

철분 강화 식품첨가제용 리포솜의 제조 및 특성

이종우[†] · 전주진
전주대학교 생명과학부

Preparation and Characterization of Liposome for Iron-Fortified Food Additive

Jong-Woo Lee[†] and Soo Jin Jeon

School of Life Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

Abstract

Iron is an essential ingredient for all metabolism in a living body. However, because of the very low content of the iron in foods, many researches have been performed about iron-fortified food additives. We developed an iron-fortified food additive using the liposome that contain ferrous sulfate and hemin. For preventing the autoxidation of the ferrous sulfate, ascorbic acid was applied. Also, to prevent the oxidation of the liposome induced by the added ferrous sulfate and/or hemin, α -tocopherol was additionally applied. Though the effect of the added aqueous ascorbic acid did not show the antioxidative activity on the liposome containing ferrous sulfate and/or hemin, the added α -tocopherol in the phospholipid bilayer could retard the oxidation of the liposome. These results support that the liposome containing ferrous sulfate, hemin and ascorbic acid with the incorporated α -tocopherol could be applied in the food industry as an iron-fortified additive.

Key words: liposome, food additive, iron-fortified

서 론

철분은 생체 내에서 이루어지는 거의 모든 대사에 필수적인 성분으로, 다른 영양소와 비교하여 비교적 소량이 필요하다(1). 일반인의 경우 하루에 필요한 철분량은 1 mg이며, 이는 피부나 위장관의 노화된 상피세포가 박리되어 유실될 때 세포나 적혈구에 포함된 철분의 손실에 해당된다. 그러나 신생아기, 사춘기, 임신 및 출산기 등 철분의 섭취 요구량이 증가하는 시기가 있으며, 이 시기에 충분하지 못한 철분 섭취는 빈혈로 이어지게 된다. 또한, 철분의 섭취는 성장기 어린이들에게 두뇌발달, 성장, 활동성 등에 중요한 영향을 미치게 된다(2, 3). 특히, 남성과 달리 주기적으로 월경을 겪어야 하는 여성은 하루에 필요한 철분량이 2 mg 이상이며, 폐경이 오기 전까지는 철분이 풍부한 식생활을 등한시 할 경우 항상 빈혈이 발생할 소지가 있다. 철분 결핍은 철분 제재복용을 통해 교정할 수 있으나, 약제 복용의 불편함이나 번거로움을 피하기 위해서는 철분을 충분히 섭취할 수 있는 식생활을 해야 한다.

그렇지만, 우유와 같이 영양학적으로 완전한 식품인 경우에도 철분의 양은 극히 적어서 철분 강화에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다(4,5). 철분 강화에 대한 연구에서 가장 크게 대두된 문제점은 철분의 화학적 특성으로 인한 제품의 품질 저하이다. 또한, 철분은 전이금속으로서 ferrous와 ferric 상

태로 전환되면서 식품에 첨가할 경우 지방산화를 촉진하여 색의 변화와 이취를 유발할 뿐만 아니라 인체에 해로운 성분들을 생성할 수 있다(6). 일반적으로 철분강화제품에는 주로 염형태의 제품이 그대로 사용되고 있는데 이와 같은 경우 철분의 반응성으로 품질변화 및 생이용도가 낮은 경향이 있어 그 실효가 크지 않다.

한편, 기능성 식품 소재의 이용성을 향상시키기 위하여 리포솜을 이용한 많은 연구가 보고되었다(7-9). 이에 따라, 본 연구에서는 ferrous sulfate와 hemin을 혼합한 철분 함유 리포솜을 제조함으로써 철분의 생이용성을 증진하고자 하였다. 이러한 철분 함유 리포솜을 제조하는데 가장 큰 문제점은 ferrous sulfate의 자체 산화와 ferrous sulfate와 hemin으로 인한 리포솜의 지질산화로 지적되었고, 이러한 산화과정을 최소화하는데 연구의 초점이 맞춰졌다. 최종적으로, 리포솜에 ascorbic acid와 α -tocopherol의 항산화제를 복합하여 사용함으로써 제품 내에서 철분으로 인한 반응성을 최소화하였다.

재료 및 방법

리포솜의 제조

리포솜(10 mg/mL)은 vortex 법을 사용하여 multilamellar vesicle(MLV)로 제조하였고, 이 리포솜의 구성 인지질로

[†]Corresponding author. E-mail: jwlee@jj.ac.kr
Phone: 82-63-220-2676, Fax: 82-63-220-2054

egg phosphatidylcholine(EPC)을 사용하였다. MLV(10 mg/mL)를 제조하기 위하여, chloroform에 용해된 EPC 10 mg을 vial에 넣은 후에 질소가스로 chloroform을 날려 보내 얇은 지질막을 만들고, 여기에 Tris 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7) 또는 증류수 1 mL을 넣고 격렬하게 vortex하였다. 이렇게 제조된 MLV의 인지질 농도는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 Inorganic phosphorus assay kit를 사용하여 결정하였다.

리포솜의 산화 측정

Ferrous sulfate와 hemin의 농도에 따른 리포솜의 산화뿐만 아니라 항산화제인 ascorbic acid(200 μM)와 α-tocopherol(200 μM)에 의한 리포솜의 산화억제효과는 thiobarbituric acid reacting substances(TBARS) assay를 이용하여 측정하였다(10). 25°C에서 리포솜(10 mM) 용액에 ferrous sulfate(2, 20, 2×10², 2×10³, 2×10⁴, 4×10⁴ μM)와 hemin(2, 20, 2×10², 1×10³ μM)의 농도를 변화시키면서 첨가한 후에 반응시간(0.5, 1, 2, 3.5, 5시간)에 따라 각각 정량하였다.

또한, 각각에 대한 항산화제의 산화억제효과를 측정하기 위해 수용성인 ascorbic acid는 리포솜을 제조한 후에 첨가하였고, 지용성인 α-tocopherol은 리포솜을 만들기 전 얇은 지질막 형성 단계에서 첨가하였다.

리포솜에 의한 ferrous sulfate의 포집

MLV 리포솜 제조 과정 중 얇은 지질막을 형성한 후에 완충액을 첨가하는 단계에서 ferrous sulfate(100 mM)와 ascorbic acid(20 mM)를 첨가하여 MLV 안에 ferrous sulfate가 포집되도록 하였다. 4°C의 온도 하에서, 15,000 rpm에서 30 분 동안 원심분리를 2회 반복하여 MLV를 세척하고 dialysis를 하여 MLV 외부에 존재하는 ferrous sulfate와 ascorbic acid를 완전히 제거한 후에 철분(Fe) 정량과 인지질 정량을 하였다. 이러한 정량으로부터 리포솜에 의한 ferrous sulfate의 포집효율을 계산하였다.

여기에서 철분 농도는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 Iron and Total Iron-binding Capacity Kit를 구입하여 수정된 Stookey의 방법으로 결정하였다(11). 리포솜을 함유한 시료의 경우에는 리포솜에 의한 빛 산란을 제거하기 위해 10% Triton-X 100을 첨가하여 리포솜을 작게 단편화시킨 후에 정량하였다.

결과 및 고찰

철분공여물질에 의한 리포솜 산화

본 실험에서 선택한 철분공여물질인 hemin과 ferrous sulfate는 리포솜의 산화를 촉진시키는 산화제로 잘 알려져 있다. 특히, hemin의 경우에는 [lipid]/[hemin] 몰 비율이 50 이상 일 때 리포솜의 산화가 보고되었다(12). 리포솜의 산화를 최소화한 철분 함유 리포솜을 제조하기 위하여, hemin과 fer-

rous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도가 측정되었다(13,14).

Fig. 1에서 보는 바와 같이, hemin에 의한 리포솜의 산화 정도는 [lipid]/[hemin]의 몰 비율(M/M)이 630일 때를 정점으로 630보다 큰 6300에서는 상당히 감소하였으며, [lipid]/[hemin]의 몰 비율(M/M)이 630보다 작은 경우에는 hemin의 농도가 높을수록 산화 정도가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 관찰은 Cannon 등에 의해 관찰된 결과와 일치하는 것이었다(12).

반면에, Fig. 2에 따르면 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도는 hemin의 경우와는 다른 경향을 보였으며, 전체

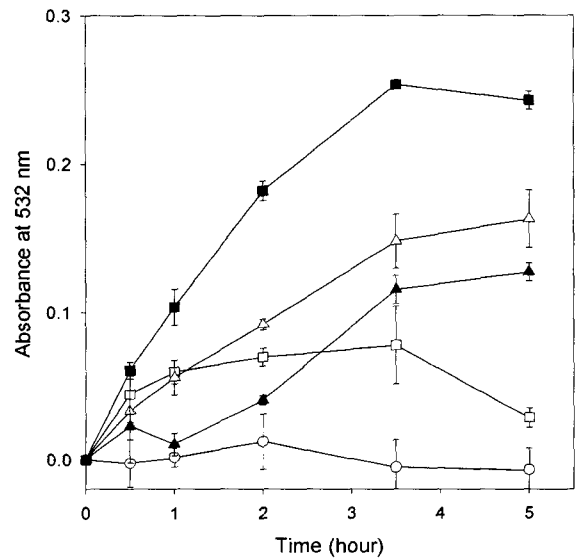


Fig. 1. The hemin-induced lipid peroxidation of the PC liposome. The [lipid]/[hemin] molar ratios are 6300 (□), 630 (■), 60 (△) and 10 (▲). And ○ is only the PC liposome.

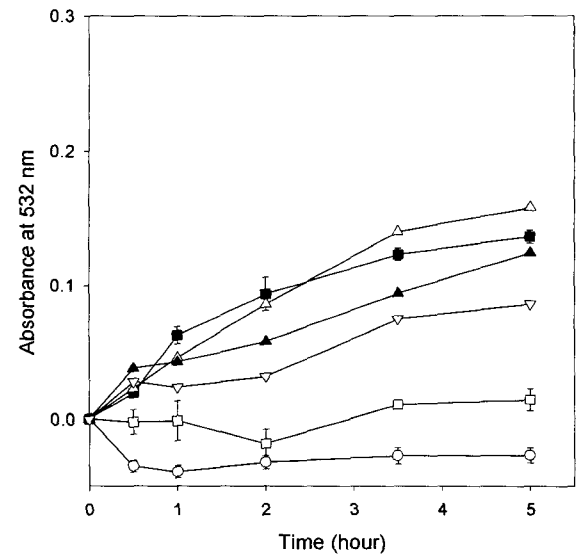


Fig. 2. The ferrous sulfate-induced lipid peroxidation of the PC liposome. The [lipid]/[ferrous sulfate] molar ratios are 500 (□), 50 (■), 5 (△), 0.5 (▲) and 0.25 (▽). And ○ is only the PC liposome.

적으로 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도가 hemin의 경우보다 낮은 것으로 관찰되었다. 즉, [lipid]/[ferrous sulfate]의 몰 비율(M/M)이 500인 경우에 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화가 전혀 관찰되지 않았으며, 나머지 몰 비율(50, 5, 0.5, 0.25 M/M)에서는 비슷한 정도로 리포솜의 산화가 관찰되었다. 그러나, 몰 비율이 5보다 낮은 경우에는 ferrous sulfate의 농도가 높을수록 리포솜의 산화 정도가 약하게 감소하였다.

한편, ferrous sulfate가 수용액에서 자동산화되는 정도를 농도(50, 100, 200, 300 mM)와 온도(4, 25°C)에 따라 관찰하였다. 그 결과에 따르면, ferrous sulfate 수용액은 3.5시간 이내에 색깔이 변하고 침전물이 생겨 단독으로는 철분공여물질로 사용할 수 없었다(data not shown). 이와 같은 ferrous sulfate의 자동산화를 억제하기 위하여 ascorbic acid를 일정하게 20 mM을 첨가하여 ascorbic acid의 효과를 앞서와 같은 조건에서 관찰하였다. 이에 따르면, ascorbic acid가 ferrous sulfate의 자동산화를 억제하는 효과가 있었으며, 냉장보관 시 그 효과가 더 오래 간다는 것이 관찰되었다(data not shown). 결국 충분한 양의 ascorbic acid를 첨가시킨다면 ferrous sulfate의 자동산화를 상당한 기간 동안 억제할 수 있을 것이라는 결론을 얻었다.

항산화제에 의한 철분 함유 리포솜의 산화억제

철분공여물질로 사용된 ferrous sulfate와 hemin의 상대적 인 농도에 따라 다르지만 철분 함유 리포솜의 산화는 리포솜을 이용한 철분 강화 식품첨가제를 구성하는 큰 제약인 것으로 나타났다. 따라서, 철분 함유 리포솜이 산화에 대하여 구조적 안정성을 가지기 위해서 리포솜의 산화가 억제되는 방안이 검토되었다. 이에 따라, ferrous sulfate의 자동산화를 억제하는 것으로 관찰된 수용성 항산화제인 ascorbic acid가 ferrous sulfate 또는 hemin을 함유한 철분 함유 리포솜의 산화에 미치는 영향을 관찰하였다. 한편, ascorbic acid는 수용액에서보다 리포솜 내에서 보다 더 안정성이 증대된다는 보고가 있으므로(15,16), 여기서 철분 함유 리포솜에 첨가된 ascorbic acid는 수용액에서 보다 더 안정한 추가적인 효과를 얻었다.

Fig. 3과 Fig. 4에 따르면, ascorbic acid가 첨가되지 않은 상태에서 hemin과 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도는 [lipid]/[철분공여물질]의 몰 비율에 따라 상당히 다른 양상을 보였다. 즉, [lipid]/[철분공여물질]의 몰 비율이 500인 경우에 hemin에 의한 리포솜의 산화 정도는 매우 높았으나 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화는 전혀 관찰할 수 없었다. 또한 몰 비율이 50인 경우에는 hemin에 의한 리포솜의 산화 정도가 많이 감소되었으나, ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도는 상대적으로 높게 일어났다.

다음으로, ascorbic acid(200 μ M)에 의한 철분 함유 리포솜(10 mM)의 산화 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, ascorbic acid는 hemin에 의한 리포솜의 산화를 억제하는 효과가 없는

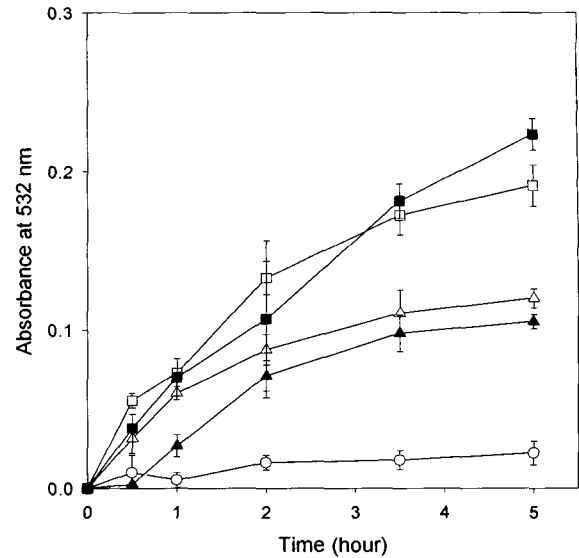


Fig. 3. Effect of the ascorbic acid in the hemin-induced lipid peroxidation of the PC liposome.

The liposome and hemin mixture was incubated without ascorbic acid (■,▲) and with ascorbic acid (□,△). The [lipid]/[hemin] molar ratios are 500 (■,□) and 50 (▲,△). And ○ is only the PC liposome.

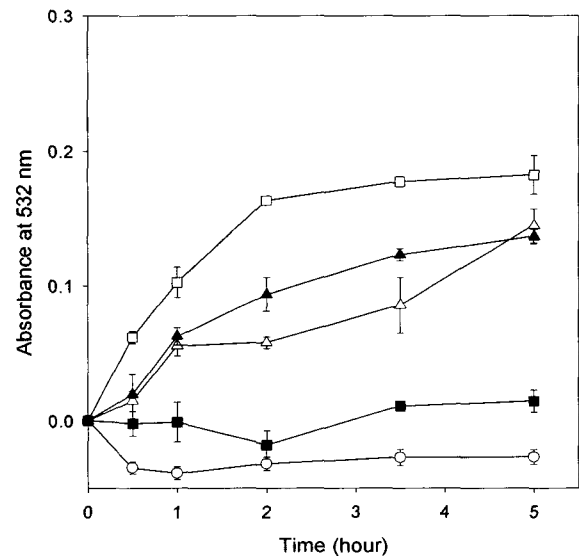


Fig. 4. Effect of the ascorbic acid in the ferrous sulfate-induced lipid peroxidation of the PC liposome.

The liposome and ferrous sulfate mixture was incubated without ascorbic acid (■,▲) and with ascorbic acid (□,△). The [lipid]/[ferrous sulfate] molar ratios are 500 (■,□) and 50 (▲,△). And ○ is only the PC liposome.

것으로 관찰되었다(Fig. 3). Hemin은 리포솜의 지용성 영역에 포함되어 있고 ascorbic acid는 수용성 항산화제이므로, ascorbic acid가 hemin에 의한 리포솜의 산화를 억제하기에는 물리적인 장벽이 있는 것으로 보인다.

반면에, Fig. 4의 결과에 따르면 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화는 ascorbic acid에 의해 억제되기보다는 오히려 촉진되는 것으로 관찰되었다(17). [Lipid]/[ferrous sulfate]의

몰비율이 50인 경우에는 ascorbic acid의 효과가 별로 없는 것으로 관찰되었으나, [lipid]/[ferrous sulfate]의 몰비율이 500인 경우에는 리포솜의 산화가 전혀 일어나고 있지 않다가 ascorbic acid의 첨가로 상당히 높은 정도의 산화가 일어나는 것이 관찰되었다. 그러나, 우리의 결과와는 상반되는 결과를 보여주는 특허가 보고되었다(9). 즉, 황산염, 젖산염, 시트르산염의 형태로 존재하는 철을 리포솜의 내부에 포집하여 유제품 등의 식품에 첨가하는 첨가제를 제조하였으며, 여기서 철을 2가로 환원된 상태로 유지하기 위하여 ascorbic acid를 함께 포집한 것이다. 더군다나, 우리의 결과에 따르면 본 특허에서 사용한 고농도의 ferrous sulfate는 EPC의 인지질이 리포솜을 형성하는 것을 방해하는 것으로 관찰되었다.

앞의 결과를 요약하면, ascorbic acid는 ferrous sulfate의 자동산화를 상당히 억제하는 효과가 있었으나, ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화를 촉진시키는 효과가 있었다. 따라서, ascorbic acid는 수용액상의 ferrous sulfate의 자동산화를 억제하기 위해서는 필요하나, ascorbic acid의 첨가로 ferrous sulfate에 의해 촉진되는 리포솜의 산화를 억제하기 위한 또 다른 항산화제의 첨가가 필요하게 되었다.

이러한 목적으로 지용성 항산화제인 α -tocopherol(200 μ M)을 선택하여 철분 함유 리포솜에서의 리포솜 산화억제효과를 관찰하였다(18). [Lipid]/[hemin] 몰비율이 500인 경우와 [lipid]/[ferrous sulfate]/[ascorbic acid]의 몰비율이 500/1/10인 경우 모두에서 α -tocopherol이 리포솜의 산화를 충분히 억제하는 효과가 관찰되었다(Fig. 5). 또한, α -tocopherol에 의한 산화억제효과는 24시간 동안 계속 지속되는 것으로 관찰되었다(data not shown). α -Tocopherol은 지용성 항산화

제로 리포솜의 지용성 영역에 함입되어 인지질의 fatty acyl chain과 인접하므로 효과적으로 리포솜의 산화를 억제하는 것으로 보인다(14).

최종적으로, ferrous sulfate의 자동산화를 억제하고 hemin과 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화를 억제하는 철분 함유 리포솜의 제조가 항산화제인 ascorbic acid와 α -tocopherol을 사용함으로써 가능하게 되었다.

철분 함유 리포솜의 제조 및 안정성

Ferrous sulfate 100 mM과 ascorbic acid 20 mM을 함유한 수용액으로 MLV(12 mM)를 제조하였다. 여기서 첨가된 ascorbic acid는 앞의 결과에서 설명한 것처럼 ferrous sulfate의 자체 산화를 방지하기 위하여 사용된 것이다. 앞에서 설명한 실험방법에 따라, 제조된 MLV 내부로 포집되지 않은 ferrous sulfate와 ascorbic acid를 제거하기 위하여 centrifugation 법과 dialysis 법을 사용하였다. 이러한 과정을 통해 얻은 MLV의 농도는 8 mM이었고 포집된 ferrous sulfate의 농도는 1.7 mM이었다. Ferrous sulfate의 포집효율을 계산하기 위한 [ferrous sulfate]/[lipid] 몰 비율의 초기값과 최종값은 각각 8.3과 0.21이며, 이 값으로부터 계산된 ferrous sulfate의 포집효율은 $0.21/8.3 \times 100 = 2.5\%$ 로 나타났다.

이러한 결과를 철분(Fe^{2+})의 양으로 계산을 하면 0.096 mg/mL이 되므로, 연령별 및 성별 1일당 철 권장량(5~18 mg)에 따라 섭취해야 하는 ferrous sulfate 함유 리포솜의 양(mL)을 계산해 보면 최소 50 mL에서 최대 190 mL인 것으로 나타났다. 더군다나, 철분제제를 구강투여했을 때는 투여량 중 위장관에서 흡수되는 양은 체내 철분 결핍 여하에 따라 변동이 있을 수 있으나 정상인인 경우 약 10%로 알려져 있다. 이러한 점을 고려한다면 하루에 섭취해야 할 ferrous sulfate 함유 리포솜의 양은 500~1900 mL나 된다. 그러나, ascorbic acid는 철의 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 200 mg 이상이면 철의 흡수를 최소 30%나 증가시키는 것으로 알려져 있어서 ascorbic acid가 이미 복합 처방된 철분 함유 리포솜의 1일 섭취량은 다소 감소될 것으로 보인다.

또한, ferrous sulfate를 함유한 MLV를 centrifugation으로 농축을 한다면 고농도로 농축된 ferrous sulfate 함유 리포솜을 제조하는 것도 가능할 것이다. 더군다나 무기철보다 흡수율이 좋은 헴철을 외부에서 단순히 첨가하는 것만으로 헴철을 리포솜의 지용성 영역에 포집시키는 것이 가능하므로 보다 더 효과적인 철분 함유 리포솜의 제조가 가능하여 식품 첨가제로 활용하는 것이 가능할 것으로 보인다.

요 약

철분은 생체 내에서 이루어지는 거의 모든 대사에 필수적인 성분이지만, 식품에 포함된 철분의 양은 극히 적어서 철분 강화에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 이에 따라, 철분 공여물질을 함유한 리포솜을 이용하여 철분 강화 식품첨가

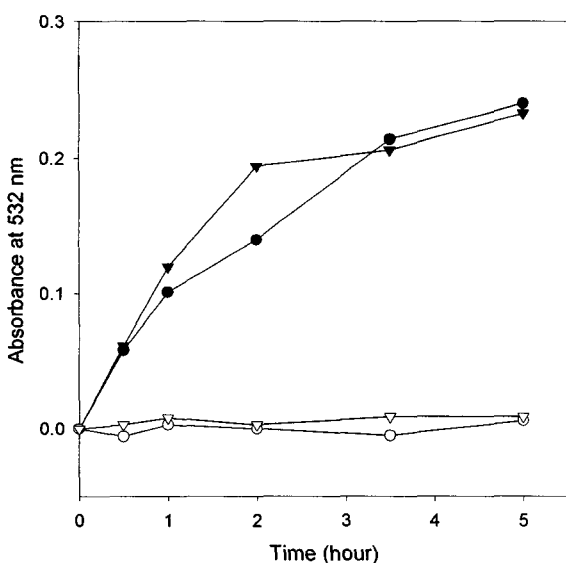


Fig. 5. Effect of the α -tocopherol in the lipid peroxidation of the PC liposome by the ferrous sulfate or the hemin. The lipid peroxidation of the PC liposome was measured for the ferrous sulfate and ascorbic acid mixture (▲) or the hemin (●). And the α -tocopherol was added to the ferrous sulfate and ascorbic acid mixture (▽) and the hemin (○), respectively.

제를 개발하였다. 철분공여물질로 ferrous sulfate와 hemin을 사용하였으며, 이러한 철분 함유 리포솜을 제조하는데 가장 큰 문제점은 ferrous sulfate의 자체 산화와 ferrous sulfate와 hemin으로 인한 리포솜의 지질산화로 지적되었다. 또한, ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화 정도는 hemin의 경우보다 낮은 것으로 관찰되었다. Ferrous sulfate의 자동산화를 억제하기 위하여 수용성 항산화제인 ascorbic acid가 첨가되었으나, 첨가된 ascorbic acid는 ferrous sulfate와 hemin을 함유한 리포솜의 산화를 억제시키지 못했으며, 오히려 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화를 촉진시키는 것으로 관찰되었다. 여기에 지용성 항산화제인 α -tocopherol을 추가적으로 첨가함으로써, ferrous sulfate의 자동산화를 억제하고 hemin과 ferrous sulfate에 의한 리포솜의 산화가 억제된 철분 함유 리포솜이 제조되었다.

문 헌

1. Finch CA, Huebers HA. 1986. Iron metabolism. *Clin Physiol Biochem* 4: 5-10.
2. Hallberg L. 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr* 1: 123-147.
3. Hallberg L, Rossander-Hulten L, Brune M, Gleerup A. 1992. Bioavailability in man of iron in human milk and cow's milk in relation to their calcium contents. *Pediatr Res* 31: 524-527.
4. Demott BJ. 1971. Effects on flavor of fortifying milk with iron and absorption of the iron from intestinal tract of rats. *J Dairy Sci* 54: 1609-1614.
5. Platt S, Nadeau DB, Gifford SR, Clydesdale FM. 1987. Protective effect of milk on mineral precipitation by Na phytate. *J Food Sci* 51: 240-241.
6. Kim YJ. 1999. Iron bioavailability in iron-fortified market milk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 705-709.
7. Kirby CJ, Brooker BE, Law BA. 1987. Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. *Int J Food Sci Technol* 22: 355-375.
8. Kim HH, Baianu IC. 1991. Novel liposome microencapsulation technique for food applications. *Trends in Food Sci Technol* 2: 55-61.
9. Paoli TD, Hager AA. 1996. Liposome containing bioavailable iron (II) and process for obtaining them. *US Patent* 5534268.
10. Pelle E, Maes D, Padulo GA, Kim EK, Smith WP. 1990. An in vitro model to test relative antioxidant potential: Ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Arch Biochem Biophys* 283: 234-240.
11. Stookey LL. 1970. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 42: 779-781.
12. Cannon JB, Kuo FS, Pasternack RF, Wong NM, Muller-Eberhard U. 1984. Kinetics of the interaction of hemin liposomes with heme binding proteins. *Biochemistry* 23: 3715-3721.
13. Kaschnitz RM, Hatefi Y. 1975. Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer proteins as initiators of lipid autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 171: 292-304.
14. Goni FM, Alonso A. 1989. *CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, Fla. Vol 3, p 103-132.
15. Lee YW, Hwang YI, Lee SC. 1999. Effect of liposome on the stabilization of ascorbic acid. *Korean J Food Sci Technol* 31: 280-284.
16. Rhim CH, Lee YW, Lee SC, Lee SC. 1999. Effect of cholesterol in liposome on the stabilization of encapsulated ascorbic acid. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 205-209.
17. Kunitomo M, Inoue K, Nojima S. 1981. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 646: 169-178.
18. Doba T, Burton GW, Ingold KU. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 835: 298-303.

(2004년 2월 23일 접수; 2004년 5월 12일 채택)