

Characteristics of iron powder formulation produced from porcine blood by enzymatic treatment

Mi-Yeon Kim¹, MinA Kim¹, Yong-Jin Jeong^{1,2*}

¹KMF Co., Ltd., Daegu 41065, Korea

²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

호소 처리한 돈혈 활용 철분분말제제 특성

김미연¹ · 김민아¹ · 정용진^{1,2*}

¹(주)케이엠에프, ²계명대학교 식품보건학부

Abstract

In this study, enzyme (thermoase) hydrolysis was applied to the porcine blood order to increase the iron content and solubility. It was confirmed that content of iron was increase up to 158.11 mg/100 g porcine powders after 0.2% thermoase treatment at 60°C during 4 hr. The solubility of porcine blood powders was higher than other enzyme (various protease), temperature, reaction time. This optimized conditions were also worked to the *in vitro* iron bioavailability rate increasement, the bioavailability of hydolyzed porcine powders was 3-fold higher than that of an iron supplement on the market. These results indicate the possibility of porcine blood powder in iron supplements market as natural material. Also utilizing of reduced porcine blood will be possible to improve environmental issues.

Key words : porcine blood, iron powder, protein hydrolysis condition, iron bioavailability

서 론

철분은 성인 기준 체중의 약 8% 구성하는 혈액 중에서 헤모글로빈의 구성성분으로 산소 운반에 필수적인 역할을 하며(1) 인체 내 약 3 g 정도를 차지하고 있다고 알려져 있다. 이러한 철분의 결핍은 부적절한 식단 유지, 체내 철분 흡수의 불량, 혈액 손실, 반복되는 임신 등의 이유로 인하여 영·유아 및 가임기 여성에게서 흔하게 발생한다(2). 철분은 생체 내에서 이루어지는 거의 모든 대사에 필수적인 성분이지만(3) 식품을 통한 철분 섭취는 흡수율이 10~30% 정도로 낮은 편이며, 그 이용률은 체내 철분 저장량, 식이인자 등에 의해 영향을 받는다(1). 부족한 철분의 보충을 위하여 복용하는 철분제는 대부분 염화 제 2철, 구연산 철, 피로

인산 제 2철 등의 철 화합물을 이용한 합성철분제가 차지하고 있다(4). 합성철분제의 경우 무기철 성분으로 철의 함량이 높고 저렴한 장점이 있는 반면, 생체 흡수율이 낮고 과다 복용시 철분 중독 증상 또는 위장 장애를 발생시키는 단점이 있다(5). 체내 이용률 증가 및 부작용 감소를 위한 천연철분제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 원료로 말의 비장에서 추출한 페리친 제제(6), 소 또는 돼지의 혈액에서 추출한 헴철 등이 이용되고 있다(7). 현재 판매되는 천연철분제 또는 그 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어(8) 국내에서도 가축의 혈액을 원료로 하여 철분제 개발이 필요한 실정이다.

일반적으로 돼지 1마리당 2.3 L의 혈액이 방출되며, 2014년 기준 연간 약 3만 5천 톤의 폐혈액의 처리에 들어가는 비용은 약 227,100천원에 달하는 것으로 보고되었으며, 이는 도축 비용 처리 문제뿐만 아니라 환경오염, 위생 등의 문제와도 관련성이 높다(9). 이러한 도축 폐기물인 혈액을 활용하기 위한 방안으로 혈액을 이용한 기능성 소재(10), 아미노산제제로서의 활용(11), 항고혈압 식품소재용 ACE 저해 펩타이드 소재연구에 대한 보고가 있었으며(12), 효소

*Corresponding author. E-mail : yjjeong@kmu.ac.kr

Phone : 82-53-580-5557, Fax : 82-53-580-6477

Received 1 June 2016; Revised 20 June 2016; Accepted 21 June 2016.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

를 이용한 가수분해 처리에 의한 돈혈 분말에서 무기질 성분이 풍부하게 존재하는 것을 확인한 바가 있다(13). 덴마크에서는 돈혈의 혈장을 식품첨가물로 가공하여 사용하고 있고(14) 일본에서도 돈혈을 이용한 철분 보충제제가 판매되고 있는 등 돈혈의 이용이 확대되고 있으며 이로 돈혈로 제조한 철분제의 가능성을 크다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 돈혈의 철분을 다양하게 활용하기 위하여 단백질 분해효소를 이용하여 생체이용률이 높은 철분제를 제조하고, 그 특성에 관한 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 돈혈은 2015년 2월에서 3월 사이 3차례에 걸쳐 공급받았으며, 공급받은 샘플은 혈액의 응고방지를 위하여 구연산나트륨(DAEJUNG, Siheung, Korea)을 첨가하여 냉장소에서 보관하며 1~2일 내로 사용하였다. 가수분해효소는 현재 시판되는 Alcalase, Protamex, Esperase, Neutrase, Thermoase 및 Flavourzyme의 단백질 가수분해효소를 사용하였다. Alcalase와 Neutrase는 Novo 사(Novo Nordisk, Bagsvared, Denmark)에서 구입하여 사용하였고, 나머지 효소는 Sein Corporation Ltd.(Daegu, Korea)에서 제공받아 사용하였다.

효소처리 및 시료준비

돈혈의 가수분해를 위한 효소처리는 동일한 혈액의 양에 단일 처리시 0.2%, 복합 처리시 0.1%를 각각 첨가하여 진탕배양기(Maxturdy 45, Wisd, Wonju, Korea)에서 공통 최적 활성온도인 55°C로 100 rpm으로 진탕하며 4시간 동안 가수분해 한 다음 60°C에서 열풍 건조한 뒤 분쇄하여 1 mm sieve로 거른 돈혈분말 시료를 직사광선을 피한 서늘한 곳에서 보관하며 실험하였다.

총 고형분 함량, pH 및 색도 측정

총 고형분 함량은 digital refractometer(Pal-3, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고 pH의 측정은 pH meter(ST3100, OHAUS, Parsippany, NJ, USA)를 이용하여 실온에서 측정하였다. 돈혈분말의 용해도 확인을 위하여 증류수 10 mL에 돈혈분말 0.1 g을 용해한 뒤 액상의 색도를 측정하였다. 색도 측정은 UV-spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였으며 UV PC optional color analysis software를 이용해 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 값으로 변환하여 Hunter's color value로 나타내었다. 이 때 대조구는 증류수를 사용하였으며 L=99.99, a=-0.11, b=-0.02의 값으로 측정되었다.

무기질 함량

돈혈 분말의 무기질 함량은 습식분해법(wet digestion method)(15)으로 분석하였다. 시료 1 g에 65%의 HNO₃ 6 mL와 30% H₂O₂ 1 mL를 teflon bottle에 담은 후 이를 전처리 시험용액으로 하며, microwave digestion system(Ethos-1600, Milestone, Sorisole, Italy)을 이용하여 최고 600 W로 총 20분간 산분해를 실시한 다음, 전처리 과정을 거친 시료용액을 0.45 μm membrane filter(Milipore, New York, NY, USA)로 여과하여 유도결합플라즈마 원자방출분광기(ICP-IRIS, Thermo Elemental, Waltham, MA, USA)로 분석하였다.

In vitro 철분 분말의 생체이용률 측정

돈혈분말의 생체 내 이용률을 측정하기 위하여, Miller 등(16)의 방법으로 실험하였다. 실험에 사용된 돈혈 분말의 양은 미리 측정된 분말 내 철분 함유량을 철분의 1일 권장섭취량 기준(최대 14 mg)으로 환산하여 사용하였다. 환산된 돈혈 분말과 증류수의 무게 합을 100 g으로 하여 용해한 다음 6 N HCl을 이용하여 pH 2로 보정하였으며 0.1 N HCl에 녹아있는 16% pepsin 용액을 0.5% (w/w) 첨가하여 37°C 진탕배양기(Maxturdy 45, Wisd, Wonju, Korea)에서 2시간 동안 진탕시켰다. 진탕 완료된 시료 20 g을 투석막(dialysis tubing cellulose membrand, Sigma)이 모두 잠길 수 있는 비이커(약 250 mL)에 넣고 3차 증류수 25 mL과 0.5 N NaHCO₃가 함유된 투석막을 잠기도록 넣은 후 pH 5에 도달할 때 까지 37°C 진탕배양기에서 75 rpm으로 진탕시켰다. 이때 0.5 N NaHCO₃는 진탕 완료한 시료 20 g에 pancreatin-bile extract mixture을 5 mL 혼합하고 0.5 N KOH를 이용하여 pH 7.5로 보정한 양과 동일하게 첨가하였다. pH 5에 도달된 시료에 pancreatin-bile extract mixture 5 mL 첨가 후 37°C 진탕배양기에서 75 rpm으로 2시간 추가 진탕시켰다. 진탕 종료 후 투석막 안의 투석액을 membrane filter(pore size 0.45 μm, Advantec MFS, Tokyo, Japan)를 이용하여 철분생체이용률을 측정하였다. 돈혈분말로 만들어진 철분 보충제의 우수성을 확인하기 위하여 판매중인 철분 보충용 제품 1제품을 시중에서 구입하여 같은 방법으로 측정하여 비교하였다. In vitro 철분 생체이용률은 아래의 식을 따라 계산하였다.

$$\text{In vitro iron bioavailability rate(\%)} = \frac{\text{Iron content of dialysate}}{\text{Total iron content of sample}} \times 100$$

결과 및 고찰

가축의 폐기 혈액을 이용하여 각종 단백질 및 아미노산을 제조하는 연구는 다양한 분야에서 보고되어 있으며 최근

혈액 내 철분을 분리하여 철분제제로서의 개발 가능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 대부분의 연구는 혈액 내 철분, 특히 헴철을 추출하여 분리, 정제하는 등의 방식을 취하고 있다(4). 본 연구에서는 도축 후 폐기되는 돈혈을 활용한 철분분말제 개발을 위하여 단백질 분해 효소를 이용하여 돈혈 분말을 제조한 뒤 각 분말의 품질특성, 무기질 함량 및 용해도 확인을 위한 색도 측정 등을 통해 철분함량 및 용해도가 높은 철분분말 제제 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

총 고형분 함량, pH 및 색도 측정

국내 도축장에서 수급 받은 혈액에 6종의 단백질 가수분해 효소를 처리하여 pH, 총 고형분 함량 및 무기질 분석을 실시한 결과를 Table 1, 2에 나타내었다. 분석 결과 6종의 가수분해 효소 처리시 pH는 Thermoase 처리시 pH 6.65로 가장 낮게 측정되었으며, 총 고형분 함량은 6종의 효소처리 구간에서 모두 증가하였고 Thermoase 처리구에서는 2배 정도 증가한 것을 확인하였다. Kim 등(17)은 단백질 가수분해 효소 처리과정 중 총 고형분의 함량이 처리하지 않은 구에 비하여 상승하였다고 보고하고 있으며, Noh 등(18) 또한 상업적 효소를 이용한 가수분해 후 총 고형분 함량이 증가하였다고 보고하고 있어, 본 결과와 유사하였다. 무기

Table 1. pH and soluble solid of porcine blood hydrolysates treated with various enzymes

Kinds of protease	pH	Soluble solid (°Brix)
Control	7.54±0.04 ¹⁾	11.67±0.51
Alcalase	7.29±0.03	12.25±0.64
Protamex	7.55±0.20	13.15±0.07
Esperase	7.29±0.06	12.15±0.49
Neutrase	7.43±0.05	12.30±0.00
Flavourzyme	7.38±0.07	12.60±0.14
Thermoase	6.65±0.10	22.93±0.15

¹⁾Mean±SD (n=3).

Table 2. Mineral contents of porcine blood hydrolysates treated with various enzymes

Kinds of protease	Mineral contents (mg/100 g)					
	Fe	Ca	K	Mg	Na	Zn
Control	82.05	49.95	252.57	18.31	955.03	1.03
Alcalase	82.99	70.99	1180.39	22.87	1143.85	1.22
Protamex	90.23	66.28	1189.79	25.97	1744.46	1.20
Esperase	108.37	69.66	1071.04	23.28	1447.83	1.27
Neutrase	95.65	71.10	1129.82	22.84	1526.47	1.32
Flavourzyme	82.99	70.99	1180.39	22.87	1483.35	1.22
Thermoase	110.00	63.86	1129.89	26.42	1712.81	1.42

질 분석 결과, 효소처리시 Fe, Ca, K, Mg, Na, 및 Zn 함량이 Esperase 처리구에서 약 30% 높게 측정되었으며, Fe 흡수를 돕는 Zn의 경우 약 28% 높게 측정되었다. 용해도 확인을 위해 각 돈혈 분말을 1% (w/w) 농도로 증류수에 용해시켜 확인한 결과 Thermoase 처리시 가장 용해도가 높은 것으로 확인되었다.

무기질 함량

Thermoase를 이용하여 돈혈의 분리도에 따른 무기질 분석 및 용해도 평가를 진행하였으며 그 결과는 Table 3, 4에 나타내었다. 돈혈의 전혈, 응고혈 및 응고혈을 제외한 잔혈을 이용하여 동일한 조건에서 Thermoase를 처리한 결과, 전혈에 Thermoase를 처리한 구에서 158.11 mg/100 g으로 Fe 함량이 가장 높은 것을 확인하였다. 용해도 확인을 위한 1% 용해액의 색차 측정 결과 전혈의 Thermoase 무처리구 색차값인 69.44보다 감소한 것으로 나타났다.

In vitro 철분 분말의 생체이용률

Thermoase 0.2%, 4시간처리 후 열풍건조 조건 하에서 돈혈분말을 제조하여 생체이용률을 확인하였으며 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 선정된 시중의 철분 보조제와의 비교한 결과, 돈혈 분말은 22.00%의 체내흡수율로, 시중의 철분 보조제의 체내 생체이용율 7.50%보다, 약 2.9배 높은 것으로 나타났다.

Table 3. Mineral contents of each porcine blood hydrolysate treated with 0.2% Thermoase

Condition	Mineral contents (mg/100 g)						
	Fe	Ca	K	Mg	Na	Zn	
Whole blood	Control	117.99	46.70	196.19	22.07	1045.77	1.31
	Thermoase	158.11	59.71	877.66	31.85	1875.55	1.81
Coagulated blood	Control	30.92	32.71	155.84	24.91	581.64	1.41
	Thermoase	51.33	37.17	283.62	25.45	459.03	1.49
Remainder blood	Control	45.60	77.66	196.67	16.00	901.08	1.36
	Thermoase	48.75	74.47	122.09	13.26	531.83	1.08

Table 4. Hunter's color value of each porcine blood hydrolysate treated with 0.2% Thermoase

Condition	Hunter's color value ¹⁾				
	L	a	b	ΔE	
Whole blood	Control	65.22±0.01 ²⁾	4.00±0.02	23.49±0.00	69.44±0.01
	Thermoase	33.26±0.00	27.96±0.01	19.70±0.00	47.71±0.00
Coagulated blood	Control	67.85±0.00	8.36±0.00	25.66±0.01	73.02±0.00
	Thermoase	31.32±0.01	31.94±0.00	19.22±0.01	48.69±0.01
Remainder blood	Control	30.14±0.00	27.74±0.00	18.68±0.01	45.02±0.00
	Thermoase	34.64±0.00	27.64±0.01	20.32±0.00	48.75±0.00

¹⁾Solution of 1% DW.

²⁾Mean±SD (n=3).

즉, 폐기되는 돈혈의 철분제제로서의 활용 가능성 검토 결과, Thermoase 0.2%, 4시간 처리 후 열풍건조를 거친 돈혈 분말에서 Fe, Zn 등의 무기질 함량 및 용해도가 증가하는 것을 확인하였다. *In vitro* 생체이용률에서도 판매중인 제품에 비해 약 2.9배가 높으므로 돈혈의 철분제제로서의 개발 시 생체이용률이 높을 것으로 판단된다.

가공처리가 간단하여 도살 직후 폐혈액을 수급하여 가공처리가 가능한 장점과 열풍건조를 거친 분말형태를 통하여 폐혈액의 활용도를 증가시킬 수 있을 것으로 기대되므로, 혈액 부산물 활용에 대한 제도적인 개선이 이루어져야 하며, 생체이용률이 높으면서도 저렴한 철분제에 대한 연구가 계속적으로 보고되고 있는 만큼(19-22) 현재 시중 판매 중인 제품과의 차별성에 대한 보완 연구가 진행되어야 할 것이다. 특히, 특유의 향 개선에 대한 제제연구가 추가적으로 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 돈혈 수급에 있어서 구제역 등의 여파로 인해 일정한 공급이 원활하지 않고, 공급 루트 자체가 정형화 되지 않은 점 등의 문제점으로 인하여 철분제의 대량 생산시 어려움이 있을 것으로 예상된다. 2014년 농림축산식품부 및 농림축산검역본부 주체로 도축장 식육부산물 위생관리 매뉴얼이 발간되어 도축장의 위생관리감독 및 유통관리감독의 체계가 구축됨에 따라 추후 추가 연구 및 관리의 병행이 이루어진다면 국내 철분시장에서의 돈혈을 이용한 고부가가치 제품 창출에 도움이 될 것으로 판단된다.

Table 5. *In vitro* iron bioavailability rate of porcine blood powder and iron supplement

Contents	Iron contents in dialysis membrane (mg/kg)	<i>In vitro</i> iron bioavailability rate (%)
Porcine blood powder ¹⁾	3.08	22.00
Iron supplement ²⁾	1.06	7.57

¹⁾Treated with Thermoase 0.2% in porcine whole blood, heating at 60°C during 4 hr and treated hot air drying.

²⁾Iron supplement in the market.

요 약

본 연구에서는 도축장에서 폐수 처리되는 돈혈을 활용하여 단백질 분해 효소 처리를 하여 철분함량 및 용해도가 높은 철분분말을 제조하고자 하였다. 철분함량을 높이기 위하여 효소처리 및 혈액 분리 정도에 따른 돈혈 분말의 품질특성을 분석하였고, 그 결과 수급 받은 돈혈의 전혈에 Thermoase 0.2%를 첨가한 후 60°C에서 4시간 처리하여 여과, 열풍건조처리를 하였을 때 철분함량이 110.00 mg/100 g으로 가장 높은 것으로 확인되었으며, 재수화성 역시 높은 것을 확인하였다. 또 철분 보조제로써 활용 가능 여부를

확인하기 위하여 최종조건에 따라 제조된 돈혈분말의 생체이용률을 측정하였으며, 대표적인 시중 판매 제품 보다 2.9배 높은 것으로 확인되었다. 따라서 영양학적 가치가 있는 돈혈을 활용하여 철분분말을 제조한다면, 수입에 의존하고 있는 철분시장에 국내산 천연재료 공급이 가능할 뿐만 아니라 이의 폐기처리로 인한 비용처리 및 환경오염을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2015년도 농림수산식품기술기획평가원의 과제 지원으로 수행된 연구에 의한 것입니다.

References

1. Kye SH, Paik HY (1993) Iron nutriture and related dietary factors in apparently healthy young Korean women (2): analysis of iron in major food items and assessment of intake and availability of dietary iron. *Korean J Nutr*, 26, 703-714
2. Kye SH, Paik HY (1993) Iron nutriture and related dietary factors in apparently healthy young Korean women (1): comparison and evaluation of blood biochemical indices for assessment of iron nutritional status. *Korean J Nutr*, 26, 692-702
3. Bezkorovainy A (1989) Biochemistry of nonheme iron in man. II. Absorption of iron. *Clin Physiol Biochem*, 7, 53-69
4. Kang IK, Chae HJ, In MJ, Oh NS (2003) A manufacturing processes of enriched heme iron. *Food Industry and Nutrition*, 8, 43-50
5. Carpenter CE, Mahoney AW (1992) Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 31, 333-367
6. Shim YH, Ha WH, Cho JH, Kim DH, Kim YL, Kim HJ (2002) Identification of ferritin using immunodiffusion methods. *Kor J Pharmacogn*, 33, 257-261
7. Lebrun F, Bazus A, Dhulster P, Guillochon D (1998) Solubility of heme in heme-iron enriched bovine hemoglobin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 46, 5017-5025
8. Cho HJ, Lee HS, Jung EY, Park SY, Lim WT, Lee JY, Yeon SH, Lee JC, Shu HJ (2010) Manufacturing of iron binding peptide using sericin hydrolysate and its bioavailability in iron deficient rat. *J Korean Soc Food*

- Sci Nutr, 39, 1446-1451
9. Kim GE (2014) Protein degradation in waste blood for liquid fertilizer production. J Korean Soc Urban Environ, 14, 127-134
 10. Ockeman HW, Hansen CL (1988) Blood utilization. In: Animal By-product processing & Utilization, CRC press LLC, Washington, DC, p. 325-353
 11. Park GH (1997) Optimum drying condition for slaughter porcine blood and its utilization as broiler diets. Korea J Poultry Sci, 24, 59-66
 12. Hyun CK, Shin HG (1999) Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine blood plasma proteins. Korean J Biotechnol Bioeng, 14, 600-605
 13. Park JY, Kim MY, Jeong YJ (2016) Changes in physicochemical characteristics of porcine blood under various conditions of enzyme hydrolysis. Korean J. Food Preserv, 23, 413-421
 14. Choi JP (2013) Animal byproduct (blood) current status & usage. Food Science and Industry of Animal Resources, 2, 2-7
 15. Hugli TE, Moore S (1972) Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. J Biol Chem, 247, 2828-2834
 16. Miller DD, Schrick BR, Rasmussen RR, Campen DV (1981) An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. Am J Clin Nutr, 34, 2248-2256
 17. Kim JH, Yoo CJ, Sin KA, Jang SY, Park NY, Jeong YJ (2011) Changes in properties of deer antler by proteolysis and extraction conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 89-93
 18. Noh JE, Yoon SR, Lim AK, Kim HJ, Huh D, Kim DI (2012) A study on the yield of functional components of citrus peel extracts using optimized hot water extraction and enzymatic hydrolysis. Korean J Food Cookery Sci, 28, 51-55
 19. Ait-Oukhatar N, Peres JM, Bouhallab S, Neuville D, Bureau F, Bouvard G, Arhan P, Bougle D (2002) Bioavailability of caseinophosphopeptide-bound iron. J Lab Clin Med, 140, 290-294
 20. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Lee WS, Lee HJ, Shin HS, Kim HS (2007) Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. J Dairy Sci, 90, 4033-4042
 21. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Nam MS, Kim HS (2007) Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. Int Dairy J, 17, 625-631
 22. Seth A, Mahoney RR (2000) Binding of iron by chicken muscle protein digests: the size of the iron-binding peptides. J Sci Food Agric, 80, 1595-1600