45.6

¹Based on dry basis. ²Hydrophobic amino acid. ³Quoted from Kwon et al. (2022). OFR, Olive flounder roe; RPI-1 and RPI-2, Roe protein isolate adjusted to pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 11; RPI-3 and RPI-4, Roe protein isolate adjusted to pH 4.5 and 5.5, respectively, after alkaline solubilization at pH 12; EAAAs, Essential amino acids; NEAAAs, Non essential amino acids; HAAAs, Hydrophobic amino acids. Values are mean of triplicate determinations. Means with different letters within the same row are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

(P<0.05).

OFR 및 RPIs의 필수아미노산에 대한 비필수아미노산의 비(EAAAs/NEAAAs)는 1.00–1.07 범위로서, pH 11에서의 알칼리 용해과정을 거친 RPI-1과 2가 OFR (1.04) 비하여 상대적으로 낮은 반면에, pH 12에서의 RPI-3 및 4는 1.07 수준으로 OFR 보다 우수하였다. 우유의 분리단백질인 casein (0.92 EAAAs/

NEAAAs)의 주요아미노산은 Val, Leu, Lys, Asp, Glu, Pro이었으며, 혈액구성분인 hemoglobin (1.33 EAAAs/NEAAAs)은 Val, Leu, Phe, Lys, Asp, Glu 및 Ala이 주요 아미노산으로 단백질 기원에 따른 조성의 차이가 인정되었으며(Lee et al., 2016b), OFR과 RPIs는 영양적인 측면에서 casein에 비해 우수한 반면에, hemoglobin보다는 낮은 수준이었다.

Intarasirisawat et al. (2011)은 3종의 탈지 다랑어류 알의 주요 필수아미노산이 Leu (8.28–8.64%)과 Lys (8.24–8.30%)이라고 하였으며, 가다랑어(Cha et al., 2020)와 황다랑어(Lee et al., 2016b)의 알 분리단백질은 원료 알에 비해 해당 아미노산 조성이 증가하였으나, 이 연구의 RPIs는 OFR (9.2 및 8.4%)에 비해 Leu (8.9–10.0%)은 증가한 반면에 Lys (7.1–7.8%)은 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 또한 Lysine은 곡류 식품의 제1 제한 아미노산으로 OFR은 3종 어류 알(8.2–8.6%; Heu et al., 2006)과 유사한 조성을 보였고, RPI (7.1–7.8%)에 비하여는 높은 수준이었으나, *Channa striatus* (6.94%)와 *Lates calcarifer* (6.86%) 알 단백질 농축물(Galla et al., 2012)보다 우수하였다.

한편, 소수성(hydrophobicity)은 식품기능성에 있어 거품성 및 유화특성을 결정하는데 중요한 역할을 한다(Chalamaiah et al., 2013). 이와 관련하여 맛, 용해도, 거품성 및 유화특성과 같은 식품기능성에 영향을 주는 소수성 아미노산 조성비(HAA, %)는 각각 44.1% (OFR) 그리고 45.6–47.1% (RPIs)로서, 가다랑어(43.8–45.9%) 및 황다랑어 알 분리단백질(45.2–46.5%)과 유사한 조성비였다(Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2018b; Cha et al., 2020).

ISP 공정으로 회수한 RPIs의 아미노산 조성은 원료인 OFR 과 유의적인 차이가 인정되었으며(P<0.05), 이러한 차이가 식품기능성 및 건강기능성에도 영향을 미칠 것으로 추정되며, 소수성 및 친수성 아미노산은 수중 유적형 emulsion의 계면활성제로서 작용하여 emulsion의 안정성에 기여하게 될 것으로 판단되었다(Li et al., 2004; Mahmoodani et al., 2014; Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2018b; Cha et al., 2020).

무기성분

OFR과 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 무기질 분석 결과는 Table 3에 나타내었다. 필수 무기질의 주요 기능은 골격 구조, 콜로이드 시스템의 유지 및 산-염기 평형조절, 그리고 호르몬, 효소 및 효소 활성제의 중요한 구성인자이다(Belitz et al., 2001). 또한 수산식품자원의 무기질 성분의 변화는 계절적 요인, 생물학적 차이, 어획 지역, 가공 방법, 어종 및 환경 조건(염분, 온도 및 오염 물질)과 밀접하게 관련되어 있다(Alasalvar et al., 2002). OFR의 황(S)과 인(P)은 306.6 mg/100 g으로 가장 많은 무기질 성분을 차지하였으며, 다음으로 포타슘(K, 260.8 mg/100 g), 소듐(Na, 148.0 mg/100g), 칼슘(Ca, 32.9 mg/100 g) 그리고 마그네슘(Mg, 11.3 mg/100g) 순이었다.

Heu et al. (2006)은 명태, 가다랑어 및 황다랑어 알의 주요

무기질은 인, 포타슘, 칼슘이라고 보고하였으며, Lee et al. (2016a)은 황다랑어 알 농축분말(992 mg/100 g)과 egg white (1,341 mg/100 g)에는 황 함량이 가장 많다고 보고한 바 있다. 또한 Beklit et al. (2009)은 연어 알의 황 함량(165–244 mg/100 g)은 본 실험결과와 비교해서 낮은 수준이었다.

한편 ISP 공정의 최종 결과물로서, 분리단백질인 RPIs의 주요 무기질성분은 황(S, 435.9–639.9 mg/100 g), 소듐(Na, 154.0–304.2 mg/100 g), 인(P, 24.5–124.5 mg/100 g) 그리고 마그네슘(Mg, 38.3–65.6 mg/100 g) 순이었으며, OFR과 주요 무기질성분 및 함량에 있어 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$).

ISP 공정의 처리조건에 따라, RPI-1과 3은 황(각각 582.1 및 639.9 mg/100 g)과 인(각각 124.5 및 123.6 mg/100 g)의 함량이 RPI-2 및 RPI-4에 비하여 유의적으로 높은 수준이었으며 ($P<0.05$), 알칼리 용해과정(pH 11 및 12) 후에 이어서 pH 4.5의 산 침전과정이 pH 5.5에서보다 이들 성분을 보다 더 축적한 분석결과를 나타내었다. 반면에 RPI-2와 RPI-4에서는 소듐(각각 304.2 및 278.4 mg/100 g), 마그네슘(각각 65.6 및 51.1 mg/100 g), 칼슘(각각 24.5 및 15.7 mg/100 g), 아연(각각 9.0 및 6.4 mg/100 g) 그리고 철분(각각 3.3 및 5.5 mg/100 g) 함량이 RPI-1과 RPI-3에 비하여 유의적으로 축적이 많은 것으로 나타남으로써, pH 5.5에서의 산 침전과정이 pH 4.5에 비해 우수하였다. 따라서 무기질 성분 조성과 함량에 있어서 ISP 공정을 통한 무기질의 분획효과가 인정되었다. 특히 RPIs의 소듐 함량(154.0–304.2 mg/100 g)은 원료 알(148.0 mg/100 g)에 비해 ISP 공정의 처리조건에 따라 2배가량 축적이 된 것으로 나타나, 이는 알칼리 용해/침전공정에 사용되는 2 N NaOH와 HCl 용액으로 인한 NaCl의 축적이 기인하였다(Lee et al., 2016b; Cha et al., 2020).

RPIs의 소듐함량은 crab (Gokoglu and Yerlikaya, 2003),

rainbow trout (Gokoglu et al., 2004) 그리고 fish based dishes (Martinez-Valverde et al., 2000)에 비해, 인 함량에 있어서는 rainbow trout (Gokoglu et al., 2004) 그리고 European perch (Orban et al., 2007)에 비하여 낮은 수준이었다. 반면에 마그네슘함량은 sea bream (Orban et al., 2000) 그리고 Baltic herring (Tahvonon et al., 2000)에 비해 2배가량 높은 수준이었다.

Lee et al. (2016b)은 황다랑어 알의 알칼리 불용성 획분과 분리단백질은 황, 소듐 포타슘, 인이 주요 무기질이며, ISP 공정을 통해, 원료인 알에 대해 황과 인 함량의 변화는 적은 반면에 포타슘, 소듐, 칼슘은 두드러진 감소 경향을 보였고, 철분의 축적 효과와 더불어 처리조건에 따른 분획효과도 인정되었다고 하였으나, 원료 알에 비해 전반적으로 무기질 함량은 감소하였다고 보고한 바 있다.

가다랑어 알의 ISP 공정을 통해 회수한 알칼리 불용성획분 (Yoon et al., 2018a)과 분리단백질(Cha et al., 2020)은 황, 소듐, 포타슘 및 인이 주요 무기질로서 원료 알에 비해 그 함량은 전반적으로 감소 경향을 보인다고 하였으나, 알칼리 용해 및 산 침전과정의 처리 조건에 따른 무기질함량의 유의적인 차이로 분획 및 농축효과가 있었다고 하였다.

우유의 분리단백질인 casein의 주요 무기질은 황, 칼슘, 포타슘, 나트륨이었으며, 혈액 구성단백질인 hemoglobin은 황, 철분, 소듐, 포타슘 순으로(Lee et al., 2016b), OFR 및 RPIs의 무기질조성과 함량에서 유의적인 차이를 나타내어, 단백질 기원과 가공처리방법의 차이에 기인하는 것으로 추정되었다. 또한 이러한 무기질의 조성 및 함량에 대한 차이는 무기질이온, 양성 전해질로서 단백질 및 아미노산의 조성 그리고 알칼리 및 산 처리공정에 따른 pH 변화로 하전을 띤 단백질 및 무기질 이동이 활발히 일어난 결과를 반영하였다(Lee et al., 2016b; Cha et al., 2020). 이상의 실험결과와 연구보고에서 ISP 공정으로 OFR로

Table 3. Mineral contents of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* by isoelectric solubilization and precipitation process

Minerals (mg/100 g)	OFR ¹	RPI-1 (pH 11/4.5)	RPI-2 (pH 11/5.5)	RPI-3 (pH 12/4.5)	RPI-4 (pH 12/5.5)
S	306.6±0.0 ^c	582.1±41.0 ^a	435.9±70.9 ^b	639.9±64.6 ^a	567.9±31.1 ^a
Na	148.0±0.6 ^e	154.0±1.5 ^d	304.2±5.2 ^a	160.8±1.9 ^c	278.4±2.7 ^b
P	306.6±1.3 ^a	124.5±2.5 ^b	24.5±0.7 ^d	123.6±1.9 ^b	44.8±0.2 ^c
K	260.8±0.9 ^a	6.6±0.1 ^d	6.6±0.1 ^d	7.6±0.2 ^c	10.9±0.1 ^b
Ca	32.9±2.4 ^a	9.7±0.0 ^e	24.5±0.9 ^b	10.2±0.3 ^d	15.7±0.4 ^c
Mg	11.3±0.1 ^d	38.3±4.1 ^c	65.6±3.0 ^a	49.4±1.0 ^b	51.1±2.1 ^b
Zn	trace	3.7±0.1 ^c	9.0±0.1 ^a	3.4±0.0 ^d	6.4±0.1 ^b
Fe	0.0±0.0 ^e	2.6±0.0 ^c	3.3±0.2 ^b	2.4±0.1 ^d	5.5±0.1 ^a
Mn	trace	0.0±0.0 ^c	0.1±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	4.3±0.2 ^a

¹Quoted from Kwon et al. (2022). OFR, Olive flounder roe; 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 row are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

부터 회수한 분리단백질은 긍정적인 측면에서는 마그네슘, 아연, 철분에 대한 농축효과에 따른 함량 증가가 기대되었으나, 수분평형과 전해질 평형에 중요한 무기질인 소듐의 축적과 포타슘의 현저한 감소와 같은 부정적인 면을 동시에 나타내어 부정적인 부분을 해결하기 위한 방안이 모색되어야 할 것으로 판단되었다.

중금속

OFR과 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 식품소재로서 안전성을 검토하기 위한 중금속 분석 결과는 Table 4와 같다. OFR의 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 구리(Cu), 납(Pb) 및 니켈(Ni)의 함량(mg/kg)은 흔적량(trace)이었다.

ISP 공정을 통해 최종적으로 회수한 분리단백질로서 RPIs는 카드뮴 0.1–0.2 mg/kg, 크롬 0.0–0.1 mg/kg, 구리 0.4–2.0 mg/kg, 납 0.1–0.3 mg/kg 그리고 니켈이 0.0–0.3 mg/kg 수준을 나타내었다. 특히 카드뮴, 구리 및 납의 경우, ISP 공정의 처리조건에 따른 유의적인 차이가 있었으며(P<0.05), RPI-1과 RPI-3의 중금속 함량이 RPI-2 및 RPI-4에 비하여 원료 알에 대해 보다 많은 양을 축적한 것으로 확인 되었다. 이는 알칼리 용해과정(pH 11 및 12) 후에 이어지는 pH 4.5에서의 산 침전과정이 pH 5.5의 경우보다 이들 중금속의 축적이 많았다는 것을 의미하였다. 또한 구리의 경우, RPI-3 (pH 12/4.5)이 2.0 mg/kg으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 다음으로 RPI-1 (1.1 mg/kg), RPI-4 (0.9 mg/kg) 그리고 RPI-2 (0.4 mg/kg)의 순으로 각각의 처리조건에 따른 유의성이 인정되었다(P<0.05). 따라서 중금속의 함량 면에서 최소화하는 조건은 pH 11/5.5의 ISP이었다.

한편, 구리의 독성 한계기준은 30 mg/kg (FAO, 1983)이며, 해

양생물체의 생리 및 금속 대사과정에 필수적인 미량원소(Thanonkaew et al., 2006)로써, 철분, 망간 및 마그네슘과 더불어 지방산화 과정의 촉매작용 뿐만 아니라 pro-oxidant 활성을 나타낸다(Thanonkaew et al., 2006). Kim et al. (2020)은 어류 알의 진공 동결건조 농축물의 구리함량은 0.5–1.5 mg/kg, 납 0.0–0.2 mg/kg, 카드뮴 0.1–0.5 mg/kg, 크롬 0.0–0.5 mg/kg 그리고 니켈 0.0–0.3 mg/kg으로 어종 및 중금속함량에 따른 유의성이 일부 인정된다고 하였으나, 식품공전의 중금속 기준치에 미달한다고 보고한 바 있다. 또한 황다랑어 알 가열-건조처리 농축물(Lee et al., 2016a)의 중금속 함량도 이 실험의 결과와 유사하였다. 아울러 수산식품에 있어서 무기질 및 중금속 성분의 함량 변화는 계절, 생물학적 차이, 어획지, 가공방법, 원료 공급원, 그리고 서식환경(염도, 온도 및 오염물질)과 밀접한 관련이 있다(Alasalvar et al., 2002). 식품공전(Korean food standards code; MFDS, 2017)에 따르면, 식품소재로서 수산물의 중금속의 안전치는 납의 경우 0.5 mg/kg이하, 수은은 0.5 mg/kg이하 그리고 카드뮴의 경우, 0.1 mg/kg이하로 제시하고 있으며, 어류 알에 대해서는 납과 카드뮴은 각각 0.5 및 1.0 mg/kg을 초과하지 않도록 규정하고 있다. 따라서 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 중금속 분석결과는 모두 이들 기준치에 미달하는 수준이었다. 아울러 RPIs로 회수한 후에 진공 동결건조 분말로 제조함으로써 원료 알 기준의 습식중량으로 환산한다면 기준치를 현저히 미달한 수준이었다.

Hunter's color

Table 5는 OFR로부터 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs의 색차에 대한 결과를 나타낸 것이다. 분리단백질인 RPIs의 명도 L값은 70.4–76.7 범위로, ISP 공정의 처리조건에 따라 RPI-1 (76.7)이 유의적으로 다른 RPIs에 비해 밝았다. 또한 RPI-1과 3이 RPI-2와 4에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타냄으로서 알칼리 용해과정 후에 이어지는 pH 4.5의 산 침전과정이 pH 5.5에서 보다 명도에 영향을 주는 색소의 침착이 덜 한 것으로 추정되었다.

한편 적색도(a, redness; -a, greenness)에 있어서는 RPIs는 RPI-1과 3이 각각 1.3 및 2.5로서 RPI-2와 4 (각각 3.9 및 3.4)에 비하여 낮은 수준을 나타냄으로서 상대적으로 높은 적색도는 원료에 존재하는 heme 단백질의 침착에 기인하는 것으로(Kristinsson et al., 2005), 어류 알에 분포하는 heme 단백질이 알칼리 용해과정과 산 침전과정의 pH 조절에 의한 분획효과로서 pH 5.5에서 회수한 분리단백질이 pH 4.5에서 회수한 것에 비해 heme과 붉은 색소단백질의 침착이 두드러져 명도(L)에도 영향을 준 것으로 확인되었다(Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2018a; Cha et al., 2020). 또한 갈색도(b, yellowness; -b, blueness)의 경우, RPIs는 22.0–25.5 범위이었다. 이상의 Hunter's color로부터 산출한 RPIs의 백색도(whiteness)는 61.2–67.9 범위로 옅은 갈색인 것으로 확인되었다. Sathivel et al. (2009)은 메기 알의 가용성 단백질분말이 밝은 노란색(L*=71.7; a*=3.9;

Table 4. Heavy metal contents of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* by isoelectric solubilization and precipitation process

Heavy metal (mg/kg)	OFR ¹	RPI-1 (pH 11/4.5)	RPI-2 (pH 11/5.5)	RPI-3 (pH 12/4.5)	RPI-4 (pH 12/5.5)
Cu	trace	1.1±0.0 ^b	0.4±0.0 ^c	2.0±0.0 ^a	0.9±0.0 ^b
Ni	trace	0.0±0.0 ^a	0.0±0.3 ^a	0.0±0.3 ^a	0.0±0.0 ^a
Cr	trace	0.1±0.1 ^a	0.1±0.0 ^a	0.0±0.0 ^b	0.1±0.0 ^a
Cd	trace	0.2±0.0 ^a	0.1±0.0 ^b	0.2±0.0 ^a	0.1±0.0 ^b
Pb	trace	0.3±0.1 ^{ab}	0.1±0.0 ^b	0.4±0.0 ^a	0.2±0.3 ^{ab}

¹Quoted from Kwon et al. (2022). OFR, Olive flounder roe; RAI-11 and RAI-12, Roe alkaline insolubles after alkaline solubilization at pH 11 or 12 respectively; 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; Hb, Hemoglobin. Data are given as mean values±SD (n=3). Means with different letters within the same row are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 5. Hunter's colour values and whiteness of roe protein isolates recovered from olive flounder *Paralichthys olivaceus* by isoelectric solubilization and precipitation process

Sample	L*	a*	b*	ΔE	Whiteness
RPI-1 (pH 11/4.5)	76.7±0.3 ^a	1.3±0.1 ^d	22.0±0.2 ^c	29.5±0.3 ^d	67.9±0.3 ^a
RPI-2 (pH 11/5.5)	70.9±0.1 ^c	3.9±0.1 ^a	25.5±0.1 ^a	36.1±0.2 ^a	61.2±0.2 ^d
RPI-3 (pH 12/4.5)	72.6±0.1 ^b	2.5±0.1 ^c	23.6±0.4 ^b	33.5±0.4 ^c	63.8±0.3 ^b
RPI-4 (pH 12/5.5)	70.4±0.2 ^c	3.4±0.1 ^b	22.2±0.2 ^c	34.3±0.3 ^b	62.9±0.2 ^c

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. L*, Lightness; a*, Redness; b*, Brownness. Data are given as mean values±SD (n=3). Means with different letters within the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

b*=28.8)을 띠고 있다 하여, 이 연구의 RPIs와 유사하였다.

이상의 결과와 연구보고를 통해 ISP 공정의 알칼리 용해과정에서는 공통적으로 pH 12에서의 용해과정이 pH 11에서보다 어류 알 중의 색소성분을 보다 잘 용해하여 이를 통해 회수한 알칼리 불용성획분이 상대적으로 밝거나 옅은 색상을 띠는 것으로 확인되었으며(Lee et al., 2016b; Yoon et al., 2018a), 이어서 행한 산 침전과정에서는 pH 5.5에서 회수한 분리단백질이 pH 4.5에서 회수한 것에 비해 짙은 색상을 나타냄으로서 어류 알에 분포하는 색소단백질의 침착은 더 많이 일어남을 알 수 있었다(Lee et al., 2016b; Cha et al., 2020). 따라서 어류 알 유래 색소단백질의 등전점이 pH 5.5 부근일 것으로 추정되었다.

Lone et al. (2015)은 어류 분리단백질의 색도와 백색도는 결체조직의 정도에 따라 L값을 증가시키고, 지질의 존재는 b값에 영향을 미치며, a값에 영향을 주는 heme 단백질의 침착 또는 헤모글로빈의 변성과 산화로 인해 최종제품의 색은 황갈색이 된다고 하였다. 또한 백색육 어류 알이 혈합육 어류에 비해 색도와 백색도에 있어 적색도가 높은 것은 어류에 존재하는 heme 단백질에 영향을 받아 이들 색소성분의 침착에 의한 영향이 크다고 하였다(Kristinsson et al., 2005; Yoon et al., 2018a).

따라서 OFR의 ISP 공정을 통해 회수한 RPIs는 알칼리 불용성획분(Yoon et al., 2018a) 그리고 가공처리수(Lee et al., 2017)와 더불어 각 공정 단계에 따른 단백질 분획효과가 인정되어, 이들 각각의 단백질분포에 따른 식품기능성에 대해서도 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진

흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(PJT 201277, 대일 검사강화 조치 대응 수출시장 다변화 수산식품개발).

References

- Agboola S, Ng D and Mills D. 2005. Characterization and functional properties of Australia rice protein isolates. *J Cereal Sci* 41, 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.10.007>.
- Alasalvar C, Taylor KDA, Zubcov E, Shahidi F and Alexis M. 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem* 79, 145-50. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00122-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00122-x).
- Al-Holy MA and Rasco BA. 2006. Characterisation of salmon (*Oncorhynchus keta*) and sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar proteins. *J Food Biochem* 30, 422-428. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2006.00069.x>.
- 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>.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2005. Official Method of Analysis. 18th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- 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/s00217-012-1721-z>.
- Bekhit AEDA, Morton JD, Dawson CO, Zhao JH and Lee HYY. 2009. Impact of maturity on the physicochemical and biochemical properties of chinook salmon roe. *Food Chem* 117, 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.009>.
- Belitz HD, Grosch W and Schieberle P. 2001. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, NY, U.S.A. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>.
- 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 Nutr* 8, 1874-1887. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1470>.
- Chaijan M, Pabouat W and Benjakul S. 2010. Physicochemical and gelling properties of short-bodied mackerel (*Rastreliger brachysoma*) protein isolate prepared using alkaline-aided process. *Food Bioprod Process* 88, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.11.003>.
- Chalamaiah M, Balaswamy K, Rao GN, Rao PGP and Jyothirmayi T. 2013. 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>.
- Chen YC and Jaczynski J. 2007. Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives. *J Agric Food Chem* 55, 9079-9088. <https://doi.org/10.1021/jf071992w>.
- DeMan JM. 1999. Proteins. In: Principles in Food Chemistry. DeMan JM, ed. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A., 111-162.
- DeWitt CM, Gomez G and James JM. 2002. Protein extraction from beef heart using acid solubilization. *J Food Sci* 67, 3335-3341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09588.x>.
- Dong FD and Bechtel P. 2010. New Fish Feeds Made from Fish By-products. Retrieved from <https://thefishsite.com/articles/new-fish-feeds-made-from-fish-byproducts> on Feb24, 2019.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1983. Compilation of Legal Limits for Hazardous Substances in Fish and Fishery Products. FAO Fishery Circular No. 464. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 5-100.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2020. The State World Fisheries and Aquaculture. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf> on Jul 20, 2020.
- Galla NR, Karakala B, Akula S and Pamidighantam PR. 2012. 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. 2013. Physico-chemical, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates from *Cyprinus carpio* and *Epinephelus tauvima*. *J Food Pharm Sci* 1, 81-88.
- Gokoglu N and Yerlikaya P. 2003. Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. *Food Chem* 80, 495-498. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00318-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00318-7).
- Gokoglu N, Yerlikaya P and Cengiz E. 2004. Effect of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem* 84, 19-22. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00161-4).
- 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. *Korean J Fish Aquat Sci* 39, 1-8. <https://doi.org/10.5657/kfas.2006.39.1.001>.
- Horax R, Hettiarachchy N, Kannan A and Chen P. 2011. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chem* 124, 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.068>.
- Horax R, Hettiarachchy NS, Chen P and Jalaluddin M. 2004. Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J Food Sci* 69, fct114-fct118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb15500.x>
- Huda N, Abdullah A and Babji AS. 2001. Functional properties of surimi powder from three Malaysian marine fish. *Int J Food Sci Technol* 36, 401-406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00473.x>.
- Hultin HO and Kelleher SD. 2001. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. Advanced Protein Technologies Inc., Ipswich, MA, U.S.A., US Patent No. 6,288,216 B1.
- Intarasirisawat R, Benjakul S and Visessanguan W. 2011. Chemical compositions of the roes from skipjack, tongol and bonito. *Food Chem* 124, 1328-1334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.076>.
- Kang KT, Heu MS and Kim JS. 2007. Improvement on the quality and functionality of red tanner crab cooking drip using commercial enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36, 1022-1030. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.8.1022>.
- Kang SI, Heu MS, Choi BD, Kim KH, Kim YJ and Kim JS. 2015. Investigation of food quality characterization of processing by-product (frame muscle) from the sea rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 26-35. <https://doi.org/10.5657/kfas.2015.0026>.
- Kim HJ, Yoon IS, Park SY, Kang SI, Kim JS and Heu MS. 2020. Food component characteristics of fish roe concentrates prepared by freeze-drying. *Korean J Fish Aquat Sci*, 53, 165-173. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0165>.
- Kim YS, Park JW and Choi YJ. 2003. New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fish Sci* 69, 1231-1239. <https://doi.org/10.1111/j.0919-9268.2003.00750.x>.
- Kinsella JE and Melachouris N. 1976. Functional properties of proteins in food: A survey. *Crit Rev Food Sci Nutr* 7, 219-280. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- Klomklao S and Benjakul S. 2016. Utilization of tuna processing byproducts: Protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera. *J Food Process Preserv* 41, e12970. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12970>.
- 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>.
- 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, 1-10. <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 albacares* roe by cooked-dried process. *Korean J Fish Aquat Sci* 19, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0012-1>.
- Li GH, Le GW, Shi YH and Shrestha S. 2004. Angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res* 24, 469-486. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>.
- Lone DA, Wani NA, Wani IA and Masoodi FA. 2015. Physicochemical and functional properties of rainbow trout fish protein isolate. *Int Food Res J* 22, 1112-1116.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Mahmoodani F, Ghassem M, Babji AS, Yusop SM and Khosrokhavar R. 2014. ACE inhibitory activity of pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) skin and bone gelatin hydrolysate. *J Food Sci Technol* 51, 1847-1856. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0742-8>.
- Martinez-Valverde I, Periago MJ, Santaella M and Ros G. 2000. The content and nutritional significance of minerals on fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chem* 71, 503-509. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00197-7).
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2017. Korean Food Standards Codex. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=12 on Oct 25, 2022.
- MOF (Ministry of Ocean and Fisheries). 2019. Yearbook of Marine Resource. Retrieved from http://www.mof.go.kr/statPortal/bbs/publication/view.do?ntt_id=912&pageIndex=&searchType=&searchQuery= on Jul 15, 2020.
- Orban E, Di Lena G, Ricelli A, Paoletti F, Casini I, Gambelli L and Caproni R. 2000. Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chem* 70, 27-32. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00112-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00112-7).
- Orban E, Navigato T, Masci M, Di Lena G, Casini I, Caproni R, Gambelli L, De angelis P and Rampacci M. 2007. Nutritional quality and safety of European perch (*Perca fluviatilis*) from three lakes of central Italy. *Food Chem* 100, 482-490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.069>.
- Palafox H, Córdova-Murueta JH, Navarrete del Toro MA and García-Carreño FL. 2009. Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. *Process Biochem* 44, 584-587. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.011>.
- Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C and Beck MI. 2007. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chem* 84, 343-349. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-84-4-0343>.
- Park JD, Jung CH, Kim JS, Cho DM, Cho MS and Choi YJ. 2003. Surimi processing using acid and alkali solubilization of fish muscle protein. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32, 400-405. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2003.32.3.400>.
- Perez-Mateos M, Amato PM and Lanier TC. 2004. Gelling properties of Atlantic croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. *J Food Sci* 69, FCT328-FCT333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06335.x>.
- Pires C, Costa S, Batista AP, Nunes MC, Raymundo A and Batista I. 2012. Properties of protein powder prepared from Cape hake by-products. *J Food Eng* 108, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.020>.
- Sathivel S and Bechtel PJ. 2006. Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *Int J Food Sci Technol* 41, 520-529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01101.x>.
- Sathivel S, Bechtel PJ and Prinyawiwatkul W. 2006. Physicochemical and rheological properties of salmon protein powders. *Int J Food Eng* 2, 1-18. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1066>.
- Sathivel S, Bechtel PJ, Babbitt JK, Prinyawiwatkul W, Negulescu II and Reppond KD. 2004. Properties of protein powders from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) and herring (*Clupea harengus*) byproducts. *J Agric Food Chem* 52, 5040-5046. <https://doi.org/10.1021/jf0351422>.
- Sathivel S, Yin H, Bechtel PJ and King JM. 2009. Physical and nutritional properties of catfish roe spray dried protein powder and its application in an emulsion system. *J Food Eng* 95, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.011>.
- Tahergorabi R, Beamer SK, Matak KE and Jaczynski J. 2012a. Isoelectric solubilization/precipitation as a means to recover protein isolate from striped bass (*Morone saxatilis*) and its physicochemical properties in a nutraceutical seafood product. *J Agric Food Chem* 60, 5979-5987. <https://doi.org/10.1021/jf3001197>.
- Tahergorabi R, Sivanandan L and Jaczynski J. 2012b. Dynamic rheology and endothermic transitions of proteins recovered from chicken-meat processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. *LWT Food Sci Technol* 46, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.013>.
- Tahvonon R, Aro T, Nurmi J and Kallio H. 2000. Mineral content in Baltic herring and Baltic herring products. *J*

- Food Compost Anal 13, 893-903. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0933>.
- Thanonkaew A, Benjakul S, Visessanguan W and Decker EA. 2006. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze-thaw cycles. Food Chem 95, 591-599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.040>.
- Undeland I, Kelleher SD and Hultin HO. 2002. Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. J Agric Food Chem 50, 7371-7379. <https://doi.org/10.1021/jf020199u>.
- Yongsawatdigul J and Park JW. 2004. Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. J Food Sci 69, 499-505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13642.x>.
- Yoon IS, Lee HJ, Kang SI, Park SY, Kang YM, Kim JS and Heu MS. 2018b. 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, 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, 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>.