

Ascorbic Acid의 안정성에 대한 Liposome의 효과

이유원 · 황용일 · 이승철
경남대학교 식품공학과

Effect of Liposome on the Stabilization of Ascorbic Acid

Yu-Weon Lee, Yong-Il Hwang and Seung-Cheol Lee
Department of Food Engineering, Kyungnam University

Abstract

To overcome unstability of ascorbic acid, liposome was used to encapsulate it. Ascorbic acid was encapsulated with 46.8% efficiency inside soybean phosphatidyl choline liposomes by the dehydration-rehydration method. Stability of encapsulated ascorbic acid in liposome was enhanced compared to that in free aqueous solution. For example, most of ascorbic acid in acetate buffer (pH 5.0) was oxidized after 7 days, however, that in liposome was remained as reduced form with 22.8% after 40 days at same conditions. These results mean that encapsulation of ascorbic acid in liposome could provide protection tool for improvement in shelf life.

Key words: liposome, microencapsulation, ascorbic acid

서 론

미세캡슐은 내부에 미립자 상태의 유용물질을 넣고 바깥에 피막물질로 감싼 인위적 캡슐로서, 그 크기가 mm에서 μm 에 이른다. 미세캡슐의 피막은 내부물질의 투과에 대한 장벽으로서, 내부물질을 외부환경으로부터 보호하는 작용과 필요에 따라서 내부물질을 외부로 용출시키는 속도를 조절하는 작용을 한다^(1,2). 이러한 미세캡슐은 식품소재의 약점을 개량할 수 있어 기능성 식품 소재의 개발에 유용하게 응용될 수 있다. 미세캡슐을 이용한 식품 소재로는 색소, 식용유지, 효소, 향료, 미생물, 염류, 당류, 비타민 등으로 다양한 응용성을 갖는다⁽³⁾. 식품에서 미세캡슐의 유용성은 제한유출, 외부환경과의 차단, 식품소재의 산화 방지 및 보존성 향상, 변화하기 쉬운 식품소재의 안정화, 불필요한 냄새의 차단, 액상식품의 고형화 가능, 식품소재 방출의 조절가능 제조공정의 개선 및 물성 향상 등이 있다^(4,5). 특히 최근에는 고온에서 단시간 가공되는 식품에서 향료, 감미료, 비타민 등의 안정성을 향상시키고 분해에 의한 손실을 방지할 수 있기 때문에 미세캡슐화에 대한 관심이 높아지고 있다. 미세캡슐의 제조

방법으로는 Spray-drying, Coacervation법, 중합법 그리고 리포솜(liposome) 등을 비롯하여 10여 가지가 알려져 있다^(6,8).

리포솜은 인지질로 구성된 인위적인 막으로서⁽⁹⁾, 액상 상태의 내부물질을 감싸는 캡슐로 이용될 수 있다. 초기의 리포솜에 대한 연구는 인위적인 세포막의 개념으로 세포의 성질을 규명하는 기초 연구에 한정되었으나, 리포솜을 구성하는 인지질의 조성을 조절하여 리포솜 내부에 함유된 물질을 조절 방출시키는 특성을 발견하고 의약품에 이용하는 연구가 활발히 진행되어왔다⁽¹⁰⁾. 한편 식품에서는 lysozyme을 리포솜 내에 포집시켜 치즈 숙성 기간을 단축시켰으며^(11,12), 리포솜을 이용하여 단백질 가수분해 효소의 방출을 촉진하였고⁽¹³⁾, 산화되기 쉬운 불포화 지방산을 인지질과 같이 리포솜을 제조하였으며⁽¹⁴⁾, 리포솜을 이용하여 기능성 식품 소재의 이용성을 향상시킬 수 있다고 보고되어져 있다^(15,16).

한편, ascorbic acid (비타민 C)는 식품내에 함유되거나 첨가되어 영양분이나 항산화제로 작용하는 기능성 식품소재로서, 체내에서 결핍되면 괴혈병을 야기시키며 상처의 치유를 방해하고, 치아의 상아질, 연골, 뼈의 단백질 등을 비롯하여 세포내 물질의 합성에도 필요하다^(17,18). 그러나 ascorbic acid는 빛과 습기 등 여러 외부 환경요인에 민감하여 쉽게 산화되는 경우가

Corresponding author: Seung-Cheol Lee, Department of Food Engineering, Kyungnam University, Wolyoung-Dong, Happpo-Gu, Masan 631-701, Korea

많으며, 특히 고농도의 형태로 첨가될 때에는 색소 형성, 색조 변화, 단백질 변성, 향미 등의 변화가 유발된다⁽¹⁹⁾.

따라서, 본 연구에서는 ascorbic acid의 산화 방지를 위하여 리포솜으로 미세캡슐화한 후, pH, 온도, 빛 등의 외부변화에 따른 안정성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 soybean L- α -phosphatidyl choline (L- α -lecithin), L-ascorbic acid, ascorbate oxidase, phenazine methosulfate (PMS), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo. U.S.A.)에서 구입하였으며, 그 이외의 다른 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

리포솜의 조제

Ascorbic acid 함유 리포솜은 탈수화/재수화 방법에 의하여 제조하였다^(20,21). 즉, 1.875 g의 soybean L- α -phosphatidyl choline (L- α -lecithin)을 1 L 등근 flask에 넣은 후 75 mL의 chloroform:methanol (2:1, v/v)을 가하여 잘 녹인 후, flask의 벽면에 얇은 막이 형성될 때까지 rotary evaporator를 이용하여 회전증발시켰다. 용매가 모두 제거된 이후에 잔여 용매를 제거하기 위하여 질소 가스를 15분 동안 불어넣은 후, 150 mL의 증류수를 가한 후 7.5 g의 glass bead와 함께 벽면에 묻어 있는 막이 완전히 용해될 때까지 rotary evaporator를 이용하여 회전시켜 multilamellar vesicle (MLV)을 조제하였다.

이 용액을 2시간 동안 상온에서 방치 후 10,000 psi, 5 mL/min의 유속으로 French Press를 이용하여 small unilamellar vesicle (SUV)을 조제한 후 2,000 \times g에서 4°C, 10분 동안 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 원심상정액에 150 mL의 ascorbic acid 용액(20 mM/H₂O)을 첨가하여 동결건조를 시킨 후, 15 mL의 증류수를 가하여 수화시켜 dehydration/rehydration vesicle (DRV)을 생성하였다. 리포솜의 내부에 포집되지 않은 ascorbic acid를 제거하기 위해 PCS buffer (0.134 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM citrate, pH 3.5) 120 mL를 가하여 회석한 후 12,000 \times g에서 4°C, 40분간 원심 분리하여 침전물을 얻은 후, 다시 PCS buffer 150 mL를 가하여 원심 분리하여 침전물을 얻었다.

Encapsulated ascorbic acid의 저장

Ascorbic acid 함유 리포솜을 제조한 후, 각각의 저

장 조건에 따라 ascorbic acid 농도가 1 mM이 되도록 회석한 후 2시간 동안 실온에서 방치하여 산소가 충분히 포화되도록 하였다. 저장에 이용한 용기는 20 mL 투명 유리병이며, 각 유리병에 4 mL의 리포솜 용액을 주입한 후 두껍을 막아 저장하였다⁽²²⁾. 저장기간은 총 40일로 하여 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40일 간격으로 ascorbic acid를 측정하였다. 이때 리포솜에 함유된 ascorbic acid의 안정성에 미치는 pH, 온도, 빛의 영향을 조사하기 위하여 50 mM acetate (pH 5.0), 50 mM phosphate (pH 7.0), 50 mM glycine (pH 9.0) buffer에서 각각 저장하였고, 각각의 pH에서 4°C, 실온, 그리고 37°C로 나누어 빛에 노출시키거나 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차단하였다. 수용액에서의 ascorbic acid의 안정성은 동일한 방법으로 40일 동안 buffer별, 온도별, 빛의 차단과 노출로 저장실험을 하였다.

Ascorbic acid의 측정

시료에 함유된 ascorbic acid는 ascorbate oxidase, PMS, MTT를 이용하여 측정하였다⁽²³⁾.

결과 및 고찰

리포솜 내의 ascorbic acid 포집 효율

SUV 상태로 제조한 리포솜에 20 mM의 ascorbic acid를 가하여 탈수화/재수화법으로 미세캡슐화시킨 결과, 가해진 ascorbic acid의 46.8%가 리포솜 내부에 포집되었다. 일반적으로 리포솜의 포집효율에는 리포솜의 제조 방법, 리포솜과 내부 물질의 비, 리포솜의 조성 등이 포집율에 영향을 미치며⁽²²⁾, 본 실험에 이용한 탈수화/재수화법이 가장 효율이 높은 것으로 보고되어져 있다⁽²¹⁾. 한편, ascorbic acid에 대한 리포솜의 포집효율은 phosphatidyl choline:cholesterol (1:1)의 조성으로 제조한 리포솜에 46 mM의 ascorbic acid를 가하여 탈수화/재수화법으로 포집하였을 때 57.4 \pm 2.7% 이었다고 보고되었으며⁽²²⁾, 이에 따르면 본 실험에서의 ascorbic acid의 포집율은 매우 높다고 할 수 있다. 그러나 ascorbic acid의 포집 효율을 극대화하기 위해서는 보다 다양한 조건에서 검토되어야 할 것이다.

수용액에서의 ascorbic acid의 안정성

Ascorbic acid를 acetate (pH 5.0), phosphate (pH 7.0), glycine (pH 9.0) buffer에 1 mM의 농도로 제조한 후 4°C, 실온, 37°C에서 저장하며 각각 빛의 노출과 차단을 행하여 40일 동안 ascorbic acid의 양을 측정하였다. 산성 조건인 acetate buffer에서 ascorbic acid는 매

우 낮은 안정성을 보였다(Fig. 1). 즉, 빛을 차단하면서 저장 기간 1일이 경과하였을 때 4°C에서는 13.3%, 실온과 37°C에서는 동일하게 6.5%의 ascorbic acid만이 환원형으로 검출되었으며, 빛에 노출되었을 때는 이보다 빨리 산화되어 7일이 경과하였을 때 모든 ascorbic acid가 산화되었다.

중성 조건인 phosphate buffer (pH 7.0)에 ascorbic acid를 저장하였을 때는 비교적 산성 조건보다는 산화가 느리게 진행되었다(Fig. 2). 또한 4°C에서의 산화속도가 실온과 37°C의 경우에 비해 느리게 진행되는 것을 알 수 있다. 실온과 37°C에서는 저장 1일 경과 후부터 급격한 산화가 진행되어 10일 이내에 완전히 산화가 이루어졌다. 4°C에 저장한 경우에는 저장 4일 후에도 60.0%의 ascorbic acid가 환원된 상태로 존재하였고, 20일이 경과하여서야 완전히 산화가 이루어졌다. 또한 저장조건에서 빛을 차단한 경우가 빛에 노출된 경우에 비하여 산화가 늦게 진행된다는 것을 알 수 있었다.

염기성 조건인 glycine buffer (pH 9.0)에 ascorbic acid를 저장하였을 때, 산성 조건과 마찬가지로 급속한 산화가 일어났다(Fig. 3). 단지 4°C에서 보관하였을 경우에는 실온과 37°C보다 산화속도가 비교적 느리게 발생하였지만 4일이 경과한 이후에 5% 이하로 환원형태를 유지하였고 10일째부터는 대부분의 산화가 일어났다.

이상의 결과로부터 수용액에서의 ascorbic acid는 외부환경에 매우 민감한 것을 알 수 있었다. 특히 pH에

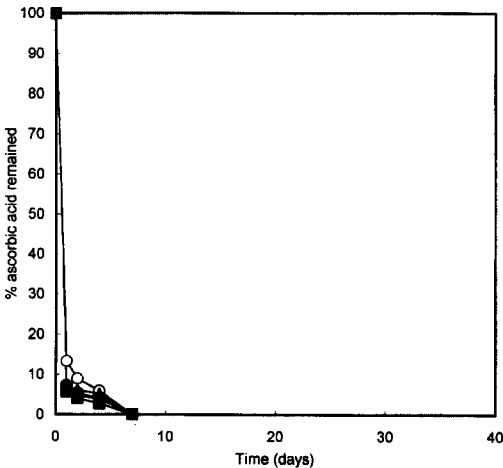


Fig. 1. Stability of ascorbic acid in 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Buffer containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

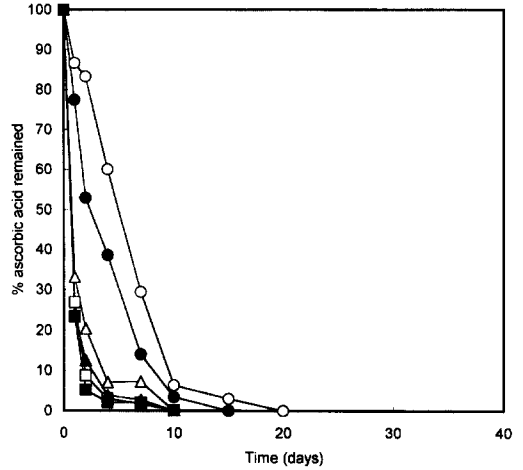


Fig. 2. Stability of ascorbic acid in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Buffer containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

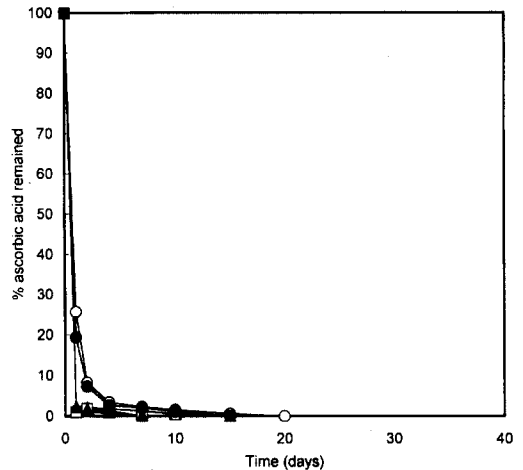


Fig. 3. Stability of ascorbic acid in 50 mM glycine buffer (pH 9.0). Buffer containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

민감하여 산성과 염기 상태에서는 중성에서의 경우에 비하여 급속한 산화가 일어나며, 온도가 높고 빛에 노출된 경우에서 산화가 더욱 빨리 진행되었다.

리포솜 내에서 ascorbic acid의 산화안정성

Ascorbic acid를 soybean phosphatidyl choline으로 제조한 리포솜에 포집한 후 pH, 온도, 빛을 인자로 하여 안정성을 측정하였다. Acetate buffer (pH 5.0)에서

리포솜에 함유된 ascorbic acid를 저장하면서 산화안정성을 측정한 결과가 Fig. 4에 나타나 있다. 수용액에 노출되었을 때에 비하여(Fig. 1) 리포솜 내부에 포집되었을 때 ascorbic acid는 안정함을 알 수 있다. 특히 4°C에서 저장하였을 때는 저장 2일 경과 후에는 91.6%의 환원율을 유지하였고, 10일이 경과하였을 경우에도 50% 이상의 환원율을 유지하였다. 또한 저장 한계 기간인 40일 경과 후에도 4°C에서 저장하였을 때에는 22.8%의 ascorbic acid가 환원된 상태를 유지하였다. 산화속도는 온도에 비례하여 저장 온도가 높아질수록 산화가 빨리 진행되었다. 그러나 리포솜 내부에서 ascorbic acid의 산화는 늦게 진행되어 37°C에서 20일이 경과하여도 10% 이상의 ascorbic acid는 환원된 상태를 유지하였다.

중성 조건인 phosphate buffer (pH 7.0)와 염기 조건인 glycine buffer (pH 9.0)에서 리포솜에 함유된 ascorbic acid의 산화안정성을 측정한 결과도 산성 acetate buffer에서의 결과와 유사하였다(Fig. 5, Fig. 6). 즉, 4°C에서 저장하였을 때는 40일이 경과하여도 빛의 차단과 관계없이 pH 7.0에서 21.5%, pH 9.0에서 21.3%의 ascorbic acid가 환원된 상태를 유지하였으며, 저장 온도가 상승할수록 산화되는 속도는 빨라졌다. 따라서 리포솜으로 인한 외부환경 차단은 pH에 관계없이 ascorbic acid의 산화를 지연시키는데 효과적이었다.

이상의 결과로부터, 외부환경에 민감한 식품소재인 ascorbic acid를 리포솜으로 미세캡슐화하였을 때 산화

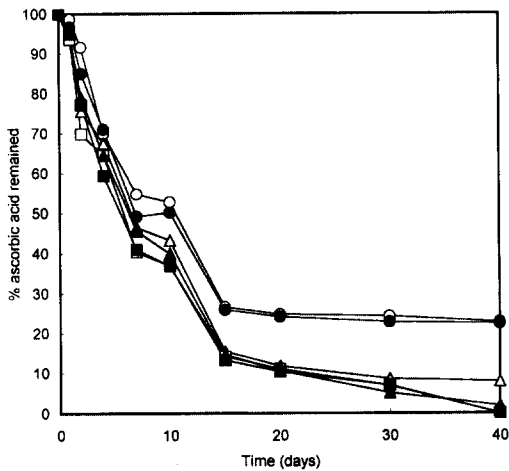


Fig. 4. Stability of ascorbic acid encapsulated in liposome in 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Liposomes containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

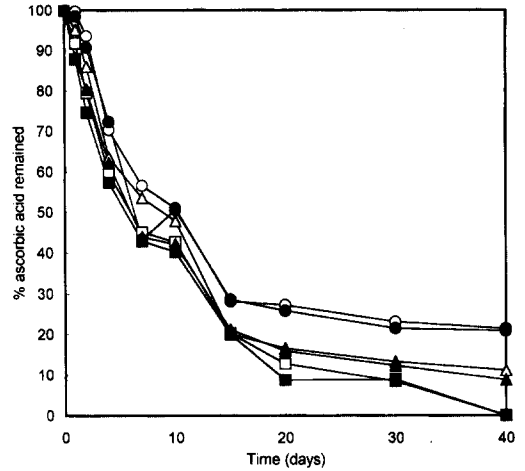


Fig. 5. Stability of ascorbic acid encapsulated in liposome in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Liposomes containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

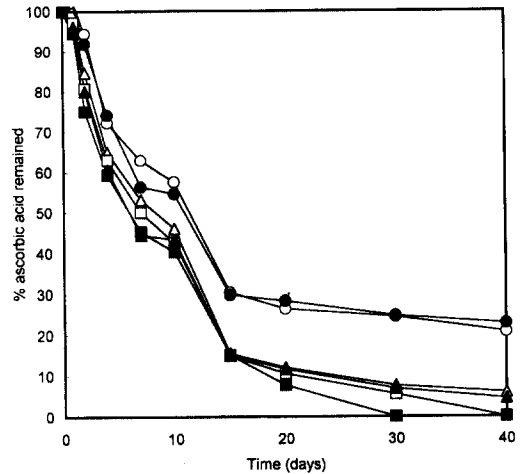


Fig. 6. Stability of ascorbic acid encapsulated in liposome in 50 mM glycine buffer (pH 9.0). Liposomes containing ascorbic acid were stored at 4°C without light (○) or with light (●), at room temperature without light (△) or with light (▲), and at 37°C without light (□) or with light (■).

를 지연시키는데 효과적임을 알 수 있었다. 특히 리포솜은 외부환경의 pH로 인한 산화를 방지하는데 효율적이며, 빛의 영향도 감소시킬 수 있었다. 그러나 리포솜 내의 ascorbic acid는 온도에 영향을 받고 있으며, 이는 리포솜이 온도의 변화에 민감함을 의미한다. 그러나 리포솜의 인지질 조성을 변화시켜 막의 투과

성과 유동성을 조절하면 ascorbic acid의 안정성에 기여할 것으로 기대된다.

요 약

Ascorbic acid의 불안정성을 극복하기 위하여, 탈수화/재수화의 방법을 이용하여 soybean phosphatidyl choline으로 제조한 리포솜에 ascorbic acid를 미세캡슐화하였다. Ascorbic acid는 46.8%의 효율로 리포솜 내에 포집되었다. 리포솜 내에서의 ascorbic acid는 수용액에서보다 안정성이 매우 증대되었다. 예로 pH 5.0의 acetate buffer에서의 ascorbic acid는 7일 경과 후에 대부분이 산화되지만, 같은 조건에서 리포솜에 미세캡슐화되었을 경우는 40일이 경과하여도 22.8%가 환원된 상태를 유지하였다. 이러한 결과는 리포솜으로 ascorbic acid를 미세캡슐화하면 저장 기간을 향상시키는 보호 수단으로 이용될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국과학재단의 핵심전문연구(과제번호: 981-0608-035-2)의 지원으로 수행된 연구 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Dziedzic, J.: Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology*, **42**(4), 136-147 (1988)
- Cho, Y.H., Shin, D.S. and Park, J.Y.: Microencapsulation techniques in food industry (in Korean), *Food Science and Industry*, **30**(4), 98-111 (1997)
- Chang, P.S.: Microencapsulation and food industry (in Korean). *Food Technology*, **5**(2), 67-70 (1992)
- Chang, P.S.: Microencapsulation and food industry (II) (in Korean). *Food Technology*, **5**(3), 59-61 (1992)
- Arshady, R.: Microcapsules for food. *J. Microencapsulation*, **10**(4), 413-435 (1993)
- Reineccius, G.A.: Controlled release techniques in the food industry. In *Encapsulation and controlled release of food ingredients*, Risch, S.J. and Reineccius, G.A. (ED.), ACS Symposium Series 590, American Chemical Society, Washington D.C., p.8-25 (1993)
- Karel, M. and Langer, R.: Controlled release of food additives. In *Flavor Encapsulation*, Risch, S.J. and Reineccius, G.A. (ED.), ACS Symposium Series 370, American Chemical Society, Washington D.C., p.177-191 (1988)
- Graves, B. and Weiss, H.: Encapsulation Techniques. In *Encyclopedia of food science and technology*, Hui, Y.H. (ED.), Wiley-Interscience, New York, p.697-703 (1992)
- New, R.R.C.: Preparation of liposomes. In *Liposomes, a practical approach*, New, R.R.C. (ED.), IRL Press, Oxford, England, p.33-104 (1994)
- Lasic, D.D.: Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, **16**(7), 307-321 (1998)
- Kirby, C.J., Brooker, B.E. and Law, B.A.: Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **22**, 355-375 (1987)
- Kim, T.J., Kim, Y.S. and Pyun, Y.R.: Liposome-microencapsulation of lysozyme and its stimulated release (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(3), 399-404 (1996)
- Koide, J. and Karel, M.: Encapsulation and stimulated release of enzymes using lecithin vesicles. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **22**, 707-723 (1987)
- Haynes, L.C. and Levin, H.: Method and liposome composition for the stabilization of oxidizable substances. *U.S. Patent* 5,139,803 (1991)
- Kirby, C.J.: Controlled delivery of functional food ingredients: Opportunities for liposomes in the food industry. In *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. (Ed.), CRC Press, **2**, 215-232 (1984)
- Kim, H.H. and Baianu, I.C.: Novel liposome microencapsulation technique for food applications. *Trends in Food Sci. & Technol.*, **2**(3), 55-61 (1991)
- Hodges, R.E., Hood, J., Canham, J.E., Sauberlich, H.E. and Baker, E.M.: Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **24**, 432-443 (1971)
- Hodges, R.E., Baker, E.M., Hood, J., Sauberlich, H.E. and March, S.C.: Experimental scurvy in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **22**, 533-548 (1969)
- Liao, M-L. and Seib, P.A.: Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. *Food Chemistry*, **30**, 313-317 (1988)
- Kirby, C.J. and Gregoriadis, G.: Dehydration-rehydration vesicles, a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*, **2**, 979-984 (1984)
- Kirby, C.J. and Gregoriadis, G.: A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions. In *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. (Ed.), CRC Press, **1**, 18-27 (1984)
- Kirby, C.J., Whittle, C.J., Rigby, N., Coxon, D.T. and Law, B.A.: Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 437-449 (1991)
- Beutler, H.O.: L-ascorbate and L-dehydroascorbate. *Methods in Enzymatic Analysis*. 3rd ed., Bermeyer, H.V. (Ed.), Verlag Chemie., Basel, **1**, 376-385 (1984)

(1998년 8월 14일 접수)