

Lysozyme의 Liposome 미세캡슐화와 유출 촉진

김태종 · 김영숙* · 변유량

연세대학교 식품·생물공학과 및 생물산업소재연구센터

*양산전문대학 전통조리과

Liposome-Microencapsulation of Lysozyme and Its Stimulated Release

Tae-Jong Kim, Young-Sook Kim* and Yu-Ryang Pyun

Department of Food and Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University

*Department of Traditional Food Preparation, Yangsan Junior College

Abstract

Encapsulation of lysozyme using lecithin vesicles and its stimulated release properties were studied. Lecithin vesicles were prepared by the dehydration-rehydration (DR) method. The highest encapsulation efficiency (EE) value of 80.1% was obtained by sonicating the multilamellar vesicles (MLVs) at 100 kHz for 120 min in bath sonicator. The value of entrapment progressively increased with the concentration of lysozyme, while the EE value decreased with the increase of enzyme concentration up to 50 mg per 100 mg of lecithin, and then became nearly constant. At the pH of 5.9, only a small amount of lysozyme was released from DR vesicles during incubation at 37°C. As the pH decreased to 3.0, lysozyme was released more rapidly. Lysozyme release was accelerated for 24 h and reached a plateau after 72 h incubation with 1% Tween 80. Ca²⁺ gave a pulse-like-release in the first hour, which was followed by a slow release.

Key word: liposome, lysozyme

서 론

과거 20년간 liposome은 주로 drug delivery system으로 광범위하게 연구되었으나 최근에는 식품공업에서 신제품 개발과 품질 개선을 위하여 liposome을 응용하고자 하는 새로운 접근 방법에 관심이 고조되고 있다⁽¹⁾. 미세 캡슐화할 수 있는 물질로는 색소, 식용유지, 효소, 향료, 미생물, 염류, 당류, 비타민 등 매우 다양하며, 그 이용성도 광범위하다. 식품공업에서 미세 캡슐화를 이용하는 이유는 중심 물질의 안정화, 제한 유출, 외부 환경과의 차단 등을 들 수 있다. Kirby 등⁽²⁾은 치즈를 숙성시킬 때 liposome에 proteinase를 포집시켜 첨가해 주면 liposome이 curd에 결합하여 손실을 방지할 수 있으므로 숙성 기간을 반으로 단축할 수 있다고 하였다. Hirotsuka 등⁽³⁾은 liposome에 포집된 칼슘을 두유에 첨가함으로써 두유의 칼슘 함유량을 우유보다 120 mg/100 g 증가시켰다고 보고하였다. 특히 lipo-

some은 최근 extruded food, microwavable food 등과 같이 고온에서 단시간 가공되는 식품에서 향료, 감미료, 비타민 등의 안정성을 향상시키고 분해에 의한 손실을 방지하는데 응용될 수 있을 것으로 관심이 높아지고 있으며, 수용액상을 미세 캡슐화시켜 증기압을 감소시킴으로써 중간 수분 식품(IMF)의 품질 수명을 증진시킬 수 있다. 또한 liposome에 효소를 포집시키고 liposome의 shell 물질의 종류와 pH, 온도 등의 외부 조건을 변화시켜 줌으로써 원하는 조건에서 효소의 방출을 촉진하는 것이 비교적 용이하므로, 이와 같은 특징은 효소를 이용한 식품가공공정의 개선에 광범위하게 응용될 것으로 기대된다⁽⁴⁾.

Liposome은 내부에 중심물질을 포집하고 있는 지방 구로서, shell물질로는 일반적으로 인지질이 사용된다. 식품공업에서 사용되는 대두 lecithin은 유화제로서 안전함으로 인정되어 식품공업에서 오래 전부터 사용되어 왔으며, 저렴하고 또한 liposome의 shell물질로 식품에 첨가되는 양은 0.1% 이하로서 매우 소량만이 사용되며 천연적인 식품성분으로 존재하므로 식품에 이용하는 것은 매우 이상적이다. Liposome내에 효소

Corresponding author: Yu-Ryang Pyun, Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

를 포집시켜 이를 식품가공공정에 응용하기 위해서는 효소가 변성되지 않는 온화한 조건에서 liposome을 제조할 수 있어야 하고 경제적 관점에서 많은 양의 효소를 포집할 수 있어야 하며, 모든 성분이 식용이어야 하고 효소의 유출속도를 조절할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 대두 lecithin을 이용하여 liposome을 조제하여 효소를 포집하고 특정 조건에서 효소의 방출속도를 촉진함으로써 식품공업에서 응용성을 개발하고자 그 기초 연구를 수행하였다. Liposome의 제조방법 중에서 포집효율이 우수한 것으로 알려진 dehydration-rehydration (DR)방법으로 liposome을 조제하였으며, 모델 효소로는 lysozyme을 선택하였다. Liposome의 조제 조건이 효소의 포집효율에 미치는 영향을 검토하였으며, liposome 내의 효소의 유출 속도를 조절하기 위하여 lecithin vesicle 내의 lysozyme의 유출에 미치는 외부 환경 인자의 변화 및 유출 촉진제 첨가의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 대두 lecithin은 Centrox F (Central Soya Co., USA) 제품이며 lysozyme은 Sigma사의 제품, Tween 80은 Kisita사(Japan) 제품을 사용하였다. Sepharose 4B는 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그 외 다른 성분들은 시약급을 사용하였다.

Lysozyme은 KH_2PO_4 , NaOH buffer 용액(phosphate buffered saline solution)에 용해시켜서 사용하였다. 효소 용액의 pH는 각 실험 조건에 따라서 달리하였고, 표준 pH는 lysozyme의 PBS용액에 대한 용해도가 가장 큰 5.9로 하였다.

Liposome의 조제

DR법(dehydration-rehydration method)에 의한 liposome의 조제(DR vesicles)는 Kirby와 Gregoriadis⁽¹⁾의 방법을 따랐다. 100 mg의 인지질을 chloroform : methanol (2 : 1, vol/vol)에 녹인 다음 100 ml 둥근 플라스크에서 인지질의 얇은 막이 생성될 때까지 회전 증발시킨다. 용매가 모두 제거된 후에 증류수 4 ml를 0.5 g의 glass bead와 함께 둥근 플라스크에 첨가해 준다. 이 둥근 플라스크를 다시 rotary evaporator에 연결하여 회전시키면서 둥근 플라스크에서 지질의 막이 모두 떨어질 때까지 수화시켜 MLVs (multilamellar vesicles)를 조제하였다⁽²⁾.

이 MLVs를 시험관에 옮긴 다음 bath sonicator

(Iuchi Model VS-100III)에서 초음파 처리를 하여 SUVs (small unilamellar vesicles)를 형성시킨다. 여기에 포집하고자 하는 효소 용액 4 ml를 첨가하고 섞어 준 다음 15분간 실온에 방치한다. 이 용액을 50 ml 둥근 플라스크에 옮긴 다음 동결건조를 한다. 완전히 건조된 후 0.4 ml의 증류수와 glass bead를 첨가해 준 다음 rotary evaporator에서 수화시키면 uni-또는 oligo-lamellar의 구조를 가지는 DLVs가 생성된다.

한편 대조구로서 MLVs에 효소를 포집시킬 때 (control MLV)는 MLVs조제 과정에서 증류수 대신에 포집하고자 하는 효소 용액 4 ml를 첨가하였다.

초원심 분리 및 gel chromatography

조제한 liposome을 초원심 분리관에서 PBS 용액으로 30 ml가 되게 희석한 다음 $159000 \times g$ 에서 20°C, 1시간 동안 초원심 분리기(Hitachi model 70P 72)로 원심 분리하였다. Gel chromatography는 Huang⁽³⁾의 방법을 이용하였다. 1.5×50 cm column에 Sepharose 4B로 충전한 다음 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 하룻밤 흘려보내 평형을 이루게 하였다. MLVs와 DLVs를 초음파 처리하여 제조한 것을 2 ml/fraction으로 column에 통과시킨 다음 300 nm에서 흡광도를 측정하였다.

포집 효율 측정

포집 효율(encapsulating efficiency, EE)은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\left(1 - \frac{\text{포집되지 않은 효소의 무게}}{\text{첨가한 효소의 무게}}\right) \times 100 (\%) \quad (1)$$

포집되지 않은 효소의 양은 초원심분리 후 상징액에서 측정하였다. 포집된 효소의 양을 측정하기 위해서 초원심분리 후 침전된 부분을 5 ml chloroform과 0.85% NaCl용액에 현탁시킨 다음, 분액 깔때기에 옮긴 후 2.5 ml의 methanol을 첨가하고 흔들어 준 다음 방치하였다. 층분리가 된 후 아래층은 제거하고 윗층을 rotary evaporator에서 잔류 유기 용매를 제거한 후 동결 건조를 하였다. 이 동결 건조물을 0.85% NaCl 용액에 녹인 후 효소의 양을 측정하였다.

상징액에서 측정된 포집되지 않은 효소량과 포집된 효소량의 합이 99~100.5%를 나타내었기 때문에 포집효율은 포집되지 않은 효소량을 측정하여 식 (1)로부터 계산하였다.

Lysozyme은 Bradford법⁽⁴⁾을 이용한 Bio-Rad사의

protein assay 시약을 사용하여 standard assay법과 microassay법으로 측정하였다.

유출 촉진 실험

촉진제에 의한 효소 유출 효과를 알아보기 위하여 시험관에 분주한 liposome 현탁액에 같은 부피의 촉진제를 첨가해 준 후 각 실험에 필요한 온도에서 저장하면서 일정한 간격으로 시료를 채취하여 유출된 효소량을 측정하였다.

유출된 효소량은 누적 백분율로 다음 식과 같이 계산하였다.

$$\frac{a-b}{c} \times 100 (\%) \quad (2)$$

여기서 a는 검체 시료중 외부 효소량 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), b는 초기 blank 중 외부 효소량 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), c는 초기 blank 중 포집된 효소량 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)이다.

Ca^{2+} 와 Tween 80은 원하는 농도의 2배의 것을 만들어서 동일 부피의 시험 용액에 첨가하였다. Ca^{2+} 는 NaCl-용액에 녹여서 사용하였으며 Tween 80은 PBS 용액에 희석하였다.

결과 및 고찰

초음파의 주파수와 처리시간이 포집효율에 미치는 영향

Dehydration-rehydration법에 의하여 liposome을 조제하는 과정에서 인지질이 수화되기 전에 용질 전체가 지질과 밀접하게 근접하여 있으면 높은 포집 효율을 얻을 수 있는 것으로 보고되었다⁽⁶⁾. 따라서 동결 건조하기 전에 지질 분산액을 초음파 처리, French press, homogenizer 등의 기계적 처리 등에 의하여 MLVs에서 SUVs로 전환시켜 단백질과의 접촉 부위를 많게 한다.

조제한 MLV를 bath sonicator에서 초음파 처리하여 동결건조한 후 효소용액과 혼합하여 liposome을 제조할 때 초음파의 주파수가 lysozyme의 포집효율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 세가지 주파수에서 2시간 동안 초음파 처리하여 제조한 DRV vesicles의 포집효율을 Fig. 1(a)에 나타내었다. Control MLV의 경우 포집 효율은 50.1%였으나 28 KHz에서 초음파 처리를 했을 때 포집효율은 76.2%로 현저히 증가되어 초음파 처리가 매우 효과적임을 알 수 있었다. 초음파 주파수가 28 kHz에서 100 kHz로 증가함에 따라 포집효율은 76.2%에서 80.9%로 약간 증가하는 경향을 보

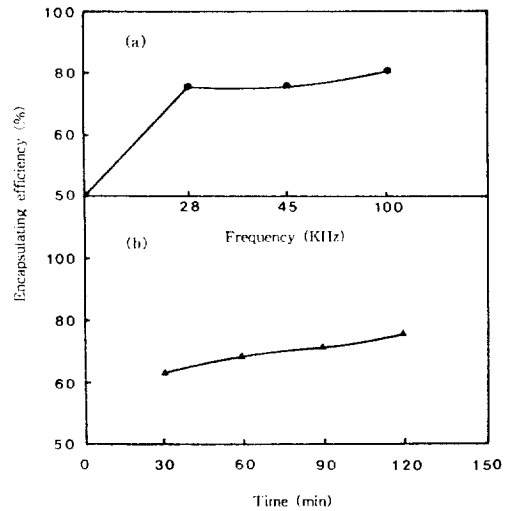


Fig. 1. Effect of sonication frequency and time on encapsulating efficiency of dehydration-rehydration vesicles

였다.

한편 초음파의 주파수 뿐만이 아니라 처리 시간도 liposome의 포집효율에 영향을 줄 것으로 생각되어 28 kHz에서 30분에서 120분까지 30분 간격으로 초음파 처리 시간을 변화시키면서 포집효율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1(b)에 나타난 것과 같이 30, 90, 120분에서의 포집효율이 각각 65%, 72.2% 및 76.2%로 초음파 처리 시간이 증가함에 따라 포집효율이 거의 비례적으로 증가하는 경향을 보였다.

Bath sonicator에서 MLVs를 100 kHz에서 2시간 동안 초음파 처리한 empty vesicle 시료와 초음파 처리를 전혀 하지 않은 시료를 Sepharose 4B column으로 chromatography하였다. Chromatogram을 Fig. 2에서 비교하여 보면 Huang⁽⁶⁾과 Barenholz⁽⁹⁾ 등의 결과와 비슷한 양상을 보이고 있다. 초음파 처리를 하지 않은 MLVs의 chromatogram (Fig. 2(a))에서는 넓은 단일 peak가 나타나고 있는 것으로 미루어 보아 여러 가지 크기의 MLVs가 존재하는 것으로 생각된다. 한편 초음파 처리한 시료의 chromatogram인 Fig. 2(b)와 비교해 보면 2개의 peak를 보이는데 첫 번째의 peak가 MLVs, 두 번째의 peak가 SUVs인 것으로 생각된다. 이 결과로 미루어 볼 때 bath sonicator로 초음파 처리한 결과 MLVs에서 SUVs로 전환되었으나 전환율이 우수하지는 않았다. Kirby와 Gregoriadis⁽⁸⁾는 초음파 처리는 MLV를 SUV로 전환시키는데 비효율적이므로 완전히 전환시킬 수는 없으며 전환율은 최종단계에서의 용질의 포집효율에는 큰 영향을 미치지 않는다고

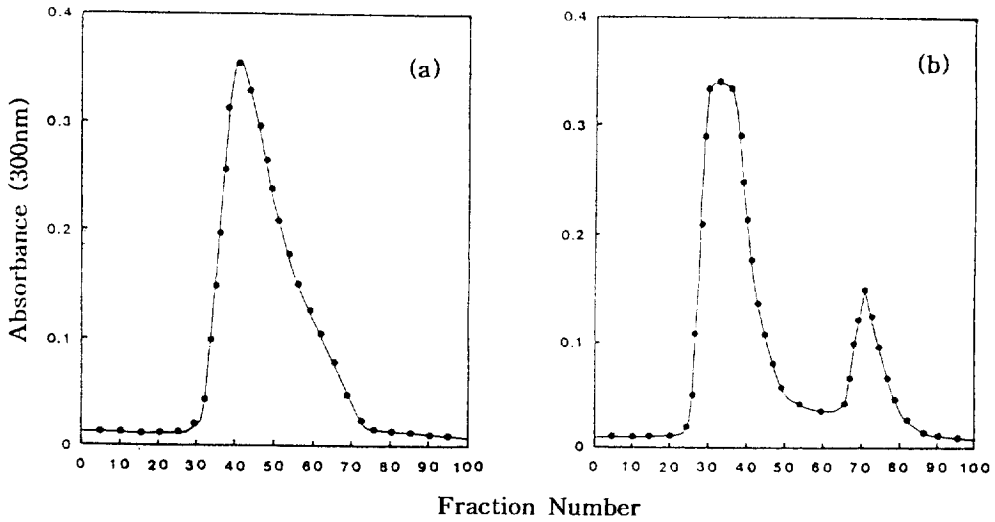


Fig. 2. Sepharose 4B gel chromatogram of empty vesicles (a) Raw MLVs suspension, (b) Sonication at 100 kHz for 2h for raw MLVs suspension

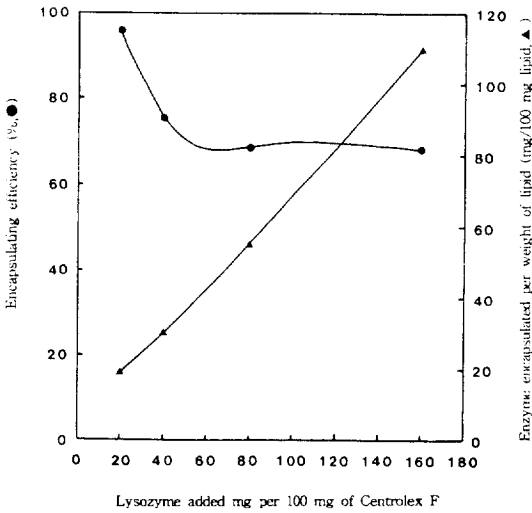


Fig. 3. Effect of amount of added enzyme (lysozyme) on the encapsulating efficiency and encapsulated enzyme per weight of lipid of dehydration-rehydration vesicles

보고하였다.

효소/지방질의 비율에 따른 포집효율

미세 캡슐화할 때 용질의 농도는 포집효율에 영향을 미치며, 또한 경제적인 관점에서 초기에 첨가해 주는 효소의 포집효율은 매우 중요하므로 100 mg의 Centrox F에 대하여 첨가해 주는 효소량이 포집효율에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3을 살펴보면 첨가

해주는 효소량을 20 mg에서 160 mg까지 증가시키면 지방 100 mg당 포집되는 효소의 절대량(EPL)은 19 mg에서 110 mg으로 실험범위 내에서 거의 비례적으로 증가하였다. 그러나 포집효율은 초기 첨가 효소량이 200 mg일 때 95%였으나 효소량이 증가할수록 급격히 감소하여 약 50 mg일때 약 68% 수준까지는 감소였으며, 그 이상의 효소 첨가량에서는 매우 완만해지는 경향을 보였다. 일반적으로 DRV의 포집효율은 용질의 농도와 종류에 크게 영향을 받으며, 용질의 종류에 따라 다른 거동을 나타낸다⁽⁸⁾.

포집 효소의 유출

pH 등의 외부환경 조건을 변화시키므로써 liposome내부의 효소의 유출을 촉진할 수 있는 것으로 보고되었다⁽⁴⁾. 따라서 37°C에서 pH 3, 4 및 5.9의 완충액에 liposome을 저장하면서 lysozyme이 유출되는 경과를 Fig. 4에 나타내었다. pH 5.9일 때는 lysozyme이 거의 유출되지 않아 이 pH 범위에서는 liposome이 안정한 것으로 생각된다. pH가 산성일수록 효소의 유출속도는 현저히 증가하였으며 저장 기간에 따라 유출되는 누적 효소량이 거의 직선적으로 현저히 증가하였다. 이와 같은 점으로 미루어 볼 때 외부 pH를 조절해 줌으로써 내부에 포집된 효소의 유출속도를 조절할 수 있으며, 촉진된 유출속도를 일정한 기간동안 지속할 수 있음을 알 수 있다.

Koide와 Karel⁽¹⁾은 중성 pH에서는 효소를 포집하였으나 또는 포집하지 않은 DR vesicles는 용이하게 용

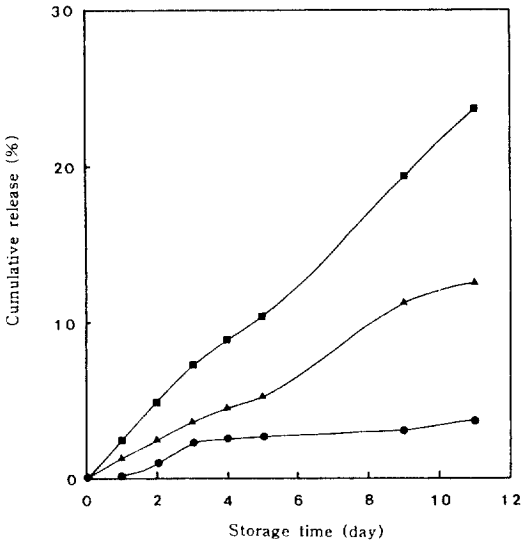


Fig. 4. Stimulated release of lysozyme from DR vesicles by alteration of pH at 37°C pH: 3 (■—■), 4 (▲—▲), 5.9 (●—●)

집하여 침강하지만, 산성 pH에서는 vesicles는 잘 분산되며, 또한 vesicles의 지방층내에 양이온이 균일하게 분산되며 지방층의 구조가 더욱 느슨하여져 효소의 이동성이 증가하는 것으로 보고하였다.

유출촉진 물질의 첨가의 영향

Liposome내에 포집된 효소의 유출을 촉진하기 위하여 계면 활성제인 Tween 80을 첨가하고 유도된 lysozyme의 유출 경향을 Fig. 5에 나타내었다. Tween 80을 1.0% 첨가한 경우 초기 12시간 동안에는 급격히 효소가 유출되었으며 그 이후에는 유출속도가 서서히 감소하였으며 72시간 후에는 포집효소의 85%까지 유출되었다. 그러나 0.1% 첨가한 경우는 10% 정도밖에 유출되지 않았다. Tween 80을 0.1% 첨가한 경우 초기 24시간까지 누적효소 유출량이 오히려 감소하는 현상은 liposome 용액에 Tween 80을 첨가해 주었을 때 외부의 유리 상태의 효소가 vesicles막의 재배열에 의하여 추가적으로 포집되었거나 또는 계면활성제의 미셀, 계면활성제-효소의 혼합미셀 등이 형성되기 때문인 것으로 생각된다⁽⁴⁾. Koide와 Karel⁽⁴⁾이 보고한 Tween 80을 1.0% 첨가했을 때 DR vesicle의 구조변화에 대한 TEM사진을 관찰해 보면 37°C에서 3시간 경과한 후에는 vesicle의 구조가 거의 파괴됨을 알 수 있다.

Ca²⁺ ion에 의해 lysozyme이 유출되는 경향은 Fig. 6에 나타내었다. 초기 약 1시간 동안에 lysozyme이 급격히 유출되며 그 이후에 완만히 유출되었다. Ca²⁺ 이

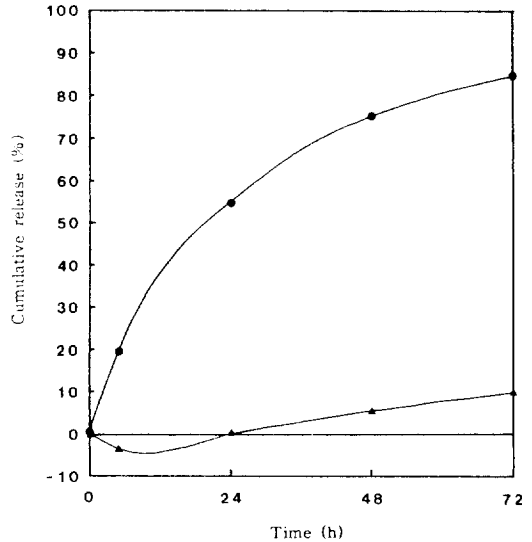


Fig. 5. Stimulated release of lysozyme by Tween 80 from DR vesicles at 37°C Concentration of Tween 80: 0.1% (▲—▲), 1.0% (●—●)

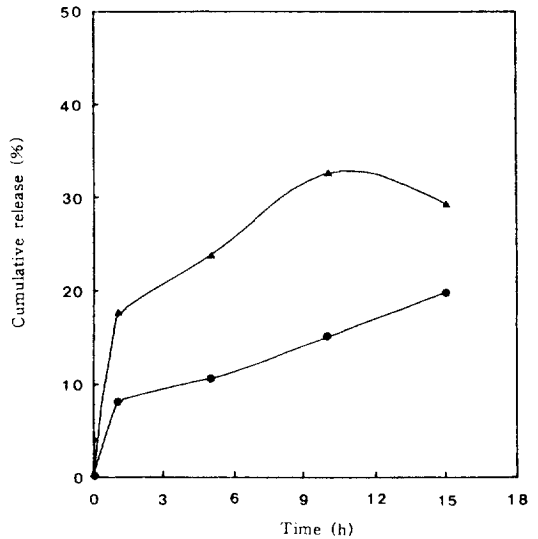


Fig. 6. Stimulated release of lysozyme induced by addition of Ca²⁺ from DR vesicles Ca²⁺ concentration: 25 mM (●—●), 50 mM (▲—▲)

온도가 50 mM일 때 전반적인 유출패턴은 25 mM일 때와 동일하였으며, 유출량은 약 2배였다. Ca²⁺ ion은 Tween 80에 비하여 비교적 단시간 내에 lysozyme을 유출시키는 것을 알 수 있었다. Ca²⁺ ion은 음전하의 인지질과 상호작용하여 liposome 이중막 구조를 "trans complex"로 전환시켜 준다. 이 trans com-

plex로 인하여 liposome들이 서로 융합하면서 이 융합이 liposome 막의 파괴의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다⁽¹⁰⁾.

요 약

Liposome 내에 효소를 포집시켜서 식품가공공정에 응용하기 위하여 모델 효소로서 lysozyme을 선택하여 dehydration-rehydration법으로 미세캡슐화시킬 때 조제 조건이 포집효율에 미치는 영향을 검토하고 외부 환경 인자의 변화 및 유출 촉진제의 첨가가 liposome 내의 효소의 유출에 미치는 영향을 연구하였다.

MLV 현탁액을 bath sonicator에서 100 kHz로 2시간 초음파 처리했을 때 lysozyme의 포집효율이 80.9%로 가장 높았다. 초기 효소 첨가량을 증가시킴으로써 단위 지방질당 포집 효소량은 거의 비례적으로 증가하였으나 포집효율은 감소하여 lysozyme 50 mg/100 mg soy lecithin일 때 68% 수준까지 급격히 감소하였으나, 그 이상의 실험농도 범위에서는 매우 완만하였다. 효소를 포집한 liposome은 37°C, pH 5.9에 저장하였을 때에 가장 안정하였고 산성일수록 유출속도는 현저히 증가하였으며 일정한 속도로 지속적으로 유출되었다. Tween 80 1.0%와 혼합했을 때 초기 24시간 동안에는 급격히 유출되었으나 시간이 경과할수록 완만히 유출되어 72시간 경과 후 85%까지 유출되었다. 또한 Ca²⁺ ion을 25-50 mM 첨가했을 때 초기 1시간동안 급격히 유출되었으나 그 이후에는 완만히 유출되었다.

문 헌

croencapsulation technique for food applications. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 2(3), 55 (1991)

2. 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 (1987)
3. Kito, M., Hirotsuka, M., Taniguchi, H. and Narita, H.: Increase in emulsification activity and calcium fortification in soy protein by using soy lecithin-soy protein complex. *Nutr. Sci. Soy Protein Jpn.*, 6, 15 (1985)
4. Koide, K. and Karel, M.: Encapsulation and stimulated release of enzymes using lecithin vesicles. *Int. J. Food Sci. & Technol.*, 22, 707 (1987)
5. Kirby, C. J. and Gregoriadis, G.: Dehydration-rehydration vesicles : A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*, November, 979 (1984)
6. Huang, C. H.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 344 (1969)
7. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
8. Kirby C. and Gregoriadis, G.: A simple procedure for preparation preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild condition, in *Liposome Technology*, vol.1, G. Grogory (Ed.), CRC press, 99, p.20-27 (1984)
9. Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B. J., Goll, J., Thompson, T. E. and Carlson, F. D.: A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 16, 2806 (1977)
10. Vail, W. J. and Stollery, J. G.: Phase change of cardiolipin vesicles mediated by divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 551, 74 (1979)

(1994년 11월 25일 접수)