

연구노트

## Isolation of calcium-binding peptides from porcine meat and bone meal and mussel protein hydrolysates

Seung Hun Jung, Kyung Bin Song\*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

### 돼지 육골분 및 진주담치 단백질의 가수분해물 제조 및 칼슘 결합 물질의 분리

정승훈 · 송경빈\*

충남대학교 식품공학과

#### Abstract

Calcium is one of the essential mineral for the humans due to its crucial physiological functions in the body. Calcium deficiency results in many diseases, such as osteoporosis. Therefore, calcium supplements are available as a functional food. However, most calcium supplements in the market have a limitation due to poor absorption and low bioavailability. Thus, calcium-chelated peptides for improving the absorption rate of calcium have been isolated from foods including porcine meat and bone meal (MBM), and mussel using the enzymatic hydrolysis of their protein. The hydrolysates of food were ultra-filtered in order to obtain small peptides less than 3 kDa and the Ca-binding peptides were isolated via the anion exchange chromatography. The binding activity and concentration of Ca-binding peptides were determined. In particular, the MBM and mussel protein hydrolysates were fractionated by mono Q and Q-Sepharose, respectively. As a result, among the fractions, the fractions of MBM F2 and mussel F3 showed the highest Ca-binding activity. These results suggest that MBM and mussel protein hydrolysates can be used as calcium supplements.

Key words : meat and bone meal protein, mussel protein, calcium-binding peptide, hydrolysis

#### 서 론

건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강기능식품, 특히 미네랄 제제에 대한 소비가 증가하고 있다. 미네랄 중 칼슘은 인체의 1.5~2.2% 정도를 차지하는 무기질로 뼈 성장, 혈액응고, 신경전달, 근육수축 등 중요한 생리적 기능을 담당하고 있다고 보고되었다(1). 따라서 칼슘의 결핍 시 골다공증을 비롯한 다양한 질병에 대한 위험도가 높아진다고 알려졌는데(2), 식품의 섭취 시에 phytate 등의 작용에 의해 미네랄 흡수가 저해되는 경우가 있어 칼슘 보충제를 이용하는 경우가 많다(3).

현재 시판되고 있는 칼슘 보충제나 식품에 첨가되는 칼슘 강화 물질은 대부분 무기염류 형태로써 체내 흡수율이 낮고, 식품의 성분과 반응하여 변색이나 이취, 이취 등을 발생시킨다는 단점이 있다(4). 이러한 문제점을 보완하기 위하여 펩타이드에 mineral을 chelate한 생리활성 펩타이드에 대한 관심이 높아지고 있다. 생리활성 펩타이드는 주로 저분자 펩타이드로 체내에서 쉽게 흡수되고 생체 이용률 또한 높다고 알려져 있는데, 이를 구성하고 있는 아미노산 서열이나 조성에 의해 항산화, 항균, 항고혈압, 항비만 등 다양한 생리활성을 나타낸다(5). 최근에는 저활용 식품 단백질의 가수분해를 통해 mineral binding peptide를 얻는 연구가 활발히 진행되고 있다(5).

돼지 육골분은 육가공 중에 발생하는 부산물로 약 50%의 단백질을 함유하고 있으며 필수아미노산이 풍부하기 때문에 좋은 단백질 급원이지만, 현재 대부분 버려지거나 일부만 동물의 사료로 이용되고 있다(6). 또한 진주담치(*Mytilus edulis*)는 홍합과 생김새는 비슷하지만 번식력이 강하고 양

\*Corresponding author. E-mail : kbsong@cnu.ac.kr  
Phone : 82-42-821-6723, Fax : 82-42-825-2664  
Received 3 November 2014; Revised 8 January 2015; Accepted 26 January 2015.  
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

식이 쉬워 대량생산이 가능한데, 맛과 향이 좋아 국내의 중요한 수산자원 중 하나이며(7), 특히 단백질이 풍부하여 조미제품을 포함한 각종 가공품 개발에 이용이 되고 있다(8). 따라서 본 연구에서는 기존의 칼슘 보충제의 단점을 보완하고자, 저활용되고 있는 돼지 육골분과 좋은 단백질 급원인 진주담치로부터 단백질 가수분해물을 제조하고 칼슘 결합 물질을 분리함으로써 식품 신소재 개발과 관련한 기초자료를 확보하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용된 돼지 육골분은 (주)홍창엔앤티(Jincheon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 진주담치는 대전 소재의 노은농수산물시장에서 구입하여 가식부만 분리하여 실험에 사용하였다.

### 돼지 육골분 및 진주담치 단백질 추출

돼지 육골분의 단백질은 Garcia와 Phillips(9)의 방법을 변형하여 추출하였다. 먼저, 시료와 0.1 M NaCl을 1:5(w/v) 비율로 섞고 그 혼합액을 homogenizer(IKA, Ultra-Turrax T25, Staufen, Germany)를 이용해 10,000 rpm에서 30분 동안 균질화 시켜준 후, sonicator(GE 750, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)를 이용해 15분간 sonication 하였다. 단백질의 수율을 높이기 위해 60°C에서 3시간 동안 교반한 후, 10,000×g에서 1시간 원심분리 하여 얻은 상등액을 동결 건조하였다.

진주담치는 탈지과정을 거친 후 단백질을 추출하였다(10,11). 진주담치와 isopropanol을 1:4(w/v) 비율로 섞어 균질화 시켜준 후 37°C에서 1시간 동안 정치시켜 상등액을 제거하는 과정을 두 번 반복하고 동결 건조하였다. 탈지된 진주담치 시료에서 단백질을 추출하기 위해 deionized water를 1:6(w/v) 비율로 섞고, 1 M NaOH를 이용하여 pH 12로 맞춰준 후 1시간 동안 교반시켜주었다. 10,000×g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 1 M HCl을 이용하여 pH 5.2가 되도록 조절한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 침전물을 동결건조 하였다.

### 돼지 육골분 및 진주담치 단백질의 가수분해물 제조

돼지 육골분 및 진주담치 단백질 시료를 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 각각 용해하여 2% 수용액으로 제조하여 가수분해의 기질로 사용하였다. 단백질 가수분해 효소로는 Novo Nordisk Co.(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입한 alcalase(from *Bacillus licheniformis*, activity 2.4 AU/g protein)를 이용하였다. 기질 대비 효소를 500:1(w/v)로 첨가하여 55°C, pH 7 조건에서 12시간 동안 가수분해 하면서

매 2시간마다 시료를 채취하여 가수분해도 측정 실험에 사용하였다(12).

### 가수분해도 측정

돼지 육골분 및 진주담치 단백질 가수분해도를 측정하기 위해 trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) method(13) 및 *O*-phthaldialdehyde(OPA) method(14)를 사용하였다. TNBS method는 available amino group concentration 측정에 이용되는 방법으로, 펩타이드 함량 측정에도 이용하였다. 시료에 0.1 M sodium borate buffer(pH 9.2)를 첨가하고 5 mM TNBS reagent와 혼합하여 30분 동안 반응시킨 후 반응을 정지시키기 위해 18 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 넣어주었으며, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 펩타이드 함량을 측정하였다. 또한 Nielsen 등(14)의 OPA method에 따라, 시료 400 μL에 OPA reagent 3 mL을 첨가하여 5초 동안 섞어준 뒤 2분간 반응시켜 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 가수분해도는 아래의 식에 의해 구하였고, OD<sub>total</sub>는 6 N HCl, 120°C에서 24시간 동안 가수분해 시킨 시료의 흡광도이다(15).

$$(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{total}} - OD_{\text{blank}}) \times 100 \%$$

### 칼슘 결합 펩타이드의 분리

돼지 육골분 및 진주담치 단백질 가수분해물은 Amicon 8200(Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 이용하여 한외여과 하였으며, Ultracel PL-3(Millipore Co.)를 통해 3 kDa이하의 가수분해물을 얻어 동결 건조하였다. 돼지 육골분 단백질 가수분해물은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해하여 1 mg/mL 용액을 제조한 후 fast protein liquid chromatography (FPLC)(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 anion exchange column(Mono Q, Amersham Pharmacia)를 통해 2 mL/min의 유속으로 분획하였다. 진주담치 단백질 가수분해물의 경우, Q-Sepharose(2.5 cm×10 cm, Amersham Pharmacia)를 이용하여 2 mL/min의 유속으로 분획하였으며, loading한 시료의 농도는 2 mg/mL이었다. 두 가지 시료 모두 이동상 용매 A는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 하였고, 용매 B는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 0.5 M NaCl을 첨가하여 사용하였다. 분획한 시료들은 모두 214 nm에서 흡광도를 측정하였고, 분획 과정 중의 염을 제거하기 위하여 100-500 Da size의 membrane(regenerated cellulose, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)를 이용하여 dialysis한 후 동결건조 하여 칼슘 결합력을 측정하였다.

### Ca binding capacity 측정

동결 건조된 가수분해물 분획을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 충분히 교반시켜 준 후 2.5 mM

calcium chloride를 첨가하여 1 hr 동안 실온에서 stirring 해주면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 3,500×g에서 20 min 동안 원심 분리하여 상등액을 얻었고, colorimetric method(16)에 의해 orthocresolphthalein complexone reagent를 이용하여 calcium 함량을 정량하였다.

### 통계처리

본 실험의 통계적 분석을 위해 SAS(Statistical Analysis System program, 8.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였으며, Duncan's multiple range test 방법을 통해 각 처리구간의 유의성( $p < 0.05$ )을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 돼지 육골분과 진주담치 단백질로부터 가수분해물의 제조

생리활성 펩타이드를 얻는 방법으로 식품 단백질의 효소적 가수분해 방법이 많이 이용되고 있다(17). 단백질의 가수분해가 진행됨에 따라 다양한 분자량의 펩타이드가 생성되면서 -OH, -COOH, NH<sub>2</sub> 등의 친수기가 노출되고, 이는 칼슘을 비롯한 미네랄의 결합을 용이하게 만들어 준다고 알려져 있다(18). 따라서 본 연구에서는 돼지 육골분 단백질을 alcalase로 가수분해하여 calcium binding peptide를 분리하고자 하였으며, 가수분해도를 확인하기 위해 시간에 따른 펩타이드의 양을 TNBS method로 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 돼지 육골분의 경우, available amino group은 가수분해가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 특히 초기 2시간 동안 4.47 mM에서 16.63 mM로 가장 급격한 증가를 나타내었고, 증가폭은 점차 감소하여 12시간 후에는 22.44 mM의 농도를 나타내었다. 또한 진주담치 단백질도 비슷한 경향을 보였는데, 가수분해 시간이 지남에 따라 TNBS assay 결과 초기 7.29 mM에서 2시간 후 16.80 mM로 급격한 증가를 보였고 점차 증가폭이 감소하여 12시간 후에는 21.83 mM로 나타났다. 또한 OPA method에 의한 가수분해도 측정값 역시 초기의 약 21%에서 43%로 증가하여, alcalase를 이용하여 tilapia(*Oreochromis niloticus*) 단백질을 가수분해 한 결과와 유사하였다(19). 또한, 가수분해 시간이 지날수록 가수분해도가 증가하지만, 일정 시간 이후로는 크게 증가하지 않아 기존의 연구와 비슷한 경향을 나타내었다(20).

### 돼지 육골분과 진주담치 단백질로부터 칼슘 결합 물질 분리

단백 분해 효소인 alcalase를 이용해 12시간 동안 가수분해하여 얻은 돼지 육골분 및 진주담치 단백질의 가수분해물을 Ca과 결합된 펩타이드 소재로 이용하기 위하여 3 kDa 이하로 한외여과를 하였는데, 펩타이드의 분자량과 아미노산 조성은 칼슘 결합력과 밀접한 연관이 있다고 알려져

있다(21). Jung 등(22)은 1~5 kDa의 저분자량을 가진 펩타이드가 체내 이용률과 흡수율이 높다고 보고한 바 있고, 기존 연구에서 얻어진 Ca binding peptide의 분자량 역시 1.4 kDa(23), 1.2 kDa(24), 1.6 kDa(25) 등으로 나타났다. 이러한 연구보고들을 참고로 하여 본 연구에서는 가수분해물의 분자량을 3 kDa 이하로 설정하였다. 펩타이드가 칼슘과 같은 2가 양이온과 효과적으로 결합하기 위해서는 음전하를 갖는 결사슬을 가지고 있어야 하므로(26), 한외여과 후 동결 건조된 돼지 육골분과 진주담치 단백질 가수분해물을 anion exchange chromatography에 의해 분리하였다. 돼지 육골분 가수분해물을 Mono Q column에 의해 분획한 결과, 2개의 major peak로 분리되었는데(Fig. 2A), MBM-F1과 MBM-F2의 peptide 양에 대한 Ca 결합된 정도를 측정된 결과, 각각 0.184와 0.840으로 MBM-F2의 분획이 칼슘에 대한 결합력이 더욱 높은 것으로 나타났다(Table 1).

진주담치 단백질 가수분해물은 Q-Sepharose ion exchange chromatography에 의해 분리하였으며, 그 결과 Mussel-F1,

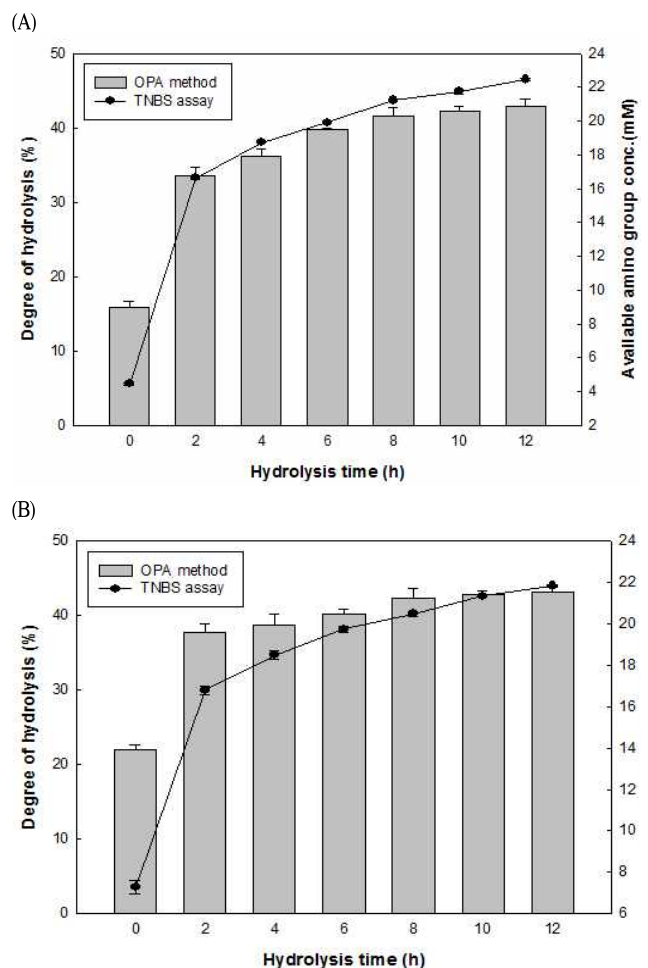


Fig. 1. Effects of the hydrolysis time on the available amino group concentration and the degree of hydrolysis.

(A), porcine meat and bone meal protein; (B), mussel protein.

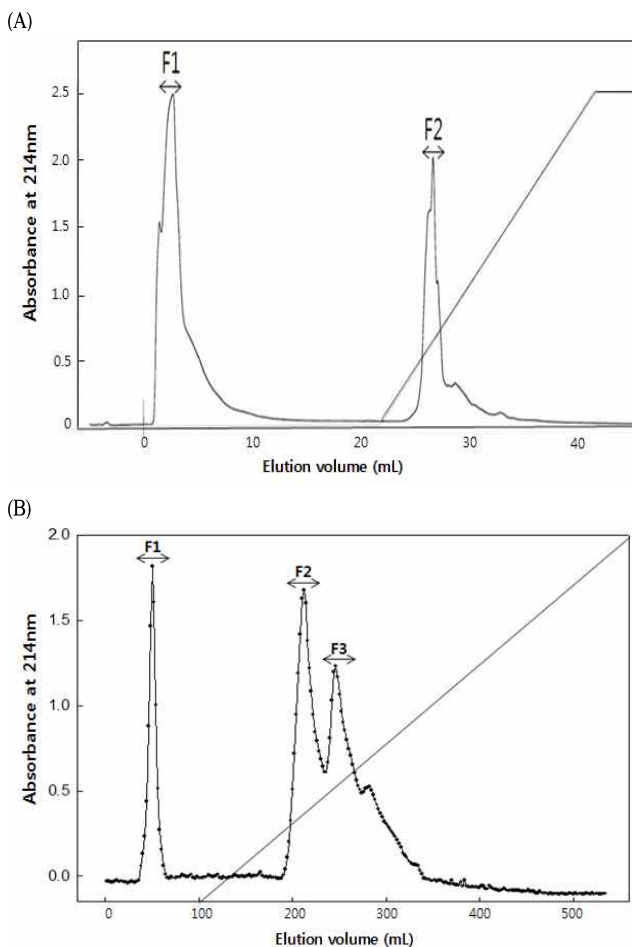


Fig. 2. Elution profile of (A) porcine meat and bone meal protein, and (B) the mussel protein hydrolysates from the anion exchange chromatography.

The absorbance was measured at 214 nm.

F2, F3의 3가지 major peak를 얻을 수 있었다(Fig. 2B). 각 분획에서의 염을 제거하기 위해 membrane을 이용하여 dialysis 과정을 거친 후, 3가지 분획에 대한 Ca 결합력 측정 결과, 각각 0.110, 0.097, 0.875로 나타났고, Mussel-F3에 대한 Ca 결합력이 가장 높은 것을 알 수 있었다(Table 1). 각 분획의 칼슘 결합력은 가수분해물의 분자량과 펩타이드의 아미노산 구성에 따라 달라지며, 특히 미네랄과 같은 금속이온과 결합 할 수 있는 친수기 등이 중요한 요소가 된다고 보고된 바 있다(18). 따라서 본 연구에서 칼슘 결합력이 높게 나타난 MBM-F2와 Mussel-F3의 경우, 타 분획에 비해 칼슘과 결합하는데 있어 긍정적인 영향을 미치는 아미노산이 포함되어 있다고 판단된다.

식품 단백질의 효소적 가수분해를 통해 분리한 Ca-binding peptide로는 명태 등뼈로부터 얻은 Val-Leu-Ser-Gly-Gly-Thr-Thr-Met-Ala-Met-Tyr-Thr-Leu-Val(23), 클로렐라의 Asn-Ser-Gly-Cys(27), 돼지혈장단백질의 Val-Ser-Gly-Val-Glu-Asp-Val-Asn(23), 새우 가공 부산물의 Thr-Cys-His(28) 등이

있다. Jeon 등(27)은 칼슘 결합에 Ser, Gly, Cys 등이 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있고, Choi 등(29)은 Glu와 Asp가 미네랄의 결합에 관여한다고 하였다. 또한 MBM과 mussel meat의 효소적 가수분해 결과 얻어지는 가수분해물의 경우 상기 아미노산들이 풍부하게 함유되어 있다고 판단된다(30,31). 따라서 본 연구 결과, Ca 결합력이 높게 나타난 펩타이드 분획 속에는 Ca binding에 관여하는 Ser, Gly, Cys, Glu, Asp 등이 존재할 것 이라고 생각되며, 이에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 기존 무기염 형태의 칼슘 보충제보다 더욱 안정적이고 체내 흡수율이 높은 생리활성 펩타이드에 대한 수요가 높아짐에 따라, 본 연구 결과 얻어진 MBM-F2와 Mussel-F3는 칼슘 결합 소재로의 활용이 가능하다고 판단된다.

Table 1. Ca-binding activity of the porcine meat and bone meal (MBM) and the mussel protein hydrolysates fractions

Fraction	Ca concentration (mM)	Peptide concentration (mM)	Ca/peptide	
MBM	F1	0.027±0.002 <sup>ab</sup>	0.148±0.001 <sup>a</sup>	0.184
	F2	0.024±0.001 <sup>b</sup>	0.029±0.002 <sup>b</sup>	0.840
Mussel	F1	0.029±0.001 <sup>a</sup>	0.259±0.001 <sup>a</sup>	0.110
	F2	0.025±0.001 <sup>b</sup>	0.260±0.001 <sup>a</sup>	0.097
	F3	0.028±0.001 <sup>a</sup>	0.032±0.001 <sup>b</sup>	0.875

<sup>1)</sup>All the values are mean±SD (n=3). The means in the same column followed by different letters are significantly (p<0.05) different in Duncan's multiple range test.

## 요 약

저활용 단백질로부터 칼슘 결합물질을 분리하기 위해 돼지 육골분과 진주담치 단백질을 단백질 분해 효소인 alcalase를 이용하여 가수분해물을 제조하였고, 체내 흡수가 용이한 3 kDa 이하로 한외여과 하였다. 돼지 육골분 가수분해물은 Mono Q 겔럼을 통해 분리하였고, 진주담치 가수분해물의 경우 Q-Sepharose로 분리 하여 각각 2개, 3개의 peptide fraction을 얻어 각 fraction의 칼슘 결합력을 측정 하였다. 그 결과 MBM F2와 Mussel F3에서 가장 높은 칼슘 결합력을 나타내었고, 따라서 본 연구 결과로 얻어진 가수분해물들은 칼슘 보충 소재로 활용될 수 있다고 판단된다.

## References

- Bass JK, Chan GM (2006) Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutr*, 22, 1057-1066
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium*,

- 38, 343-353
3. Miquel E, Farré R (2007) Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends Food Sci Tech*, 18, 139-143
  4. Poitou Bernert C, Ciangura C, Coupaye M, Czernichow S, Bouillot JL, Basdevant A (2007) Nutritional deficiency after gastric bypass : diagnosis, prevention and treatment. *Diabetes Metab*, 33, 13-24
  5. Guo L, Harnedy PA, Li B, Hou H, Zhang Z, Zhao X, FitzGerald RJ (2014) Food protein-derived chelating peptides : biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends Food Sci Tech*, 37, 92-105
  6. Bolarinwa OA, Olukosi OA, Adeola O (2012) Metabolizable energy value of porcine meat and bone meal for broiler chickens. *Can J Anim Sci*, 92, 73-78
  7. Kim SG, Lee SJ, Oh KS (2013) Food component characteristics of wild hard-shelled mussel *Mytilus coruscus* and cultured sea mussel *Mytilus edulis* in Korea. *Korean J Fish Aquat Sci*, 46, 717-724
  8. Cha YJ, Kim H, Jang SM (1998) Flavor and taste-active compounds in blue mussel hydrolysate produced by protease. *J Food Sci Nutr*, 3, 15-21
  9. Garcia RA, Phillips JG (2009) Physical distribution and characteristics of meat and bone meal protein. *J Sci Food Agr*, 89, 329-336
  10. Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY, Xu YF (2013) Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chem*, 138, 1713-1719
  11. Varelziz PK, Undeland I (2012) Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using an acid and alkaline solubilisation technique—process characteristics and functionality of the isolates. *J Sci Food Agr*, 92, 3055-3064
  12. Kim NH, Jung SH, Kim JH, Kim SH, Ahn HJ, Song KB (2014) Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. *J Korean Soc Appl Biol*, 57, 91-95
  13. Ekund A (1976) On the determination of available lysine in casein and rapeseed protein concentration using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) as a reagent of free  $\alpha$ -amino group of lysine. *Anal Chem*, 70, 434-439
  14. Nielsen PM, Petersen D, Dambrmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci*, 66, 642-646
  15. Wu H, Liu Z, Zhao Y, Zeng M (2012) Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. *Food Res Int*, 48, 435-441
  16. Gitelman HJ (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem*, 18, 521-531
  17. Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides : production and functionality. *Int Dairy J*, 16, 945-960
  18. Chen D, Mu X, Huang H, Nie R, Liu Z, Zeng M (2014) Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. *J Funct Foods*, 6, 575-584
  19. Charoenphun N, Cheirsilp B, Sirinupong N, Youravong W (2013) Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol*, 236, 57-63
  20. Lee JH, Choi DW, Song KB (2012) Isolation of calcium-binding peptides from barley protein hydrolysates. *Korean J Food Preserv*, 19, 438-442
  21. Mine Y, Shahidi F (2006) Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. CRP Press, NY, USA, p 3-9
  22. Jung WK, Lee, BJ, Kim SK (2006) Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *Brit J Nutr*, 95, 124-128
  23. Jung, WK, Karawita R, Heo SJ, Lee BJ, Kim SK, Jeon YJ (2006) Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochem*, 41, 2097-2100
  24. Lee SH, Song KB (2009) Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 52, 290-294
  25. Jung WK, Kim SK (2007) Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *Eur Food Res Technol*, 224, 763-767
  26. Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C (2000) Mineral-binding milk proteins and peptides : occurrence, biochemical and technological characteristics. *Brit J Nutr*, 84, 91-98
  27. Jeon SJ, Lee JH, Song KB (2010) Isolation of a calcium-binding peptide from chlorella protein hydrolysates. *J Food Sci Nutr*, 15, 282-286
  28. Huang G, Ren L, Jiang J (2011) Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. *Eur Food Res Technol*, 232, 281-287

29. Choi DW, Kim NH, Song KB (2012) Isolation of iron and calcium-binding peptides from cottonseed meal protein hydrolysates. *J Appl Biol Chem*, 55, 263-266
30. Parsons CM, Castanon F, Han Y (1997) Protein and amino acid quality of meat and bone meal. *Poultry Sci*, 76, 361-368
31. Silva VM, Park KJ, Hubinger MD (2010) Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. *J Food Sci*, 75, 36-42