

철분강화 우유의 생이용성 평가

김 운 지

한국식품개발연구원

Iron Bioavailability in Iron-fortified Market Milk

Yun-Ji Kim

Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

Abstract

To evaluate iron bioavailability in iron-fortified milk, *in vitro* and *in vivo* method were used. Low molecular weight components(ILC) from milk was isolated and iron was added, then soluble iron from ILC-iron complex was determined. Each iron sources and extrinsically labelled with FeCl₃ was used for measuring absorption rate of iron from ILC-radiolabelled iron complexes as radioiron absorption into the blood one hour after injection into ligated duodenal loops of iron-deficient rats. Iron absorption rate was in the order of ferrous lactate(25.56%)>ferric citrate(24.71%)>ferrous sulfate(19.67%) when 100ppm iron was used. In separate experiments, iron fortified milks with each iron sources were gavaged into iron-deficient rats. When 25ppm iron was added to milk, the order of iron absorption was ferrous sulfate(12.52%)>ferrous lactate(8.07%)>ferric citrate(6.52%) ($p<0.05$). When 100ppm iron was added to milk, absorption rate was decreased compared to the treatments with added 25ppm of iron. Absorption rate of ferrous sulfate(5.34%) from milk added 100ppm iron was highly lowered, but ferric citrate(6.45%) was not significantly changed. The absorption rate of ferrous lactate(5.82%) was 70% of 25ppm iron added milk.

Key words: iron absorption, iron fortified milk, iron salts

서 론

철분은 생체 내에서 이루어지는 거의 모든 대사에 필수적인 성분으로, 다른 영양소와 비교하여 비교적 소량이 필요하다(1-3). 식품에 함유되어 있는 철분은 그 함량도 중요하지만 실제적으로 이용되는 정도를 평가하는 생이용도가 매우 중요하다(4-6). 이것은 철분의 소화 흡수율이 다른 영양소보다 매우 낮으며 또한 다른 성분들과의 상호작용이 다양하여 식품의 조합에 따라서 매우 다양한 생이용도를 보이기 때문이다. 식품 중에는 여러 종류의 성분이 존재하여 이에 관련된 상호작용이 다양하며 생이용도에 각각 다른 영향을 미친다. 철분의 생이용도에 영향을 미치는 가장 중요한 점은 용해도로서 이는 소장의 mucosa에서 효과적으로 흡수되기 위한 전제조건이다(7). 철분의 용해도는 식품의 가공, 저장 중 소요되는 시간 뿐만 아니라 pH, 산화환원 작용 등의 환경에 따라서 달라진다. 또한 용해도는 형성되는 복합체 종류, chelation, 결합의 종류, 결합력 등에 따라 차이가 있다(8,9). 철분의 생이용도는 용해도가

중요한 지표라고 볼 수 있는데, 용해되지 않는 무기질 염이나 복합체의 경우 매우 낮지만 생이용성이 있다. 용해도가 생이용성에 영향을 미치는 중요한 인자라고 인정되지만 생체환경에서 일어날 수 있는 모든 작용이 충분히 이해되고 있지 않다는 것도 인지하여야 한다.

철분과 다른 무기질간의 상호작용은 소장에서 흡수될 때 경쟁관계로 이해할 수 있으며 식품중의 다른 성분과의 결합에 있어서도 경쟁적인 관계가 될 수 있다(10,11). 또한 생체에 흡수된 후에도 생리적인 측면에서 무기질간의 상승, 보완, 저해작용이 있다. 이와같은 무기질간의 여러 작용은 아직 충분히 이해되고 있지 않다. 무기질간의 상호작용은 다음의 네종류로 분류할 수 있다(12). ① 다른 무기질과 결합되어 있는 복합체의 무기질을 대체하여 용해성 또는 비용해성 복합체로 변화, ② 용해성 복합체에 제2, 제3의 무기질이 결합하여 침전을 유발, ③ 무기질 ligand에 다른 무기질을 첨가함으로서 여러개의 무기질과 기질이 복합체를 형성, ④ 무기질 ligand 복합체 형성이 소화효소의 작용에 영향을 미침, 철분은 산화상태에 따라 ferrous, ferric 형태로 존

재하며 생체에서는 거의 대부분이 복합체를 형성한다. pH가 3 이상일 경우 용해도가 매우 낮은 ferric hydroxides를 형성하기 때문에 ferric iron의 용해도가 감소 한다(13). 소화 흡수시 이와 같이 용해도가 낮은 hydroxides나 phosphate 복합체를 형성하는 것을 방지할 수 있도록 어떤 complexes나 chelates를 형성할 수 있다. 철분이 결합된 복합체로부터의 생이용도는 복합체의 안정성에 따라 달라진다. Gastrointestinal tract를 통과하는 동안 여러 조건에 노출시 안정된 soluble salts가 흡수에 가장 유용할 것이다. 복합체의 안정성이 낮을 경우 복합체로부터 철분이 분리되기 쉬워서 다른 복합체를 형성하기 쉽고, 장내에서 어느 정도 철분이 분리되느냐에 따라 이용도가 달라진다(14).

우유는 영양학적으로 완전식품이라고 할 정도로 영양소를 고루 함유하고 있지만 철분의 양은 극히 적어서 철분강화에 대한 연구가 진행되어왔다(15-19). 유제품에 철분을 강화할 경우 우유에 함유된 여러 가지 무기질과 철분의 상호작용에 의하여 철분의 생이용성에 많은 차이가 있을 수 있다. 따라서 철분강화에 관한 많은 방법이 제시되어 있고 새로운 기술이 도입되어 보다 효율적인 방법을 개발하고 있지만 철분의 독특한 화학적 특성(transition metal)으로(20) 아직도 연구가 진행되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 우유에 사용된 철분 염의 종류에 따라서 철분의 생이용성에 어떤 영향을 미치는가를 평가하고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험동물 준비

Sprague-Dawley 3주령 숫컷을 철분결핍 식이로 6~7주간 사육하여 철분결핍상태로 만들었다. 쥐는 2~3마리씩 stainless steel cage에 넣고 식이와 3차 중류수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육실은 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켰고 12시간 주기로 명암이 자동 조절되도록 하였다. 실험에 사용한 식이조성은 Table 1과 같으며 혼합된 사료는 펠렛으로 만들어 사용하였다.

Hemoglobin 농도 측정을 위한 cyanmethemoglobin법

혈액 20 μl 에 헤모글로빈 측정용 시약(Hemo-s Reagent 영동제약(주)) 5ml를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 5분간 냉침하였다. 흡광도를 540nm에서 측정하여 표준액의 흡광도와 비교하여 계산하였다.

Table 1. Iron-deficient diet composition for rats

Ingredient	Weight %
Casein	20.0
Corn starch	15.0
Cellulose	5.0
DL-Methionine	0.3
Mineral mix ¹⁾	3.5
Vitamin mix ²⁾	1.0
Choline bitartrate	0.2

¹⁾Mineral-mix contains: CaHPO₄ 500g/kg, NaCl 74g/kg, Potassium citrate, monohyd. 220g/kg, K₂SO₄, 52g/kg, MgO 24g/kg, MnCO₃ 3.5g/kg, ZnCO₃ 1.6g/kg, CuCO₃ Cu(OH)₂ 0.3g/kg, KIO₃ 0.01g/kg, Na₂SeO₃·5H₂O 0.01g/kg, CrK(SO₄)₂ 12H₂O 0.55g/kg, Sucrose, finely ground 124.03g/kg

²⁾Vitamin-mix contains: Vit-A 6,000,000IU/kg, Vit-D₃ 1,500,000IU/kg, Vit-E 7,500mg/kg, Vit-K 1,000mg/kg, Thiamin 1,000mg/kg, Riboflavin 3,000mg/kg, Pyridoxin 1,000mg/kg, Folacin 750mg/kg, Biotin 50mg/kg, Vit-B₁₂ 1,500mg/kg, Niacin 22,500mg/kg Cal-Pantothenic acid 7,500mg/kg

in-situ ligated loop test를 이용한 철분흡수 평가

실험 하루전 사료는 제거하고 3차 중류수만을 공급하였다. 쥐에게 치오펜탈 나트륨(대한약품공업주식회사)을 100g 체중당 12mg을 주사하여 마취시켰다. 마취된 쥐는 출혈을 최대한 피하여 복부를 갈라 pyloric valve 1cm 아래로부터 시작하여 20cm까지 면실을 사용하여 loop를 만들어 시험 용액(Table 2)을 주입하였다.

철분 흡수도 측정을 위한 in vivo test

철분결핍된 쥐는 체중과 헤모글로빈 수준이 유의차가 없도록 각 처리구별로 분류하여 실험 24시간 전부터 사료공급을 중단하고 3차 중류수만을 공급하였다. 우유에 ferrous sulfate, ferric citrate, ferrous lactate를 각각 첨가하고, ⁵⁹FeCl₃(NEN Life science products, USA)를 1.0 μCi ⁵⁹Fe³⁺의 농도로 첨가한 다음 이를 1.5ml 씩 gavage하고 1시간 경과 후 혈액을 채취하여 radioactivity를 측정하여 흡수된 철분을 평가하였다.

혈액의 radioactivity 측정

채취된 혈액 20 μl 에 3차 중류수 5ml를 가하여 ⁵⁹Fe activity를 gamma counter(Packard Auto-Gamma Model 2000 Series, Meriden, USA)로 측정하였다. 시료에 첨가된 radioactivity와 혈액에 흡수된 철분의 radioactivity percentage는 다음의 공식에 의하여 계산하였다.

Table 2. Formulation of iron complexes injected *in-situ* ligated loop

Treatment	A	B	C	D	E	F
Ferrous sulfate(Fe 100ppm, ml)	2.50	2.50				
Ferric citrate(Fe 100ppm, ml)			2.50	2.50		
Ferrous lactate(Fe 100ppm, ml)					2.50	2.50
ILC ¹⁾ (ml)		0.50		0.50		0.50
Demineralized water(ml)	7.33	6.86	7.34	6.84	7.33	6.85
Tris buffer(0.25mol, ml)	0.17	0.14	0.16	0.16	0.17	0.15
Total volume(ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

¹⁾ILC: Isolated low molecular weight components(MWCO 6,~8,000) from milk

$$\begin{aligned} {}^{59}\text{Fe} \text{ absorbed in blood} (\%) = & [(\mu\text{Ci}{}^{59}\text{Fe}/0.02\text{ml blood} \\ & \times \text{body wt.} \times 0.067/\text{g}) \mu\text{Ci}{}^{59}\text{Fe} \text{ administered}] \\ & \times 100 \end{aligned}$$

Ferrozine assay

Ascorbic acid(0.02%를 0.01N HCl에 용해) 용액 1.25ml를 회석된 시료 0.5ml에 가하고 혼합한 다음 10분간 실온에 방치한다. Ammonium acetate(10%) 용액을 가하고 잘 혼합한다. Ferrozine color reagent(3-2(pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazone-p,p'-disulfonic acid, Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI)를 중류수를 사용하여 1mM 용액으로 만듬) 1.25ml를 가하고 잘 혼합한 다음 어두운 곳에서 20분간 방치한다. 중류수 1ml를 가한 다음 562nm에서 흡광도를 측정하여 준비된 표준 곡선에 의하여 철분농도를 측정한다(21).

Isolated low molecular weight components (ILC) 제조

우유 500ml에 3차 중류수 5ml를 넣은 dialysis bag (MWCO 6,~8,000, Spectrum, Medical Industries)을 넣고 5°C 저온실에서 20시간 동안 교반하였다(22,23).

결과 및 고찰

In vitro 방법에 의한 철분의 생이용도 평가

철분강화 우유의 생이용도 평가를 *in vitro* 방법으로

실시하였다. Gastrointestinal tract(GI tract)에서 철분 흡수시 철분복합체의 성질에 의해 영향을 받는데 가장 크게 영향을 미치는 것으로서 철분복합체의 용해성이 철분 흡수시 필수적인 전제 조건으로 알려져 있다. 복합체가 용해성이기 위해서는 주로 low molecular weight 물질과 철분이 복합체를 이루는 것으로 *in vitro* 방법에 의한 생이용도 평가는 주로 이들 low molecular weight 성분의 특성에 의해 좌우된다고 보는 것이 현재의 시점에서 가장 보편적인 이론이다(14,24,25). 본 실험에서 얻어진 ILC의 단백질 함량은 0.054mg/ml, 철분 용해능은 20ppm으로 나타났다.

In situ ligated loop 방법에 의한 생이용성 평가

철분결핍된 쥐의 소장에서 loop를 형성한 다음 분리한 ILC를 이용하여 ILC-철분 복합체를 만들고 이들의 철분흡수도를 평가하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 실험에 사용한 ferrous sulfate, ferric citrate, ferrous lactate는 염 자체 또는 ILC-철분 복합체를 *in situ* ligated loop에 투여하였을 때, ferrous sulfate와 ferrous lactate는 ILC-철분 복합체가 염 자체보다는 생이용성이 약 1.4배, 2배 증가하였다. 하지만 ferric citrate는 약 0.77배로 감소하였다. Ferric citrate는 염 자체와 ILC-철분 복합체 모두 다른 염과 비교하여 흡수도가 높았는데 이는 ferric citrate의 citrate기가 철분흡수 과정에서 환경을 변화시키는 작용 즉 pH 조건과 철분을 chelation 하는 작용에 의하여 철분흡수에서 상승작용을 하는 것으로 사료된다.

Table 3. Radioiron absorption from iron solutions injected into ligated segments of rat small intestine

Treatment	Weight (g)	Hemoglobin (g/100ml blood)	⁵⁹ Fe absorbed (%)
Ferrous sulfate 100ppm	191±32 ¹⁾	8.25±1.03	13.97±6.01
Ferrous sulfate 100ppm+ILC	225±31	8.39±1.76	19.67±5.44
Ferric citrate 100ppm	241±33	9.06±2.11	32.19±6.12
Ferric citrate 100ppm+ILC	227±41	7.22±1.51	24.71±7.43
Ferrous lactate 100ppm	240±30	7.32±1.40	12.62±4.16
Ferrous lactate 100ppm+ILC	218±36	7.93±1.10	25.56±4.53

¹⁾Values are mean±S.D.

본 실험에서 얻은 결과는 이러한 citrate의 작용에 의한 효과가 ILC의 철분 용해능 이상의 철분 용해 효과를 주는 것으로 해석된다. 이러한 결과로부터 해석하면 우유에서 분리한 ILC는 ferrous sulfate, ferrous lactate와 복합체를 이를 때 흡수율을 증가시켰으나 ferric citrate의 경우는 오히려 감소시키는 결과를 주었다. 따라서 본 결과는 유제품에 철분을 강화시킬 때 철분염의 종류에 따라서 생이용성에 차이가 있음을 잘 시사하고 있다고 할 수 있다.

In vivo 방법에 의한 생이용성 평가

철분염 종류에 따른 철분강화우유의 철분 생이용도를 철분결핍된 쥐에게 gavage방법에 의해 시료를 투여한 다음 radioiron의 흡수정도를 평가한 결과는 Table 4와 같다. 각 철분염의 생이용도 평가는 처리구의 철분염 별로 9마리의 쥐를 사용하였으며 평균체중은 183~218g 범위였다. Hemoglobin 수준은 5.03~6.36g/100ml blood로 본 실험에 사용된 쥐는 철분결핍에 의한 번혈이 충분히 유발된 상태였다.

철분염을 같은 농도로 종류수, 우유에 용해시킨 처리구에서 실험에 사용한 철분염 모두 종류수에 용해한 것의 흡수율이 높았다($p<0.05$). Ferrous sulfate 25ppm 농도에서는 종류수, 우유 시료의 흡수도가 비슷하였으며 다른 철분염과 비교해서 흡수도가 1.5배 이상 높았고 ferric citrate에 비교하여 유의적($p<0.05$)으로 높았다. 철분농도 100ppm일 때 25ppm보다 흡수율이 낮아져서 ferrous sulfate는 43%, ferric citrate는 98%, ferrous lactate는 72% 정도로 나타났다. 이는 철분량이 많을 때 오히려 흡수도가 낮아진다는 다른 연구결과(26)와 일치하는 경향을 나타냈으며, ferrous sulfate가 농도에 따른 차이가 큰 것으로 보여졌다. 절대량을 비교하면 철분 100ppm 시료가 철분 흡수량이 많으나 유제품

의 일반적인 품질유지를 위하여 적정첨가량을 유지하는 것이 바람직하다고 사료된다. Ferric citrate와 ferric lactate의 경우 우유에 첨가하였을 때 농도에 따른 흡수율 차이가 없었으나 종류수에 첨가하였을 때보다는 낮았다($p<0.05$). 본 연구 결과에서 절대흡수량은 ferric citrate 100ppm의 경우 6.45ppm, 25ppm의 경우 1.61ppm이며 ferrous lactate 100ppm의 경우 5.82ppm, 25ppm의 경우 2.02ppm으로 나타났다. 낮은 농도(25ppm)에서 ferrous sulfate가 철분흡수율이 높은 것으로 나타났는데 높은 농도(100ppm)에서는 다른 철분염과 차이가 없었다($p=0.05$).

In situ ligated loop 방법에 의하여 평가한 결과와 비교하면 ferrous sulfate는 우유에 용해한 것의 흡수도가 높아 그 경향이 일치하였고 ferric citrate는 반대의 경향으로. 또한 *in vitro* 결과와 일치하였으나 ferrous lactate는 종류수에 용해한 것이 우유에 용해한 것보다 흡수도가 높아서 경향이 달랐다. 이상의 결과를 종합해보면 유제품에서는 현재 일반적으로 사용하는 방법으로 ILC를 분리하여 *in vitro* 방법으로 생이용성을 평가한 결과와 *in vivo* 방법에서 얻은 실험에 사용된 철분염에 대한 철분강화유제품의 생이용성 결과와 일치하지 않은 결과를 보여주었다. 따라서 유제품의 철분 생이용성을 평가하기 위한 *in vitro* 방법은 새롭게 접근되어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

철분염 종류에 따른 유제품의 철분 생이용성 정도를 평가하기 위하여 *in vitro*, *in vivo* 방법을 사용하였다. 우유에서 low molecular weight components(ILC)를 분리하고 철분을 첨가하여 복합체를 형성시킨 다음 가용 철분량을 평가하였고 분리된 ILC를 *in situ ligated*

Table 4. Absorption of radioiron from milk by iron-deficient rats

Treatment	Iron salt	Weight (g)	Hemoglobin (g/100ml blood)	^{59}Fe absorbed (%)
25ppm in D.W.	Ferrous sulfate	210±35 ¹⁾	5.96±1.09	11.77±5.07
	Ferric citrate	192±41	5.67±0.69	16.30±5.56
	Ferrous lactate	219±37	5.03±1.57	15.60±6.76
25ppm in milk	Ferrous sulfate	197±29	6.09±1.07	12.52±5.44 ^{a2)}
	Ferric citrate	201±27	6.36±2.01	6.52±3.16 ^b
	Ferrous lactate	214±51	5.95±0.99	8.07±5.47 ^{ab}
100ppm in milk	Ferrous sulfate	187±32	5.99±0.96	5.34±8.33
	Ferric citrate	183±30	5.55±1.43	6.45±2.90
	Ferrous lactate	204±27	5.70±1.01	5.82±3.56

¹⁾Values are mean±S.D.

²⁾Different superscripts in the same treatment are significantly different at $p<0.05$.

loop 방법에 사용하였다. 철분 결핍된 쥐의 소장에서 loop을 형성시켜 철분흡수도를 조사한 결과 ferrous lactate 100ppm은 약 25.56%가 흡수되었고 ferric citrate 100ppm은 24.71%, ferrous sulfate는 19.67% 흡수되었다. ILC를 첨가하지 않은 100ppm 철분염 용액은 ferrous sulfate를 제외하고는 흡수도가 감소되었다. 철분 결핍된 쥐에게 gavage 방법에 의하여 철분강화 우유를 투여하였을 때 철분 25ppm을 첨가한 시료에서는 ferrous sulfate의 흡수율이 12.52%로 가장 높았고 ferrous lactate는 8.07%, ferric citrate는 6.52% 흡수되었다. 철분 100ppm 투여수준에서는 흡수율이 더욱 낮아졌으며 ferrous sulfate는 25ppm 시료보다 절반이하 수준이었다. Ferric citrate는 차이가 없었고 ferrous lactate는 70% 수준이었으며, *in situ* ligated loop 방법에 의하여 평가한 결과와 비교하면 ferrous sulfate는 우유에 용해한 것의 흡수도가 높아 그 경향이 일치하였다. Ferric citrate는 반대의 경향으로 또한 *in vitro* 결과와 일치하였으나 ferrous lactate는 *in vitro* 방법과 경향이 달랐다. 결론적으로 *in vitro* 방법과 *in vivo* 방법으로 생이용성을 평가한 결과는 차이가 있었다고 할 수 있었으며, 유제품의 철분 생이용성을 평가하기 위한 *in vitro* 방법은 새롭게 접근되어져야 할 것으로 사료된다.

문 헌

- Bezkorovainy, A. : Biochemistry of nonheme iron in man. *Clin. Physiol. Biochem.*, **7**, 53-69(1989)
- Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Cook, J. D. and Finch, C. A. : *Iron metabolism in man*. Blackwell Scientific Publications, London, pp.105-155(1979)
- Finch, C. A. and Hueber, H. A. : Iron metabolism. *Clin. Physiol. Biochem.*, **4**, 5-10(1986)
- Fritz, J. C., Pla, G. W., Roberts, T., Boehme, J. W. and Hove, E. L. : Biological availability in animals of iron from common dietary sources. *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 647-651(1970)
- Hallberg, L. : Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.*, **1**, 123(1981)
- Monsen, E. R. : Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J. Am. Diet. Assoc.*, **88**, 786-790(1988)
- Ostrloh, K. R. S., Simpson, R. J., Snape, S. and Peters, T. J. : Intestinal iron absorption and mucosal transferrin in rats subjected to hypoxia. *Blut*, **55**, 421-431(1987)
- Johnson, P. E. : What can *in vitro* methods tell us about mineral availability? *Biological Trace Element Research*, **19**, 3-10(1989)
- Schricker, B. R., Miller, D. D., Rasmussen, R. R. and Van Campen, D. : A comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for determining availability of iron from meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 2257-2263(1981)
- Layrisse, M., Cok, J. D., Martinez-Torres, C. and Finch, C. A. : Food iron absorption: A comparison of vegetable and animal food. *Blood*, **33**, 430-443(1969)
- Layrisse, M., Martinez-Torres, C. and Roche, M. : Effect of interaction of various foods on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, **21**, 1175-1183(1968)
- Clydesdale, F. M. : Physicochemical determinants of iron bioavailability. *Food Tech.*, **37**, 133-138(1983)
- Camire, A. L. and Clydesdale, F. M. : Effect of pH and heat treatment on the binding of calcium, magnesium, zinc, and iron to wheat bran and fractions of dietary fiber. *J. Food Sci.*, **46**, 548-551(1981)
- Berner L. A., Miller, D. D. and Van Campen, D. : Availability to rats of iron in ferric hydroxide polymers. *J. Nutr.*, **115**, 1042-1049(1985)
- Clemens, R. A. : Effects of storage on the bioavailability and chemistry of iron powders in a heat-processed liquid milk-based product. *J. Food Sci.*, **47**, 228-230(1981)
- Demott, B. J. : Effects on flavor of fortifying milk with iron and absorption of the iron from intestinal tract of rats. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1609-1614(1971)
- Hegenauer, J., Saltman, P., Ludwig, D., Ripley, L. and Bajo, P. : Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 860-867(1979)
- Platt, S., Nadeau, D. B., Gifford, S. R. and Clydesdale, F. M. : Protective effect of milk on mineral precipitation by Na phytate. *J. Food Sci.*, **51**, 240-241(1987)
- Ranharta, G., Gelroth, J., Novak, F., Bock, A. and Bohannon, F. : Iron-enriched bread: Interaction effect of protein quality and copper on iron bioavailability. *J. Food Sci.*, **48**, 1426-1428(1983)
- Tiedehag, P., Sandvberg, A., Hallmans, G., Wing, K., Turk, M., Holm, S. and Grahn, E. : Effect of milk and fermented on iron absorption in ileostomy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1234-1238(1995)
- Carter, P. : Spectrometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(Ferrozine). *Anal. Biochem.*, **10**, 450-458(1971)
- Kane, A. P. and Miller, D. D. : *In vitro* estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 393-401(1984)
- Kim, Y. : Meat effects on nonheme iron absorption. Ph.D thesis, Utah State Univ., Utah, USA(1991)
- Carlson, B. L. and Miller, D. D. : Effects of product formulation, processing, and meal composition on *in vitro* estimated iron availability from cereal-containing breakfast meals. *J. Food Sci.*, **48**, 1211-1216(1983)
- Manis, J. G. and Schachter, D. : Active transport of iron by intestine: features of the two-step mechanisms. *Am. J. Physiol.*, **203**, 73-80(1962)
- Forth, W. and Rummel, W. : Iron absorption. *Physiol. Rev.*, **53**, 724-792(1973)