

굴 가수분해물이 SD-Rat의 혈청과 간 균질물에 미치는 항산화 효과

허성익¹ · 박시향² · 이수선² · 정세영³ · 최영준^{1*}

¹경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

²선마린바이오테크

³경희대학교 약학대학

Anti-oxidative Effect of Oyster Hydrolysate on the Serum and Hepatic Homogenate in SD-rats

Sung-Ik Hur¹, Si-Hyang Park², Su-Seon Lee², Se Young Choung³, and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Dept. of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Sun Marine Biotech Co., Gyeongnam 650-160, Korea

³Dept. of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT This study is conducted to investigate the antioxidative effect of oyster hydrolysates in the serum and liver of SD-rats through the determination of lipid content, production of free radicals and antioxidant enzyme activities. Two different hydrolysates, Protamex-treated and Neutrase-treated hydrolysate with the cross-linking of protein by transglutaminase (TGPN group) and without (PN group), were fed for 6 weeks. TGPN hydrolysate in serum and liver significantly decreased the total cholesterol in the range of 26.1% to 28.9%, and triglyceride in the liver of up to 6.3%. Superoxide radical in the serum and lipid peroxide radical in the liver were significantly decreased in SD-rats fed 200 mg TGPN hydrolysate. Superoxide dismutase activity was significantly decreased in the liver of SD-rats. These results indicate that TGPN hydrolysate could scavenge the superoxide and hydroxyl radicals, and reduce the superoxide dismutase and catalase activities. The TGPN is also protected the oxidation of protein by the free radicals.

Key words: oyster hydrolysate, antioxidation, serum, liver, SD-rat

서 론

수산 식품 단백질에서 유래한 펩티드는 영양학적 품질과 물성의 개선에 기여할 수 있으며, 생체 내에서 광범위한 생리활성 효과를 나타낸다. 단백질 가수분해 펩티드의 기능성은 생체 내에서 진통, 마취, 장관 등의 평활근 수축, 식욕조절 등에 관여하는 opioid 펩티드, 면역 증강에 관여하는 phagocytosis 펩티드, 혈압강하에 관여하는 angiotensin I converting enzyme 저해 펩티드(1-4), 항콜레스테롤 효과(5), 항미생물 작용(6), 혈소판 응집을 저해하는 antithrombotic 펩티드(7)가 알려져 있다.

생체 내에서 대사반응, 여러 환경오염인자(VOCs, 환경호르몬, 중금속, 다이옥신 등) 및 자외선(UV: ultraviolet) 조사 등에 의한 산소 분자로부터 프리라디칼의 생성은 노화에 직접적으로 관여한다(8). 생체는 수퍼옥시드 라디칼(O₂⁻)과 히드록실 라디칼(OH)과 같은 프리라디칼 외에도 과산화수

소(H₂O₂)나 일중항 산소(¹O₂) 등의 활성 산소종들로부터 생체를 방어하기 위하여 vitamin E, vitamin C, ubiquinol, glutathione 등과 같은 항산화제가 존재하며, 또한 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase: SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase: GPX), 카탈라아제(catalase: CAT)와 같은 항산화효소를 합성하여 활성 산소종들을 제거한다. 한편 이들 프리라디칼은 아미노산과 상호 반응하여 산화 단백질을 생성하고 산화에 의한 지질 과산화물의 증가는 세포막의 손상과 단백질 기능손상은 물론 DNA 손상을 초래한다(9). 어패육 단백질 가수분해물의 항산화 효과와 관련하여 많은 연구가 이루어져 있으나(10-14), 굴 가수분해물과 관련해서는 subtilisin 가수분해물에서 얻은 펩티드 PVMGA와 QHGV가 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보인다는 최근의 *in vitro* 실험 결과(15)를 제외하고 동물실험을 통한 굴 효소 가수분해물의 항산화 효과를 조사한 경우는 거의 없다.

본 연구는 굴 효소 가수분해물을 첨가한 고지방 식이로 사육한 SD-rat의 혈청 및 간 균질의 콜레스테롤과 중성지질 및 자유라디칼의 함량과 항산화효소의 변화를 측정하여 굴 효소 가수분해물이 콜레스테롤과 중성지질의 감소 및 항산

Received 21 August 2013; Accepted 27 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr, Phone: 82-55-772-9143

화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 참굴(*Crassostrea gigas*; 각장, 5.8 ± 0.4 cm; 각고, 3.2 ± 0.4 cm; 체중, 9.8 ± 2.1 g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 2008~2009년에 걸쳐 채취하여 인근의 가공 공장에서 알굴의 형태로 급속 동결제품으로 가공하여 1~2년 동안 냉동보관 한 제품을 효소가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 상업용 효소 Neutrase 및 Protamex는 Biosis사(Busan, Korea)에서 구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)와 chymotrypsin은 각각 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)와 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

화학성분의 측정

냉동 굴과 동결건조 한 굴 가수분해물은 AOAC법(16)에 따라 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법 각각 함량을 측정하였으며, 조지방은 Folch 등(17)의 방법으로 측정하였다. Cl 함량은 Mohr법(18)으로 측정하였고, 가수분해도(DH)는 Lee 등(19)의 방법에 따라 측정하였다.

가수분해물의 제조

Jang의 방법(20)에 따라 transglutaminase(TGase)와 단백질 가수분해효소인 Protamex와 Neutrase를 이용하여 굴 가수분해물을 제조하였다. 가수분해물은 가교결합을 위해 TGase를 사용한 가수분해물(TGPN)과 사용하지 않은 가수분해물(PN)로 구분하였다.

양식산 굴을 1분 동안 끓는 물에 데친 후 2배량의 수도수를 가하고 8,500 rpm에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄물의 단백질 농도에 대하여 1%의 농도가 되도록 각각의 효소를 첨가하여 반응시켰다. 먼저 1% TGase를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 처리하여 가교결합을 형성시킨 후, 1% Protamex로 40°C에서 1시간 동안 가수분해하고 100°C에서 30분 동안 가열하여 효소를 불활성화하였다. 이어서 2차 가수분해효소인 1% Neutrase로 50°C에서 1시간 동안 2단 가수분해한 뒤, 같은 방법으로 효소를 불활성화하였다. 효소 가수분해 반응은 5 L Jar fermenter(Korea Fermenter Co., Daejeon, Korea)에서 150 rpm으로 교반하면서 실시하였다. 가수분해물은 $8,000 \times g$ 에서 25분간 원심분리(Hanil Supra 22K Plus, Hanil Scientific Industrial, Incheon, Korea) 하여 상층액을 회수하였다. 상층액에 최종농도 60%가 되도록 ethanol을 가하여 4°C의 저온실에서 1시간 방치한 후, 원심분리($8,000 \times g$, 25분) 하여 에탄올 불용성 물질과 침전 단백질을 분리하고 상층액은 $0.45 \mu\text{m}$ 의 막으로 여과하여 회전진공증발기(N-1 type, EYELA, Tokyo, Japan)

로 40°C 이하의 온도에서 ethanol을 증발시켰다. 농축액을 탈이온수에 완전히 용해시킨 후 5 kDa membrane 막을 장착한 한외여과기(8200, Amicon Co., Beverly, MA, USA)로 여과하고 진공동결기(SFDSM24, Samwon Industry Inc., Seoul, Korea)로 건조시켜 분말 상태로 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물의 사육

체중 160 ± 10 g의 수컷 Sprague Dawley계 rat을 한국 바이오제노믹스(Seongnam, Korea)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험 전에 실험동물은 항온항습($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 2\%$ RH) 하에서 12시간 사이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되는 동물 사육실에서 2주간 사육하였다.

실험에 사용한 사료의 조제는 사료 100 g당 탄수화물 58.0 g(corn starch 45.0%+ sucrose 13.0%), 단백질(sodium-free casein) 18.0 g, 지질(lard+ corn oil) 15 g, 셀룰로오스 3.0 g, vitamin mixture, mineral mixture, D,L-methionine, choline chloride, cholesterol, sodium cholate를 각각 1.0 g, 3.5 g, 0.3 g, 0.2 g, 0.5 g, 0.2 g씩을 혼합하여 사용하였다. 대조군은 기본 사료 조성을 사용하였고 실험군은 가수분해물 TGPN 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-100FG), TGPN 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-200FG), 가수분해물 PN 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-100FG), 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-200FG)의 5그룹으로 나누어 실험을 행하였다. 실험군의 사료는 기본사료조성에 시료 첨가량만큼 탄수화물에서 제외하였다(Table 1). 제조한 사료는 SD계 rat에 6주간 식이로 제공하여 실험을 실시하였다. 동물사료는 매일 오후 6시에 정한 사료량을 측정 후 제공하였다.

단백질 함량의 측정

혈청 및 간 조직 균질액의 총 단백질 함량은 Lowry 등(21)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 혈청 및 간 조직 균질액 20 μL 를 각각 취하여 1.0% SDS 12 μL 를 혼합하고, 증류수로써 120 μL 가 되도록 6배 희석한 다음, 희석한 용액 15 및 20 μL 에 각각 85 μL , 80 μL 의 증류수를 첨가하여 다시 희석하였다. 희석 용액에 반응시약(0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartrate solution : 2.0% sodium carbonate solution=0.5:0.5:49.0, v/v/v) 1.0 mL씩 첨가하여 약 10초간 혼합하고 20분간 실온에서 방치한 후, 0.1 mL의 1.0 N Folin 시약을 첨가하여 30분 후 520 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin으로 작성한 표준 검량곡선에 따라 단백질의 함량을 측정하였다.

생화학적 분석

실험사육 최종일에 12시간 동안 절식시킨 후 단두하여 채혈하였고, 채취한 각 혈액은 실온에 30분간 방치한 후

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Control	100FG ¹⁾	200FG ²⁾
Oyster hydrolysate (mg/kg BW/day)	–	0.010	0.020
Carbohydrates (starch+sugar)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)
Casein	18.0	18.0	18.0
Lipids (lard : corn oil=2:1)	15.0	15.0	15.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0
Vitamin mix ³⁾	1.0	1.0	1.0
Mineral mix ³⁾	3.5	3.5	3.5
<i>D,L</i> -Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	0.2	0.2	0.2

¹⁾100 mg/kg BW/day feeding group. ²⁾200 mg/kg BW/day feeding group. ³⁾AIN-76 mixture.

700×g에서 10분간 저온 원심분리 하여 얻은 혈청을 -70°C에 동결 보존하면서 분석하였다. 간 조직은 10배량(w/v)의 완충용액(10 mM phosphate buffer+1.15% KCl+5 mM EDTA, pH 7.4, 4°C)을 첨가하여 조직 균질로 균질화한 다음 700×g에서 원심분리 하고 상층액을 취해 간 조직 균질액으로 하였다.

혈청과 간 조직 균질액 중의 총콜레스테롤 함량은 Rudel과 Morris(22)의 방법에 따라 o-phthaldehyde법으로 측정하였다. 혈청과 간 조직 균질액 시료를 0.1 mL씩 취한 후 33% KOH 0.3 mL와 95% 에탄올 3.0 mL를 가하고 잘 혼합한 다음, 60°C의 수조에서 각각 15분과 60분 동안 가열시킨 후 냉각하였다. 혼합용액에 핵산 5.0 mL를 가하여 혼합하고 증류수 3.0 mL를 가한 다음 1분간 잘 혼합한 후 분리하여 취한 핵산층 1.0 mL를 질소로 농축·건조하였다. o-Phthaldehyde 시약 2.0 mL를 가하여 잘 혼합하고 10분 후 1.0 mL의 진한 황산을 첨가한 다음 90분 이내에 550 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량곡선에 따라 총콜레스테롤의 함량을 측정하였다.

혈청 중의 HDL-콜레스테롤 함량의 측정은 HDL-콜레스테롤(HDL-C 555, Shinyang diagnostics, Seoul, Korea)의 키트시약을 사용하였다. 시험관에 0.2 mL의 시료용액과 침전 시약 0.2 mL를 넣어 잘 혼합하여 10분간 방치 후 300 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액 50 µL, 표준용액(100 mg/dL) 50 µL, 공시험으로써 증류수 50 µL에 각각 HDL 발색시약 3.0 mL씩을 첨가하고 잘 섞은 후 37°C 수조에서 5분간 항온하였다. 발색용액은 공시험을 대조로 하여 555 nm에서 흡광도를 측정하여 HDL-콜레스테롤의 함량을 정량하였다. LDL-콜레스테롤의 함량은 Friedewald 등(23)의 방법에 따라 총콜레스테롤 함량에 HDL-콜레스테롤과 중성지질함량/5를 뺀 값으로 하였다.

혈청과 간 조직 균질액 중의 중성지질로서 트리글리세리드(triglyceride: TG)의 함량은 GPO 효소법으로 TG 키트시약(Shinyang diagnostics)을 사용하였다. 먼저 혈청 및 간 조직 균질액 10 µL, 표준용액(300 mg/dL) 10 µL와 공시험으로써 탈이온수 10 µL에 TG 키트시약 1.5 mL씩을 첨가

하고 잘 섞은 후 37°C 수조상에서 5분간 항온한 다음, 공시험을 대조로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 TG의 함량을 정량하였다.

동맥경화지표(Atherogenic index: AI)는 Haglund 등(24)의 방법에 따라 총콜레스테롤에 HDL-콜레스테롤의 함량을 뺀 다음, HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였다.

Atherogenic index (AI)=

$$\frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

산화단백질 생성량의 측정

산화단백질의 함량은 Levine 등(25)의 방법에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 mL의 시료에 30% trichloroacetic acid(TCA)를 0.5 mL 넣고 잘 혼합한 다음, 800×g에서 10분간 저온 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 남은 잔사에 10 mM dinitrophenyl hydrazine(DNPH)을 0.5 mL 첨가하고 15분마다 잘 혼합하면서 1시간 동안 실온에 방치한 후 800×g에서 10분 동안 저온 원심분리 하여 얻은 잔사에 ethanol/ethyl acetate(1:1, v/v) 3.0 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 10분 동안 방치하였다. 800×g에서 10분 동안 저온 원심분리 후 얻은 잔사에 1.0 mL의 6 M guanidine을 포함하는 20 mM phosphate 완충액(pH 7.0)을 첨가하고 37°C의 항온 수조에서 30분간 항온한 후 800×g에서 10분 동안 저온 원심분리 하여 상층액을 얻었다. Carbonyl group의 농도는 360 nm 파장에서 얻은 흡광도 값으로 분자흡광계수 22,000/M/cm를 이용하여 계산하였다.

프리라디칼의 측정

수퍼옥시드 라디칼의 생성량은 McCord와 Fridovch(26) 및 Chan과 Bielski(27)의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 포함하는 sodium phosphate 완충액(pH 7.8) 420 µL에 cyanide의 농도가 50 µM이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 혈청과 간 조직

균질액 300 μ L와 0.1 mM cytochrome C 50 μ L를 넣어 550 nm에서 2분 동안 흡광도의 차이를 측정하였으며, cytochrome C의 양은 분자흡광계수 19,500/M/cm로 계산하였다.

히드록실 라디칼 함량의 측정은 Halliwell과 Gutteridge (28)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험관에 0.1 M phosphate 완충액(pH 7.4), 10 mM의 NaN_3 , 7 mM의 deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl 시약을 각각 60 μ L씩 첨가하고 증류수 430 μ L와 혈청과 간 조직 균질액 200 μ L를 첨가한 후 혼합 용액을 37°C 수조에서 15분간 항온하였다. 혼합용액에 8.1% SDS 75 μ L, 20% acetic acid 500 μ L 및 증류수 25 μ L를 첨가하고 1.2% thiobarbituric acid(TBA) 용액 400 μ L를 넣어 잘 혼합하였다. 30분간 100°C에서 가열하여 식힌 후 800 \times g에서 5분간 원심분리 하여 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 표준검량곡선에 따라 검체군과 대조군의 흡광도 차이로 히드록실 라디칼의 생성량을 계산하였다.

혈청 및 간 조직 균질액 중의 과산화지질의 함량은 Choi와 Yu가 사용한 방법(29)에 따라 TBA법으로 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정하였다. 혈청과 간 조직 균질액 20 μ L에 증류수 180 μ L를 혼합한 액을 각 시험관에 취하고 8.1% SDS 200 μ L를 가하여 약 5초간 혼합한 후, 20% acetic acid 1.5 mL를 넣어 다시 5초간 혼합하였다. 혼합용액에 1.2% TBA 시약 1.0 mL 첨가하여 뚜껑을 닫은 후 30분간 수조에서 가열하였다. 800 \times g에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준검량 곡선에 따라 MDA의 함량을 정량하였다.

항산화 효소의 측정

Oyanagui(30)의 방법에 따라 혈청과 간 조직 균질액을 20.8 mM phosphate 완충액(pH 8.2)으로 30배 희석하고 희석된 균질액 100 μ L에 증류수 0.5 mL, A시약(52.125 mg hydroxylamine + 102.1 mg hypoxanthine/250 mL D.W) 0.2 mL, B시약(20 μ L xanthine oxidase + 0.9939 mg EDTA/26.7 mL, 20.8 mM phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 mL를 첨가하여 혼합하였다. 37°C 항온수조에서 40분간 가온한 후 C시약(300 mg sulfanilic acid + N-1-naphthyl ethylene diamine acid/500 mL 16.7% acetic acid) 2.0 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 따라 SOD 활성을 측정하였다.

Catalase 활성은 Rigo와 Rotilio(31)의 방법에 따라 측정하였다. 시험관에 혈청과 간 조직 균질액 20 μ L, 130 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0) 250 μ L, 증류수 330 μ L를 취하고 15 mM H_2O_2 900 μ L를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 즉시 240 nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 효소 활성은 1분 동안 과산화수소가 제거되는 속도로 측정하였다.

통계 처리

통계 분석은 JMP 통계 package(ver 7, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하였고, 분석 결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 실험군 간의 유의성은 one way ANOVA를 실행하여 검증하였고, 유의성은 Turkey test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

화학적분 및 혈청과 간 균질물 중 단백질 함량의 변화

TGPN 가수분해물의 조단백질 함량은 49.2%로서 PN 가수분해물에 비하여 5.5%가 높은 반면, 조지방 함량은 1.3%로서 PN에 비하여 4.4% 낮았다(Table 2). TGPN과 PN의 염소 함량은 각각 7.0%와 6.2%로서 큰 차이를 보이지 않았다. PN 가수분해물의 조지방 함량이 다소 높기 때문에 TGPN 가수분해물에 비하여 산화생성물로서 프리라디칼의 생성에 더 크게 기여할 것으로 추정된다. 한편 굴 가수분해물을 함유한 식이를 6주간 먹인 후 혈청과 간 균질물의 단백질 함량을 측정한 결과(Table 3, 4), 기본 식이를 제공한 대조군의 혈청 단백질 함량은 45.16 ± 2.25 mg/mL serum이었으나, TGPN-200FG 식이 섭취군과 PN-100FG 및 200FG 식이 섭취군의 경우는 단백질 함량이 감소하였다. 혈중 단백질 함량은 생체의 영양 상태를 보여 주는 것으로 TGPN 가수분해물 섭취군이 PN 가수분해물 섭취군보다 조금 높은 단백질 함량을 보였으나, TGPN이나 PN 가수분해물의 함량이 높을수록 단백질 함량이 감소하였다. 그러나 이 같은 결과를 초래하는 원인은 분명치 않다.

콜레스테롤의 함량에 미치는 영향

대조군에 대비하여 혈청 중의 총 콜레스테롤 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보였다(Table 3). 특히 TGPN-200 식이군에서 총콜레스테롤 함량은 79.04 ± 12.50 mg/dL로서 대조군에 비하여 28.9%의 유의적인 감소

Table 2. Proximate composition, Cl content and degree of hydrolysis (DH) of oyster hydrolysate (%)

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Cl content	DH
Raw	82.2 \pm 0.8	11.6 \pm 0.4	2.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	—	—
TGPN ¹⁾	13.3 \pm 0.7	49.2 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	11.0 \pm 0.7	7.0 \pm 0.1	35.1 \pm 0.3
PN ²⁾	7.6 \pm 0.3	43.7 \pm 0.2	5.7 \pm 0.7	10.5 \pm 0.1	6.2 \pm 0.2	32.3 \pm 0.3

¹⁾Lyophilized oyster hydrolysate treated by transglutaminase, Protamex and Neutrase in order.

²⁾Lyophilized oyster hydrolysate treated by Protamex and Neutrase in order.

Table 3. Effect of oyster hydrolysates on protein content, cholesterol and triglyceride of SD-rat serum for 6 weeks

Group	Protein (mg/mL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Artherogenic index (%)
Control	45.16±2.25	111.23±23.73	32.39±3.30	55.41±20.81	95.17±24.24	2.36±0.94
TGPN-100FG	46.77±2.54	109.49±28.52	29.43±6.92	44.87±21.55	92.93±18.38	2.41±1.44
TGPN-200FG	41.94±1.25*	79.04±12.50*	33.00±2.27	33.67±18.01*	90.00±10.60	1.57±0.47
PN-100FG	41.28±4.83	108.50±17.90	30.06±3.09	53.49±26.09	79.06±12.03	2.28±1.04
PN-200FG	39.96±4.21*	107.45±16.56	29.46±7.64	53.38±10.93	92.07±31.46	2.46±0.75

TGPN-100FG and 200FG: TGPN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group, PN-100FG and 200FG: PN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group. Mean±SD (n=7/group). *P<0.05.

Table 4. Effect of oyster hydrolysates on protein content, cholesterol and triglyceride of SD-rat liver homogenate for 6 weeks

Group	Protein (mg/mL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)
Control	74.63±2.69	54.88±3.73	212.81±12.38
TGPN-100FG	69.82±4.30*	52.57±6.46	199.36±5.96*
TGPN-200FG	68.35±3.54*	40.55±7.86*	196.70±18.55
PN-100FG	77.04±4.96	53.66±7.22	275.47±25.22*
PN-200FG	72.13±4.15*	51.42±6.19	235.47±13.22*

TGPN-100FG and 200FG: TGPN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group, PN-100FG and 200FG: PN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group. Mean±SD (n=7/group). *P<0.05.

효과가 있었다. 그리고 TGPN-100FG 그룹, PN-100FG 및 PN-200FG 그룹의 경우도 모두 1.6~3.4%의 콜레스테롤이 감소하였으나 유의성은 찾을 수 없었다. 이 같은 결과는 TGPN-200FG 가수분해물에 의한 혈청 콜레스테롤 함량의 저하 효과를 반영한다. 콜레스테롤을 저하시키는 기능성 식품은 HMG-CoA 환원효소 저해제, 저밀도 지단백질 수용체 활성제, acyl CoA:콜레스테롤 acyl 전이효소 저해제, 콜레스테롤-담즙산 흡수 저해제 및 콜레스테롤 ester 수송단백질 저해제로 분류할 수 있다(32). 대두 단백질 가수분해물 중 분자량 200~3,000 dalton의 분획은 LDL-R transcription 활성을 자극하고 세포내 콜레스테롤 합성의 감소와 이화를 증가시키며, 이 같은 생리활성은 isoflavones이 LDL-R transcription을 자극하지 않는 것에 미루어 대두 단백질의 펩티드에 기인하는 것으로 보고하였다(33). 간 조직 균질액의 콜레스테롤 함량은 혈청에서의 콜레스테롤 함량과 마찬가지로 대조군과 비교하였을 때 모든 실험군에서 감소하는 경향이였다(Table 4). TGPN-200FG 그룹은 총 콜레스테롤의 함량이 40.55±7.86 mg/dL로서 대조군에 비하여 26.1%까지 유의적으로 감소하였다. 혈청 중 대조군의 HDL-콜레스테롤 함량은 32.39±3.30 mg/dL이었으며, TGPN-200FG 식이군에서는 그 함량이 33.00±2.27 mg/dL로 1.9% 증가하였으나 유의성은 없었다. 이 같은 결과에 미루어 굴 가수분해물 식이는 HDL-콜레스테롤의 혈중 농도에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다. 그러나 TGPN 가수분해물 식이군에서 LDL-콜레스테롤의 혈중 농도는 감소하였으며, 감소 효과는 가수분해물의 첨가량에 비례하였다. 특히 TGPN-200FG 가수분해물 식이군에서 가장 많이 감소하였다. 대두 단백질 가수분해물에서 얻은 펩티드

FVVNATSN은 100 µM의 농도에서 비처리군에 비하여 간 세포의 LDL-R transcription을 248.8%까지 증가시키며(34), 0.5 g/kg BW 및 2.5 g/kg BW의 대두 단백질 저분자 가수분해물 식이의 쥐는 고콜레스테롤 식이의 쥐에 비하여 혈청의 LDL+VSDL의 수준을 각각 34%와 45% 감소시켰다(35). 본 연구의 결과, 굴 가수분해물의 혈중 및 간 조직에서 콜레스테롤의 저하 효과는 가수분해 펩티드에 의한 LDL-수용체 transcription 자극에 기인하는 것으로 추정되나, 자극 펩티드의 종류와 아미노산 서열을 확인할 필요가 있다.

동맥경화 지수는 대조군에 비하여 TGPN-200FG 그룹에서 33.5% 감소하였으나 표준편차가 커서 유의성을 찾을 수 없었다(Table 4). 혈액 중의 지질 함량 변화에 미루어 TGPN-200FG 가수분해물의 섭취가 혈중 지질을 효과적으로 개선하였음을 확인하였다. 이 같은 결과는 혈중 총 콜레스테롤의 감소에 기인한 것으로 보인다.

중성지질(TG)의 함량에 미치는 영향

모든 굴 가수분해 식이군에서 혈중 중성지질의 함량은 감소하는 경향을 보였다(Table 3). 중성지질(TG) 함량은 TGPN 가수분해물의 경우 2.4%에서 5.4%, PN 가수분해물의 경우는 3.3%에서 16.9% 감소하였으나 유의성은 없었다. 그리고 간 균질물의 경우 TGPN-100FG와 TGPN-200FG 그룹에서 중성지질 함량은 각각 6.7%와 8.2% 감소하였다(Table 4). TGPN 가수분해물 식이군의 경우 혈청과 간 균질물 모두에서 중성지질 함량이 감소하였다. 본 연구 결과는 어피 유래의 콜라겐 가수분해물 펩티드 식이군이 혈장 중 지질과 triglyceride 함량 수준을 낮춘다는 보고(36)와 일치

한다. 그러나 PN 가수분해물식이섭취군의 경우, 혈청의 중성지방 함량이 약간 감소하였으나 간 균질물의 경우는 대조군에 비하여 식이량이 증가함에 따라 큰 폭으로 증가하였다. 이 같은 증가는 PN 가수분해물의 높은 지방 함량에 기인한 것으로 추정된다.

단백질 산화에 미치는 영향

TGPN-200FG 첨가군은 대조군에 비하여 혈중 카르보닐 함량이 12.4% 감소한 반면, 간 균질물의 카르보닐 함량은 TGPN-100FG 식이군을 제외한 다른 군에서 다소 증가하였다(Table 5, 6). Carbonylation은 산화적 스트레스와 다른 기작에 의해 유발되는 carbonyl moieties의 형성을 포함하는 단백질의 불가역적이고 효소적인 수식이다. 카르보닐기는 4개의 경로, 즉 lysine, threonine, arginine 및 proline 측쇄의 직접적인 산화, 환원당의 존재 하에서 비효소적 glycation, α-amidation 경로 혹은 glutamyl 측쇄의 산화를 통한 펩티드 골격의 산화적 절단, 4-hydroxy-2-nonenal 혹은 malonaldehyde 같은 비단백질 카르보닐 화합물에 대하여 공유결합을 형성한다(37). 그리고 단백질 상의 카르보닐기 측정은 가장 널리 사용하는 단백질 산화의 지표이다(38). PN 가수분해물식이군에서 산화 단백질이 다소 증가한 것은 높은 지방 함량과 지방산화에 기인한 카르보닐 화합물과 단백질의 공유결합 증가에 기인하는 것으로 추정되나, 이를 증명하기 위해서는 단백질 산화경로에 따른 추적이 필요하다.

프리라디칼 생성에 미치는 가수분해물의 영향

활성산소 생성 기전 중 초기에 생성하는 수퍼옥사이드 라

디칼에 의한 산화적 손상을 측정하기 위하여 혈청과 간 균질물 중의 수퍼옥사이드 라디칼 함량을 측정하였다(Table 5, 6). TGPN-100FG와 TGPN-200FG 식이군의 혈청 중 수퍼옥사이드 라디칼의 함량은 대조군에 비해 각각 7.4%와 34.7%가 감소하였다. TGPN 가수분해물 그룹은 농도 증가에 따라 수퍼옥사이드 라디칼 함량이 감소하는 것에 미루어 TGPN 섭취가 수퍼옥사이드 라디칼 함량에 기여함을 확인하였다. 한편 간 균질물의 경우, 수퍼옥사이드 라디칼의 함량은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 같은 결과는 수퍼옥사이드 라디칼의 측정이 혈중 항산화 지표로 활용할 수 있음을 보여주며, TGPN이 항산화 반응의 초기에 관여하여 수퍼옥사이드 라디칼을 H₂O₂로 전환하거나 산소라디칼의 흡수에 기인한 것으로 보인다. 이 같은 사실은 혈청 중 수퍼옥사이드 dismutase의 활성 증가로 확인하였다. 산화 반응의 초기에 생성한 수퍼옥사이드 라디칼은 H₂O₂로 전환된다. H₂O₂는 조직 중에 존재하는 Fe²⁺와 반응하는 Fenton 반응을 통해 히드록실 라디칼(OH)을 생성하고 이렇게 생성된 히드록실 라디칼이 단백질의 여러 아미노산 잔기에 작용하여 카르보닐기를 생성하는 것으로 알려져 있다(9). β-Lactoglobulin 유래 펩티드는 산소 라디칼 흡수 능력을 가지며(39), 옥수수 Alcalase 가수분해물이 수용성 유리 라디칼을 안정시키는 능력은 펩티드 크기에 민감하지 않은 반면, 에탄올 가용성 프리라디칼과 수퍼옥사이드 음이온에 대한 능력은 분자량에 의존적이다(40).

혈청 내의 히드록실 라디칼의 함량은 대조군이 2.34±0.20 nmol/mg protein(100%)으로 TGPN 식이군에서는 감소하였으나, PN 가수분해물식이군은 약간 증가하였다. 그러나 모든 굴가수분해물에서 유의적인 증감은 나타나지 않

Table 5. Prevention of free radical groups in SD-rat serum by the oyster hydrolysate for 6 weeks

Group	Oxidized protein (nmol/mg-prot.)	Superoxide (nmole/g-prot.)	Hydroxyl (nmole/g-prot.)	Lipid peroxide (nmole/mg-prot.)
Control	13.47±1.19	266.23±60.96	2.34±0.20	1.04±0.27
TGPN-100FG	13.19±2.01	246.49±125.20	2.11±0.43	0.91±0.13
TGPN-200FG	11.98±2.34	173.82±75.25*	2.11±0.25	0.94±0.24
PN-100FG	13.47±2.75	340.88±156.82	2.57±0.41	1.07±0.15
PN-200FG	14.47±2.64	266.27±84.68	3.42±0.46*	1.04±0.21

TGPN-100FG and 200FG: TGPN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group, PN-100FG and 200FG: PN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group. Mean±SD (n=7/group). *P<0.05.

Table 6. Prevention of free radical groups in SD-rat liver homogenate by the oyster hydrolysate for 6 weeks

Group	Oxidized protein (nmole/mg-prot.)	Superoxide (nmole/g-prot.)	Hydroxyl (nmole/g-prot.)	Lipid peroxide (nmole/mg-prot.)
Control	0.84±0.27	64.79±24.36	16.18±2.77	15.65±3.34
TGPN-100FG	0.72±0.15	54.47±18.95	16.11±4.91	15.90±2.96
TGPN-200FG	1.01±0.37	57.31±14.63	15.88±1.06	8.45±3.23*
PN-100FG	0.87±0.42	56.15±15.09	16.51±1.85	15.24±5.32
PN-200FG	1.26±0.68	66.63±20.97	17.40±2.51	15.14±4.07

TGPN-100FG and 200FG: TGPN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group, PN-100FG and 200FG: PN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group. Mean±SD (n=7/group). *P<0.05.

Table 7. Effect of oyster hydrolysate on superoxide dismutase and catalase activity of SD-rat for 6 weeks

Group	Serum		Homogenate	
	Superoxide dismutase (unit/mg-protein)	Catalase (Δ Absorbance/min)	Superoxide dismutase (unit/mg-protein)	Catalase (Δ Absorbance/min)
Control	4.05 \pm 0.58	0.26 \pm 0.10	3.44 \pm 0.43	3.67 \pm 1.73
TGPN-100FG	4.26 \pm 0.38	0.30 \pm 0.10	3.43 \pm 0.37	3.68 \pm 1.47
TGPN-200FG	4.63 \pm 0.74	0.31 \pm 0.11	2.22 \pm 0.14*	2.66 \pm 0.90
PN-100FG	4.70 \pm 0.88	0.33 \pm 0.06	3.84 \pm 0.28	4.77 \pm 1.74
PN-200FG	5.48 \pm 0.60*	0.38 \pm 0.09	4.10 \pm 0.51*	4.17 \pm 1.76

TGPN-100FG and 200FG: TGPN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group, PN-100FG and 200FG: PN hydrolysates of 100 and 200 mg/kg added to control group.
Mean \pm SD (n=7/group). *P<0.05.

았다. 간 균질물에서 측정된 히드록실 라디칼 수준도 혈청과 마찬가지로 PN 가수분해물 식이군에서 다소 증가하는 경향이었으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 5, 6). 굴 유래 정제 펩티드는 세포내 라디칼을 소거하여 히드록실 라디칼이 원인인 DNA 손상을 보호한다(41). 홍합 발효물 유래 정제 펩티드는 수퍼옥사이드의 98%, 히드록실의 96%, 탄소 중심 라디칼의 91%, DPPH 라디칼의 72%를 소거하며, 54 μ M 농도에서 α -토코페롤보다 높은 지질 과산화 저해능을 보인다(42). 이상의 결과와 본 연구의 결과 사이에 큰 차이를 보이는 것은 정제 펩티드의 사용 여부와 *in vitro*와 *in vivo*의 결과 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

혈청 중 과산화 지질의 함량은 TGPN 가수분해물 식이군에서 감소하는 경향을 보였다(Table 5). 대조군에 비하여 TGPN 식이그룹은 과산화 지질의 함량이 약 9.5~12.5% 감소하였으나 유의성은 확인되지 않았다. 그리고 간 조직 균질물에서 TGPN-200FG 식이군의 과산화 지질 함량은 8.45 \pm 3.23 nmol/mg protein으로 크게 감소하였다(Table 6). 이 같은 결과는 굴 단백질의 가수분해 조건이 프리라디칼 소거능과 과산화 지질 수준의 감소에 큰 영향을 미치며, 이는 가수분해물을 구성하는 펩티드의 구조에 기인하는 것으로 추정된다.

항산화 효소 활성

TGPN-100FG와 TGPN-200FG 식이군의 혈청 수퍼옥사이드 dismutase 활성은 대조군에 비하여 각각 5.2%와 14.4%의 활성이 증가하였으며, 특히 PN-200FG는 35.3%까지 유의적으로 활성이 증가하였다(Table 7). 그리고 대조군 간 균질물 중의 수퍼옥사이드 dismutase 활성은 TGPN-200FG 식이군에서는 64.5%까지 유의적으로 감소한 반면, PN-200FG 식이군에서는 119.2%까지 유의적으로 증가하였다. 이 같은 결과는 TGPN 식이군인 경우 식이 펩티드에 의해 수퍼옥사이드 라디칼이 소거되거나 감소하여 수퍼옥사이드 dismutase의 발현이 감소한 반면, PN 식이군은 TGPN과 반대의 현상에 기인한 것으로 보인다. 라디칼 소거능과 라디칼 소거 효소의 활성은 식이 펩티드의 형태에 크게 의존함(40)에 미루어 펩티드를 구성하는 아미노산이 중요할 것으로 보인다.

Catalase 활성은 간 균질물에서 TGPN-200FG 식이군이 27.5% 감소한 경우를 제외하고, 다른 식이군에서는 catalase 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 PN-200FG 식이군은 혈청과 간 균질물에서 catalase 활성이 각각 146%와 113.6% 증가하였다. 이 같은 결과는 혈청과 균질물에서 히드록실 라디칼의 증가(Table 5, 6) 때문에 일어나는 이들 라디칼의 소거를 위한 효소 활성의 증가로 추정된다. 항산화 효소는 활성 산소를 안정된 물질로 전환시키는 역할을 하여 활성 산소를 제거하나 라디칼의 수준이 낮을수록 효소 활성의 발현이 낮아지는 것으로 보인다. 이상의 결과들에 비추어 TGPN 가수분해물은 활성 라디칼의 소거 작용을 통해 효소의 발현과 활성을 낮추는 것으로 보인다.

요 약

Sprague Dawley계 rat을 이용하여 굴 효소 가수분해물 함유식이 혈청과 간 균질액에 미치는 항산화 효과를 조사하였다. 식이 그룹은 대조군과 실험군으로써 TGPN 굴 효소 가수분해물 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-100FG), TGPN 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-200FG), PN 가수분해물 시료 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-100FG), 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-200FG) 5 그룹으로 나누어 6주간 식이를 제공하여 실험하였다. 총 콜레스테롤은 TGPN-200FG 식이군이 혈청과 간 균질액에서 각각 28.9%, 26.1%까지 유의적으로 감소하였으며, 간 균질물의 중성지질은 TGPN-100FG 식이군에서 6.3%까지 유의적으로 감소하였다. 수퍼옥사이드 라디칼은 TGPN-200FG에서 유의적으로 34.7% 감소하였다. 굴 가수분해물 TGPN-200FG는 수퍼옥사이드 및 히드록실 라디칼을 소거함으로써 라디칼 소거에 관여하는 효소의 활성 수준을 감소시키며, 단백질 산화를 억제하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 2011년도 기술사업화 지원사업(과제번호 811001-3)에 의해 이루어진 것입니다. 이에 감

사드립니다.

REFERENCES

- Herregods G, Camp JV, Ghesquiere B, Gevaert K, Ver-cruysse L, Dierckx S, Quanten E, Smagghe G. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides. *J Agric Food Chem* 59: 552-558.
- Lee JK, Jeon JK, Byun HG. 2011. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. *Food Chem* 125: 495-499.
- Balti R, Nedjar Arroume NN, Adje EY, Guillochon D, Nasri M. 2010. Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *J Agric Food Chem* 58: 3840-3846.
- Dai ZY, Zhang YP, Zhang H, Lu YB. 2010. Preparation and characterization of mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysates with angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity by enzymatic hydrolysis. *J Food Biochem* 36: 66-74.
- Park JH, Lee JE, Kim SM, Kwak HS. 2009. Cholesterol lowering effect of enzymatic hydrolysates of squid in rats. *Food Sci Biotechnol* 18: 1541-1544.
- Liu Z, Dong S, Xu J, Zeng M, Song H, Zhao Y. 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelain. *Food Control* 19: 231-235.
- Kim SK, Ngo DH, Vo TS, Ngo DN. 2013. Pharmacological effects of marine-derived bioactive peptides. In *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*. Kim SK, ed. CRC press, Boca Raton, FL, USA. p 107-117.
- Harman D. 1984. Free radical theory of aging: the free radical diseases. *AGE* 7: 111-131.
- Aniya Y, Naito A. 1993. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharm* 45: 37-42.
- KO JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food Chem Toxicol* 52: 113-120.
- 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.
- Zhong S, Ma C, Lin YC, Luo Y. 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chem* 126: 1636-1642.
- Nalananon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate thredfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem* 124: 1354-1362.
- Theodore AE, Raghavan S, Kristinsson HG. 2008. Antioxidation activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *J Agric Food Chem* 56: 7459-7466.
- Wang Q, Li W, He Y, Ren D, Kow F, Song L, Yu X. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oyster (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chem* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.099>.
- AOAC. 1990. *Official method of analysis of AOAC*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. 900.02A, 955.04, 950.46, 968.08.
- Floch J, Lee M, Solane-Stanley CH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- MFDS. 2011. *Food code*. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p 1-1-61.
- Lee SS, Park SH, Park JD, Konno K, Choi YJ. 2012. Functionalities of squid liver hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1677-1685.
- Jang YB. 2007. Application in foodstuffs and functional characteristics of oyster hydrolysates. *PhD Dissertation*. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Lowry OH, Roseborough NJ, Farr LA, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Rudel LL, Morris MD. 1973. Determination of cholesterol using o-phthaldehyde. *J Lipid Res* 14: 364-366.
- Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparation ultracentrifuge. *Clinic Chem* 18: 499-502.
- Haglund O, Luostarinen R, Wallin R, Wibell L, Saldeen T. 1991. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *J Nutr* 121: 165-169.
- Levine RL, Garland CN, Oliver AA, Climent AG, Lenz BA. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464-478.
- McCord JM, Fridovch I. 1969. Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- Chan PC, Bielski BHJ. 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J Biol Chem* 249: 1317-1319.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1981. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Letter* 128: 347-350.
- Choi JH, Yu BP. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *AGE* 13: 61-64.
- Oyanagui Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 42: 290-296.
- Rigo A, Rotilio G. 1977. Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal Biochem* 81: 157-166.
- Chen ZY, Jiao R, Ma KY. 2008. Cholesterol lowering nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem* 56: 8761-8773.
- Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH. 2007. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 55: 1599-1604.
- Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH. 2008. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. *J Agric Food Chem* 56: 4372-4376.
- Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Internal* 40: 661-667.
- Saito M, Kiyose C, Higuchi T, Uchida N, Suzuki H. 2009.

- Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agric Food Chem* 57: 10477-10482.
37. Estevez M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci* 89: 259-279.
38. Breusing N, Grune T. 2010. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp Gerontol* 45: 733-737.
39. Hernandez-Ledesma B, Amigo L, Recio I, Bartolome B. 2007. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *J Agric Food Chem* 55: 3392-3397.
40. Tang X, He Z, Dai Y, Xiong YL, Xie M, Chen J. 2010. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 58: 587-593.
41. Qian ZJ, Jung WK, Byun HG, Lim SK. 2008. Protective effect of an antioxidative peptides purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas*, against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technol* 99: 3365-3371.
42. Rajapakse N, Mendis E, Jung WK, Je JY, Kim SK. 2005. Purification of radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Internal* 38: 175-182.