

알긴산 나트륨을 이용한 유산균 캡슐화의 상업화 공정 개발

김지연 · 유성식[†]

한국기술교육대학교 에너지·신소재·화학공학부
31253 충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600
(2017년 3월 13일 접수, 2017년 3월 20일 수정본 접수, 2017년 3월 21일 채택)

Development of a Commercial Process for Micro-Encapsulation of Lactic Acid Bacteria Using Sodium Alginate

Jiyeon Kim and Seong-sik You[†]

School of Energy, material & chemical engineering, Korea University of technology and education, 1600, Chungjeol-ro, Byeongcheno-myeon, Dongnam-gu, Cheonan, 31253, Korea

(Received 13 March 2017; Received in revised form 20 March 2017; accepted 21 March 2017)

요 약

바이오 고분자인 알긴산 나트륨(Sodium Alginate)을 이용하여 기존의 방법에 비해 생산성이 우수한 캡슐화의 상업화 공정을 개발하고자 하였다. 또한, 동일 공정으로 키토산을 알긴산과 함께 캡슐화하여 알긴산 나트륨으로 캡슐화 된 유산균과 비교하였다. 유산균 캡슐화의 상업화 공정의 주요 공정은 캡슐화 후 기존의 동결건조 대신에 본 연구진이 개발한 생산성이 우수한 유동화 건조 방법에 의하여 건조시간을 15~24이상 단축할 수 있었지만, 생균수는 동결건조와 유동층 건조의 비율이 1:0.75로 동결건조 방법이 좋았다. 하지만 건조에 드는 비용과 시간을 고려 해 볼 때 유동층 건조 방법으로 상업화 공정이 가능함을 확인할 수 있었다. Chitosan-alginate 캡슐은 알긴산 칼슘캡슐과 생균수를 비교하였을 때, 알긴산을 이용한 캡슐은 희석배수 10^9 , 즉 약 1×10^9 마리 이상의 균이 존재하고, 키토산을 이용한 캡슐은 희석배수 10^3 , 즉 약 1×10^3 마리의 균이 존재함을 확인 할 수 있었다. 본 연구의 기술로 제조된 유산균 캡슐은 pH 4.65, 6.01에서 96시간 이상 동안 안정하였지만, pH 7.07, 8.35에서는 1시간 이내에 모두 분해되었다. 이는 유산균 캡슐이 위산에서 안정성을 보이고 pH 7이상을 떠는 소화기관인 소장과 대장에서는 쉽게 분해가 일어날 수 있음을 알 수 있었다.

Abstract – We aimed to develop commercialization process of encapsulation which is superior in productivity compared to existing methods by using sodium alginate. Also, in the same process, sodium alginate with chitosan was used to encapsulate lactic acid bacteria with the same process and then the viable cell counts of the two encapsulated lactic acid bacteria were compared. As a test result of the fluidized drying process developed by the present researchers, it was found that the drying time was shortened by 15 to 20 hours compared to the freeze drying method, but the number of viable lactic acid bacteria was about 75% as compared with freeze drying. However, considering the cost and time of drying, it can be confirmed that the commercialization process is possible by the fluidized bed drying method. When the number of viable cells of Ca-alginate capsule and Chitosan-alginate capsule were compared, it was confirmed that there were about 1×10^9 or more bacteria in the former and about 1×10^3 in the latter. The lactic acid bacterium capsules prepared by the present technique were stable for 96 hours or more at pH 4.65 and 6.01, but disappeared within 1 hour at pH 7.07 and 8.35. This suggests that the disintegration of lactic acid bacteria can be easily occurred in small and large intestine.

Keywords: Encapsulation, Lactic acid bacteria, Alginate, Fluidized bed drying, Chitosan-alginate

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ssyou@kut.ac.kr

*이 논문은 서강대학교 유기풍 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

현재 상업적으로 유통되고 있는 유산균은 무처리 유산균, 단백질 또는 전분으로 표면 코팅한 유산균, 과립화 유산균 및 캡슐화 유산균 등이 있다. 이 중 캡슐화 유산균이 다른 방법에 비해 위산 조건 및 담즙조건에서 보다 생존율이 우수한 것으로 알려져 있다. 또한 장기 보존성 측면에서도 기타 방법에 비해 우수하므로 유산균의 효능을 최대화 하기 위하여 캡슐화에 대한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다.

널리 알려진 유산균의 캡슐화 방법은 크게 두가지, 즉 사출(extrusion)방식, 유화(emulsion)방식이 있다[1]. 사출방식의 경우 코팅 물질로서 알기네이트를 주로 이용하고 있으며, 유화방식의 경우는 κ -카라기난, 아세테이트 프탈레이트 셀룰로오스(cellulose acetate phthalate), 키토산, 젤라틴, 알기네이트 등의 다양한 물질을 코팅물질로 이용한 예가 보고 되고 있다.

두 방식에 이용되는 코팅 물질은 다양하지만 가장 널리 이용되는 것 중 하나가 알기네이트를 이용하는 것이다. 하지만 알기네이트로 캡슐화하는 경우 킬레이트 물질, 인산염, 젖산염, 시트르산염의 존재하는 경우 안정성이 떨어진다. 따라서, 추가 코팅[2,3] 하거나 양이온 고분자로 크로스링킹[4,5] 또는 전분을 혼합[6]하여 안정성을 높인다. 하지만 이런 추가적인 처리는 공정을 복잡하게 만들고, 긴 제조시간 및/또는 생산 단가의 상승 등의 문제점이 발생된다.

이외에도 유산균 캡슐화에 대한 많은 연구 보고가 있으며 다양한 제품이 출시되고 있지만 제품의 가격이 비싼 편이다. 이것은 캡슐화 공정 중 건조공정에 기인한다고 볼 수 있다.

캡슐화 제조 공정은 크게 비드(bead) 제조 단계와 건조(분말화) 단계로 나눌 수 있다. 사출 방식은 비드 제조 시 겔화 하는 데 장시간이 소요되므로 유화 방식에 비해 상대적으로 스케일업에 어려움이 있다. 하지만, 건조 단계는 두 방식 공히 상업적으로 이용하는 기술이 동결건조 기술이므로 생산성이 매우 떨어지고, 제조 단가가 매우 높을 수 밖에 없는 실정이다. 그러므로 경쟁력 있는 제품의 제조를 위해서는 두 방식 다 효율적인 건조 시스템의 개발이 필요하며, 사출방식은 비드 제조시의 겔화 시간에 따른 생산성 저하를 개선하기 위한 기술의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 상업적으로 경쟁력 있는 코팅 물질인 알기네이트를 이용하고, 보다 공정이 단순한 사출방식을 이용하여 생존율 및 장기보존성이 기존 기술과 동등 이상의 품질을 가지는 사출 비드제조 공정의 대량생산 기술 및 고 효율 건조 기술을 개발하고자 하였다. 특히, 본 연구에서는 가장 널리 이용되는 동결건조방법 대신에 젖은 비드 건조에 맞도록 자체적으로 고안한 저온 유동층 건조 방법을 이용하여 비드 건조 후 각 샘플의 생존수 등을 측정하여 저온 유동화 건조장치의 적용 여부를 검토하고자 하였다. 또한 이미 식품과 섬유 산업 등 다양한 분야에서 추가 코팅제로 사용되고 있는 키토산을 병용하여 본 기술로 유산균을 캡슐화 한 후 키토산이 유산균에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

2. 이 론

2-1. 알긴산 나트륨

알긴산은 해조류인 김, 파래, 우뚝가사리, 미역, 다시마 등의 세포 벽에 풍부하게 존재하는 친수성, 음이온성 다당류로서 미역의 경우

에는 전체 중량 대비 약 40%에 육박하기도 한다. 또한, 해조류 이외에도 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)와 같은 미생물에서 분비되기도 하며 해조류에 포함된 산을 묶은 알칼리로 추출한 후 알칼리에 녹지 않는 잔여물을 여과하고 미네랄산으로 침전시켜 얻는다. 알긴산은 만누론산(M)과 글루론산(G)의 두 성분으로 이루어진 직쇄형 다당류의 공중합체로서 가지 사슬이 없는 (β -1,4) 결합의 β -D-manuronic acid과 α -L-gluronic acid의 조성이 무작위로 결합되어 형성된 고분자이며 각 성분의 구성비율은 원료에 따라 달라진다. 알긴산의 G유닛의 함유량이 많을수록 좀더 견고하고 굳은 다공성 겔을 형성하며, 2가 양이온으로 가교 되어 있는 경우는 과도한 팽윤과 수축이 발생하지 않고 본래의 형태를 유지한다고 한다. 이에 반해, M유닛의 함유량이 많을수록 유연하며 기공이 적은 겔을 형성하여 탄력성이 우수한 겔을 만들 수 있으나 겔이 쉽게 허물어지고 양이온으로 가교된 후에도 팽윤과 수축이 쉽게 일어나는 경향을 나타낸다. 알긴산은 3개의 블록 즉, M-블럭, G-블럭 및 MG-블럭으로 이루어진 혼합 폴리머이다. 증류수에 녹인 알긴산 나트륨은 미황색을 띠는 투명한 점성이 있는 액상으로 되며 칼슘, 마그네슘바륨, 카드뮴, 동, 아연, 코발트, 니켈 등과 같은 2가의 금속 이온과 접하게 되면 신속하게 경화되는 특성을 가지고 있다. 2개의 나트륨 이온(Na^+)과 1개의 칼슘이온(Ca^{2+})이 양이온 교환에 의해 교차 결합을 형성하여 V모양의 구멍을 가지는 에그 상자(egg-box) 모양의 3차원의 입체 구조를 형성하기 때문이다[7].

생체 내에는 알긴산 소화 효소가 없기 때문에 대사 되지 않으며 주로 식품의 안정성 등의 향상을 위한 첨가제로 사용된다. 그 밖에도 알긴산은 치과재료, 약학, 잉크, 화장품, 염료 및 폐수 처리 시에도 널리 이용되고 있는 유용한 고분자이다.

보통 염화칼슘 수용액에서 경화시간은 대략 7분 이내로 알려져 있으나 캡슐의 크기에 따라 차이가 크게 나타날 수 있다. 따라서 염화칼슘 용액에서의 반응시간은 각각의 의약품이 가지는 특성을 고려하여 정하는 것이 좋다. 즉 부득이 수용성 약물과 같이 체내 공정 중 손실이 예상되는 경우는 반응시간을 짧게 하여 신속하게 캡슐을 회수하여야 한다. 그러나 너무 빨리 회수하면 캡슐 내부에는 고형화가 진행되지 않았거나 지연되는 경우가 생길 수 있다. 캡슐의 경화 특성은 제약학적으로 이용 가능한 대부분의 약물에 적용이 가능하여 구형의 캡슐 형태로 제조가 가능하다. 또한 알긴산 나트륨은 산성 영역의 pH에서는 구조가 더욱 치밀해 지는 경향이 있어서 위액과 같은 산성 조건에서 매우 불안정한 약물에 대해 유용하게 적용할 수 있다. 낮은 pH로 인해 구조가 치밀해진 알긴산 비드는 pH 7.0 이상의 인산염 완충액에서 재팽윤이 일어나지만 증류수에서는 재팽윤이 일어나지 않는다. 그러므로 약물이 함유된 알긴산 비드는 경구 투여 시 위장에서는 구조가 치밀해져 약물을 보호하며 소장에도달하면 재 팽윤되어 약물이 방출되는 특성을 가지고 있다. 용도별 사용농도는 파스타 및 크럼의 제조 시 5~10%, 에멀전의 안정화제 1~3%, 현탁화제 1~3%, 정제의 결합제 1~3%, 정제의 봉해제로는 2.5~10% 정도의 농도로 사용된다.

2-2. 키토산

키틴과 키토산은 천연에 존재하는 다당류로서 최근에 특히 주목을 받고있는 신 기능성 소재이다. 자연계 내 유일하게 분포하는 염기성 폴리머인 키틴은 갑각류의 외골격을 이루는 주요 구성물질로서 N-Acetyl-D-glucosamine이 β -1, 4로 결합한 다당류의 일종이며, 키

토산은 키틴에 존재하는 아세틸기가 제거된 구조를 갖고 있다.

키토산은 주로 게, 새우, 가재 등 갑각류 등에서 얻어지고 키틴의 아세틸그룹이 탈아세틸화된 화합물이며, C2 위치의 아미노그룹의 반응성이 화학 반응에 의한 기능성 재료로서 분자설계를 용이하게 한다[8]. 항균작용 및 곰팡이에 대한 억제 작용이 보고 되어 있어 식품의 부패방지 및 보존성 향상에 기여할 수 있으나 키토산의 분자량에 따라 물리적인 성질이 달라지며 항균효과 및 보존성에 큰 차이를 보여준다.

키토산은 항균 활성이 매우 높은 천연 다당류로서 알려져 있지만, 그 자체는 수용액 상태에서 녹지 않고 또한 대단히 큰 고분자 물질이므로 섭취하더라도 인체 내에서 분해할 수 있는 효소가 없어서 대부분이 흡수되지 못하기 때문에 생체 내에서의 이용에 제약을 받았다. 그러나 키토산이 올리고당으로 가수분해 되면 수용액에 대단히 잘 녹으며 또한 체내 흡수율도 그만큼 높아지게 되므로 항균활성 올리고당으로서 이용될 수 있다.

키틴-키토산의 주된 응용범위는 수술용 봉합사, 항 미생물 가공면제품, 항 미생물성 섬유의 제조 등 섬유산업에의 응용을 비롯하여 캡슐화 또는 캡슐화 보조제로 이용된다[9-11].

2-3. 유산균

유산균(lactic acid bacteria)이라 함은 말 그대로 유산(lactic acid)을 많이 생성하는 세균이란 뜻이며 이것은 김치, 치즈, 요구르트, 젓갈류, 그리고 사람이나 동물의 창자 속에 많이 살고 있다. 또한 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해 이용하여 유산을 생성해 내는 박테리아로서 단백질을 분해하지만 부패 시키는 능력은 없다[12]. 유산균은 장내 유해균 억제 작용 및 정장작용, 혈중 콜레스테롤 감소기능, 면역 증강 작용, 영양학적 가치 증진, 내인성 감염 억제작용 등의 효능이 있어서 다양한 분야에 이용되고 있으며, 지금까지 밝혀진 유산균은 300~400종정도 알려지고 있으며 그 중 20여 종류가 주로 발효유 및 발효 산업에 이용되고 있다[13,14].

유산균을 눈으로 직접 볼 수는 없지만 현미경으로 1000배 정도 확대하면 그 모양을 명확하게 관찰할 수 있는데, 막대기 모양을 한 락토바실러스(*Lactobacillus*), 연쇄상구균인 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 그리고 모유를 먹이는 유아의 장내에서 주로 많이 존재하며 막대기 모양을 가지며, 혐기성 박테리아인 비피더스균(*Bifidobacterium*)로 대별할 수 있다[15].

유산균은 크게 세가지의 특성이 중요하다. 우선은 내산성 및 내담즙성으로서 유산균의 주된 활동무대는 소장/대장으로서 이에 도달하기 위해 필수적으로 위를 통과하여야 한다. 그러나 유산균은 산에 매우 약하기 때문에 위산(pH 1.8~2.0)에서 살아남아 장까지 가는 것이 중요하다. 두번째는 장도달성으로서 위산에 견딘 유산균이 장에 도달하여 활동을 나타내는 것으로 이는 내산성과는 동전의 양면적 성격으로서 내산성을 위하여 너무 견고하게 코팅을 하면 장에 도달하지 않고 바로 변으로 빠져나가는 경우가 있다. 세번째는 장 정착성이다. 유산균의 장내 상피 세포에 부착하여 대사활동을 하는 유익균으로 무사히 장까지 살아서 왔을 때 장에서 정착하여 살아가는 것이 중요하다.

2-3-1. 프로바이오틱스(probiotics)

프로바이오틱스(probiotics)라는 것은 장내 유익균과 유해균 사이의 건강 균형을 유지하는 역할을 담당하는 장내세균의 조절제로서 살

아있는 균을 고농도로 먹음으로서 장내의 유해세균을 억제하고 장내 부패를 방지하여 건강 향상에 기여하는 배양균체를 말한다. 현재까지 국내에서 개발 또는 도입되어 발효유 제품에 이용되고 있는 프로바이오틱스 유산균주는 락토바실러스(*Lactobacillus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 비피더스균(*Bifidobacterium*) 등이 있다[16].

프로바이오틱스 유산균은 장내까지 생존하여 들어가 유기산 생성에 의한 정장작용, 다른 유해균과의 영양성분에 대한 경쟁적 이용, 장내 생존성과 정착성, 인체의 비자기체 인식에 의한 면역 호르몬 증가와 특정한 면역단백질 생성 증강, 유산균의 세포 잔해물(cell debris) 성분에 의한 여러 가지 기능적 효과 등이 대표적인 프로바이오틱스 유산균의 장내 유용효과로 인정되고 있다. 이는 항생제의 남용으로 인한 내성균의 출현이 문제되고 있는 때에 생균제는 내성균의 문제가 없고 오히려 면역 기능을 강화하므로써 신체의 자연적인 치유력을 높여주는 신세대 생물의약품으로서의 역할이 기대된다[17].

2-3-2. 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)

프로바이오틱스로서 가장 많이 연구된 유산균 중 하나이다. 인체와 공생하는 유산균으로 받아들여지고 있는 3종의 유산균 중 하나이며 주로 소장에 정착하여 인체에 뛰어난 건강 증진 효과를 가져다 준다. 내산성이 뛰어나 위산을 건디는 능력이 우수하며 특히 콜레스테롤 저하 효과가 높은 것으로 받아들여지고 있다. 기타 설사, 변비 개선 및 면역 강화 등 기본적인 프로바이오틱스로서의 특징을 모두 가지고 있으므로 본 연구에서 생산성 향상을 위한 건조기술의 비교를 위하여 샘플로 한 균주이다.

2-4. 유산균 캡슐화

캡슐화란 미립자 상태의 유용물질(기능성 물질)을 피복물질(wall material)로 감싸는 것으로 크기에 따라 매크로, 마이크로, 나노 캡슐로 나뉜다. 유산균 캡슐화의 핵심 기술은 내부 물질의 방출 속도 조절 기술과 여러 분산매에서의 분산 가능성 및 기능성 물질의 산화, 환원 방지, 이액형 반응물질의 일액형 전환 가능성, 내부 물질과 피복 물질 차별화에 의한 다양한 기능 부여 가능 여부 등에 있으며 캡슐화가 가능하기 위해서는 피복물질이 캡슐화 공정 중 조작이 용이해야 하고 유화력과 유화 안정성이 우수하며 가공 및 저장 중 내부 물질의 방출 억제 및 용해도가 뛰어나야 한다. 이외에도 처리 비용과 기능성 면에서 경제적 측면도 고려되어야 한다.

알긴산 나트륨과 키토산을 이용하여 캡슐을 제조할 때 이 두 물질은 COOH^- 과 NH_2^+ 그룹의 정전기적 상호 작용에 가교결합을 형성하여 내부물질을 가두어 캡슐화하며 키토산은 알긴산 칼슘(Ca-alginate)젤을 보완하는 기술로 이용되고 있다[13].

3. 실험 방법

3-1. 시약

본 연구에 사용한 균주인 *Lac. acidophilus* MG501은 (주)메디옌에서 균주를 제공받았다. 또한, Sodium alginate (Yakuri pure chemicals co.ltd., kyoto, Japan), Chitosan (srustacean chitin, 9012-76-4, ICN Biomedical Inc.), Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 70~80% CaCl_2 , Aldrich), Sodium chloride (NaCl , 99.5%, Aldrich),

Sodium Phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 98%, Aldrich), Sodium Phosphate dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 98~101.0%, Aldrich) 이용하였고, MRS broth (Becton, Dickinson and Company, France)과 BCP broth (Eiken chemical co., Ltd, Tokyo, Japan)를 배지로 사용하였다.

3-2. 유산균 배양

균 배양은 종균 배양, 중간 배양을 거쳐 본 배양을 시행 하였다. 먼저 중간 배양을 위해 5.5 g의 MRS 배지를 100 ml의 1차 증류수나 물에 넣은 후 121 °C, 1.5기압 15분간 멸균 후 균주(*Lac. acidophilus* MG501)를 접종한다. 이때 균주의 농도는 MRS 배지의 5~10%로 되게 한다. 접종한 배지는 37 °C 인큐베이터 안에서 18~20시간동안 배양한다.

중간 배양액 중 10 ml를 채취한 후 10 ml의 배양액을 1 ml 씩 나누어 보관 튜브에 넣은 후 20% 글리세린 수용액을 넣어 최종 농도가 10%가 되게 하여 0 °C 이하에서 보관하여 종균으로 사용하였다. 중간 배양을 마친 후 필요한 양에 따라 본 배양을 한다. 본 배양은 중간 배양과 마찬가지로 중간 배양한 배양액을 MRS 배지에 접종하는데, 이때 MRS 배지는 미리 37 °C으로 냉각해 둔다. 본 실험에서는 20 ml 균주 당 400 ml의 MRS 배지를 사용하였다. 중간 배양액 접종 후 37 °C 인큐베이터 안에서 18~20시간 동안 배양한다.

본 배양을 마친 후의 원심분리기로 15000 rpm, 5 °C, 15분간 원심 분리하였다. 분리 후 상등액은 버리고 펠렛을 수거하여 실험에 이용하였다.

3-3. 유산균 미세 캡슐화 공정

캡슐은 알긴산 칼슘과 키토산-알기네이트로 제조 하였으며 제조 조건에 따라 여러 샘플을 제조하였으며, 제조 조건에 따른 샘플의 분류는 Table 1에 정리하였다.

3-3-1. 알긴산 칼슘 유산균 캡슐 제조

알긴산 나트륨은 상온에서는 안정하므로 수용액을 만들기 위해 85 °C를 유지하면서 1~2시간 1000 rpm으로 교반 시킨다.

증류수 985 ml를 85 °C로 물증탕 시킨 후 알긴산 나트륨을 15 g을 넣어 용체가 용매에 완전히 용해될 때까지 1시간 정도 교반하여 1.5% (w/w) 알긴산 수용액 1000 ml를 만든다. 배양한 유산균 25 g, 1.5% 알긴산 나트륨수용액 435 g, 콘스타치(CS) 40 g을 균질기를 이용하여 3~5분간 CS와 유산균이 뭉침 없도록 잘 혼합시켜 슬러지 형태로 만든다. 혼합 후 인젝터를 이용하여 1.5% CaCl_2 수용액에 떨어트려 캡슐을 제조한다. 제조된 캡슐은 1.5% CaCl_2 수용액에서 20~30분 경화 시킨 후, 증류수로 세척해준다. 본 실험에서는 1.0%, 1.5%, 3.0%의 알긴산 나트륨 수용액을 사용하였다.

Table 1. Classification of sample

Sample	Classification
A	Non-chitosan including 4% CaCl_2 -alginate capsule of pH 5
B	1.0% chitosan including 4% CaCl_2 -alginate capsule of pH 5
C	2.0% chitosan including 4% CaCl_2 -alginate capsule of pH 5
D	Ca-alginate capsule using 1.0% alginate solution and 0.05 M CaCl_2 solution
E	Ca-alginate capsule using 1.5% alginate solution and 0.05 M CaCl_2 solution
F	Ca-alginate capsule using 3.0% alginate solution and 0.05 M CaCl_2 solution

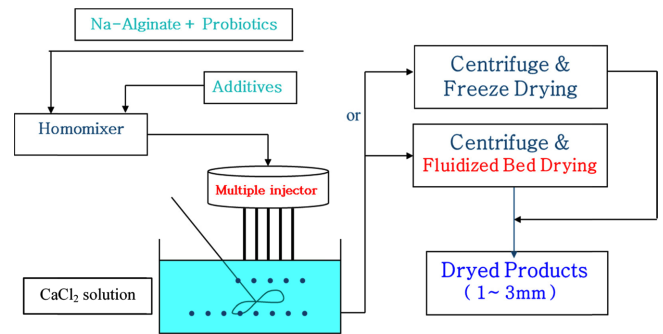


Fig. 1. A production process of Ca-alginate capsules using sodium alginate and CaCl_2 solution.

본 실험에서는 연동펌프를 사용하여 약간 가압하여 슬러지를 유입하여 다중주입기 말단에 있는 피펫 팁(1~200 μl)을 통해 비드를 제조하였다. 비드의 크기는 피펫팁의 사이즈로 조절이 가능하다. 이는 기존 스프레이식 방법보다 캡슐 제조가 용이하고, 방법이 비교적 간단하므로 대량 생산으로 확장시키기에 적합하다고 생각되어 고안한 방법이다. 알긴산 칼슘 캡슐화 공정도는 Fig. 1에 나타내었다.

3-3-2. 키토산-알기네이트(Chitosan-alginate) 캡슐 제조

키토산과 알긴산을 동시에 사용하여 캡슐화 하는 경우 키토산과 알긴산의 정전기적 작용으로 캡슐의 세기가 증가하고 다공성으로 표면적이 넓어지기 때문에 캡슐의 활용에 이점으로 작용될 수 있으나 항균능력을 가지고 있기 때문에 이 특성이 유산균에 어떤 영향이 있는지를 확인하기 위해 다음 실험을 하였다.

캡슐의 제조 방법은 알긴산 칼슘의 제조와 흡사하지만 경화액에서 차이가 있다. 배양한 유산균 25 g, 1.5% 알긴산 나트륨수용액 435 g, CS 40 g을 균질기를 이용하여 3~5분간 혼합시켜 슬러지 형태로 만든 후, 인젝터를 이용하여 캡슐을 제조하였다. 알긴산 칼슘과 마찬가지로 키토산-알기네이트 캡슐 제조는 Fig. 2의 공정도에 따라 제조되었으며, 경화액은 다음과 같이 제조하였다.

0.5% (v/v) 아세트산 수용액에 1.0% (w/v) 키토산과 4% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가한 후 0.5 M NaOH로 적정하여 pH 5에 맞춘다. pH가 너무 낮을 경우에는 유산균의 생존수에 영향을 미치고, pH가 높을 경우에는 알긴산 나트륨에 영향을 미치므로 pH 5가 적절하기 때문이다. 이 경화액을 이용하여 캡슐을 제조하여 20~30분 경화 시킨 후 증류수로 세척한다. 본 실험에서는 1.5% 알긴산 나트륨 수용

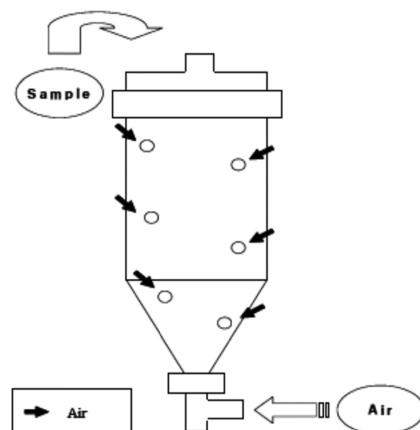


Fig. 2. Fluidized bed drying apparatus.

액과 1.0%, 2.0%, pH 5 경화액을 사용하였다.

3-3-3. 유산균 캡슐의 유동층 건조

기존의 건조 방법에는 실온건조, 동결건조, 진공 건조, 질소 건조 등이 있는데 이중 가장 널리 이용되는 동결건조 기술과 본 연구의 유동층 건조와 비교 실험 하였다.

유동층 건조는 공기를 유입시켜 인위적으로 건조대상물질을 유동화 시켜서 건조하는 기술이다. 건조는 실온에서 행해지고, 최대 온도가 37 °C 이하로 유지되게 하였다. 일반적인 유동층 건조기를 이용하는 경우 장치 하부로 에어 펌프를 이용하여 공기를 유입시켜 건조 대상 물질의 유동화를 시키는 방법이지만, 젖은 비드가 장치 벽면에 달라붙거나 장치 아래쪽에 묻히는 현상을 나타내는 등의 여러 문제점들이 나타났다. 따라서, 장치의 하부뿐만 아니라 벽면에도 공기를 유입할 수 있도록 추가로 공기 유입로를 만들어서, 유동층 건조시 초기에 유입된 젖은 유산균 캡슐이 유동층 건조기 벽면에 부착되어 유동화가 잘 되지 못하는 현상이나 하부로 묻히는 현상 등을 방지하였다. 이 유동층 건조기는 Fig. 2에 나타내었다.

이 건조 장치로 유산균 캡슐의 건조에 걸리는 시간은 약 30~40 분이다. 동결 건조는 증류수로 세척한 캡슐을 드라이아이스를 이용하여 30~60분간 급냉 시킨 후 16~24시간 동안 건조시켰다.

4. 실험 결과 및 검토

4-1. SEM 분석

건조전 알긴산칼슘과 키토산-알기네이트 캡슐의 표면과 단면을 SEM으로 비교 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 캡슐의 표면에

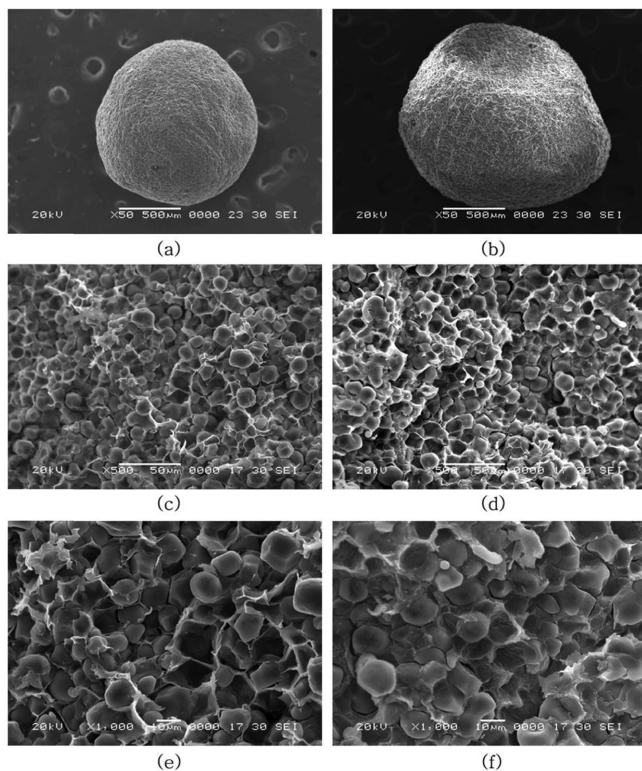


Fig. 3. SEM photographs of beads before drying. Ca-alginate; (a) whole picture ($\times 50$), (c) cross-section ($\times 500$), (e) cross-section ($\times 1000$) and Chitosan-alginate; (b) whole picture ($\times 50$), (d) cross-section ($\times 500$), (f) cross-section ($\times 1000$).

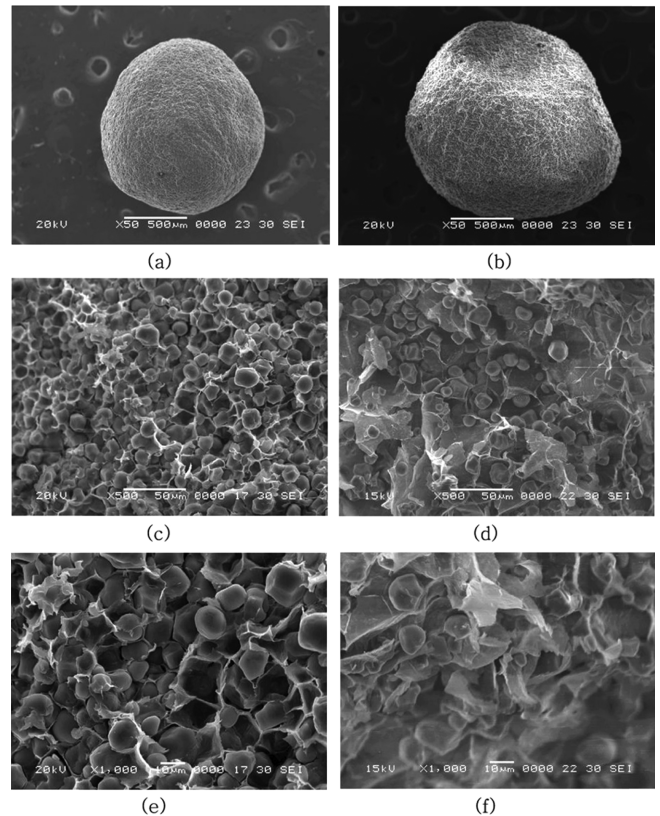


Fig. 4. SEM photographs of Ca-alginate capsule after drying. Flu-idized drying: (a) whole picture ($\times 50$), (c) cross-section ($\times 500$), (e) cross-section ($\times 1000$), and Freeze drying: (b) whole picture ($\times 50$), (d) cross-section ($\times 500$), (f) cross-section ($\times 1000$).

서는 두 샘플 모두 에그박스(egg-box)형 결합을 하기 때문에 특이하게 다른 점을 찾을 수는 없었지만, 현미경 사진에 의하면 키토산을 첨가 한 경우 가교 밀도가 높고, 기공도 균일한 것을 알 수 있었다. 이것은 키토산과 알긴산의 정전기적 반응에 의한 것으로 생각된다.

또한 SEM을 통해 건조 후 캡슐 단면의 형태를 Fig. 4에서 볼 수 있다. 그림에서 알 수 있듯이 동결 건조한 경우는 유동화 건조한 경우에 비해 표면의 에그박스 형태가 상대적으로 많이 훼손 된 것을 알 수 있다. 이 부분에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

4-2. FT-IR 분석

각 물질의 가교 여부를 확인하기 위해 건조된 샘플을 분쇄하여 KBr 펠릿 법으로 FT-IR (excaliber series, BioRad)로 측정하였다. FT-IR 측정 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 알긴산 나트륨은 3452 cm^{-1} 에서 OH, 1625 cm^{-1} 에서 C=O, 1400~1000 cm^{-1} 에서 -COOH와 -COO의 특성 피크를 가지고, 키토산은 1645 cm^{-1} 에서 -NH₂의 특성 피크를 가진다. 알긴산 캡슐의 경우 1400~1000 cm^{-1} 에서 -COOH와 -COO의 특성 피크의 세기가 감소함을 관찰할 수 있었으며, 이는 칼슘 이온과 알긴산의 반응 즉, 가교 반응에 기인한 것으로 생각된다. 또한, 키토산-알기네이트 캡슐은 키토산의 고유 피크인 1645 cm^{-1} 와 그의 영향을 받은 1569 cm^{-1} 에서 -NH₂ 피크가 생성되고, 1400~1000 cm^{-1} 에서 -COOH와 -COO의 특성 피크의 세기가 감소함을 확인할 수 있다. 이는 키토산과 알기네이트가 결합하였고, 칼슘 이온에 의해 가교 결합이 일어났음을 확인할 수 있었다.

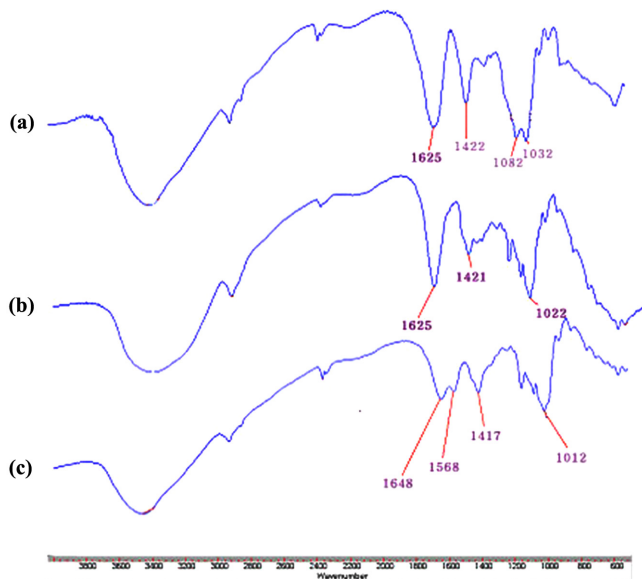


Fig. 5. FT-IR spectra for (a) Na-alginate, (b) Ca-alginate, (c) Chitosan-alginate.

4-3. 건조 방법에 따른 생균수 비교

유산균 캡슐의 건조 후 생균수를 비교 측정하기 위하여 1.5% 알긴산 나트륨으로 만든 캡슐을 유동층 건조와 동결건조의 두 가지 방법으로 건조하였다. 유산균의 보관에서 가장 중요한 점은 유산균의 보관 환경과 시간이다. 유산균은 생성되는 때부터 죽기 시작하기 때문에 시간의 소요가 굉장히 중요한 요소로 작용한다. 유동층 건조는 특별 제작한 유동층 건조기에서 시행 하였으며, 건조 시간은 30~40분이 소요되었다. 수분을 적당히 제거한 샘플을 유동층 건조기에 넣은 후 공기를 유입하여 샘플이 공기에 의해 유동하며 건조가 보다 쉽게 이루어진다. 반면 동결 건조기를 사용하였을 경우, 샘플을 급냉 시킨 후 건조하는데 건조시간이 약 16~24 시간이 소요되었다. 또한 유산균 캡슐의 건조기술로 적용가능한 것인지를 확인하기 위해 동결건조의 경우와 생균수를 비교 측정하였으며, 생균수 측정 결과는 Table 2에 나타내었다.

유산균의 캡슐화 공정 시 생존율은 1~2%이다. 또한 이 두 건조 방법을 유산균의 생균수로 비교해 보았을 때, 유동층 건조 방법은 1 ml당 생균수가 약 2.4×10^9 , 동결 건조방법은 약 3.2×10^9 였다.

이로 미루어 볼 때 비록 유동층 건조 방법이 동결 건조 방법보다 0.75:1의 비로 생균수가 작지만, 동결건조방법은 건조시간이 유동층 건조방법에 20배 이상이므로, 유동층 건조 방법이 동결 건조 방법 보다 유리하다고 할 수 있다.

4-4. 키토산과 유산균의 상관관계

키토산이 항균능력을 가지고 있다는 것은 많이 알려진 사실이다.

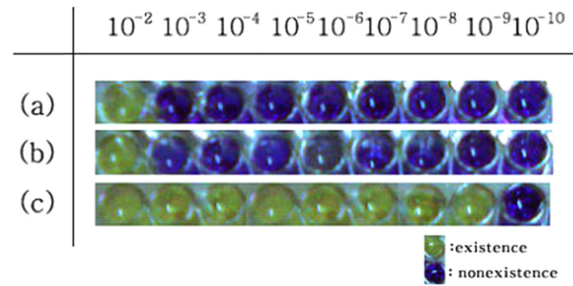


Fig. 6. Observation of survival bacteria number at several conditions, (a) 1.0% chitosan solution of pH 5, (b) 2.0% chitosan solution of pH 5 (c) non-chitosan solution of pH 5.

또한, 키토산과 알긴산을 이용한 코팅 방법은 현재 많은 연구 중에 있다. 그래서 키토산의 항균능력이 유산균에도 영향을 미치는지 알아보기 위해 다음 실험을 하였다.

0.5% (v/v) 아세트산 수용액에 1.0~2.0% (w/v) 키토산과 4% (w/v) CaCl_2 를 첨가한 후 0.5 M NaOH로 적정하여 pH 5에 고정된 키토산 수용액에 유산균을 첨가한 알긴산을 인젝터로 용액에 떨어뜨려 캡슐을 제조 하였다. 이 캡슐을 유동층 건조법으로 건조한 후 분쇄기에서 분쇄하여 80 μm 체에 쳐서 샘플을 채취하였다. 이를 희석법으로 희석한 후 BCP 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다. 대조군으로는 pH 5에 고정시킨 4% CaCl_2 수용액을 사용하였으며 이 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

알긴산을 이용한 캡슐은 희석배수 10^{-9} , 즉 약 1×10^9 마리 이상의 균이 존재하고, 키토산을 이용한 캡슐은 희석배수 10^{-3} , 즉 약 1×10^3 마리의 균이 존재함을 확인 할 수 있었다. 이는 키토산이 가지고 있는 항균 활성 능력 때문이라 추측된다.

4-5. pH 안정성

소화기관에 투입되어 인체에 유익한 작용을 하기 위해서는 위산에 잘 견디 소화기관인 소장, 대장까지 안정성을 유지해야 하는 것이 중요하다. 이를 알아보기 위해 pH 4.65, 6.01인 경우 실험 결과 캡슐은 안정하였으며, pH 7.07, 8.35에 대한 샘플에 대해서는 Table 3에 나타내었다.

측정 시간 0~20분까지는 모든 샘플이 팽창만 일어나고 안정하였다. 하지만 pH 7.07와 pH 8.35에서의 샘플은 30분이 지나면서 붕해 현상이 일어나 캡슐이 깨지는 것을 확인할 수 있었다. 반면, pH 4에서의 캡슐은 96시간 경과 후에도 단순 swelling만 일어나고 캡슐의 형태는 변하지 않았다. 이는 중성, 염기성에서 재 팽윤이 일어나는 알긴산의 특징에 의한 것으로 볼 수 있다.

알긴산의 농도가 높을수록 붕해 현상이 지연됨도 알 수 있다. 이는 알긴산의 농도가 높을수록 가교 결합이 많이 일어나고 캡슐의 세기가 단단하기 때문이라고 할 수 있다. 또한 키토산이 함유된 캡슐은

Table 2. Survival *L. acidophilus* in capsules prepared by two drying method, fluidized drying and freeze drying

	<i>L. acidophilus</i> Before drying	After Fluidized drying	After Freeze drying
Visible cells I	2.5×10^{11}	3.2×10^9	4.3×10^9
Survival ratio (%)	—	1.5	1.7
Visible cells II	8.0×10^{10}	1.55×10^9	2.1×10^9
Survival ratio (%)	—	1.9	2.6
Average visible cells	1.7×10^{11}	2.4×10^9	3.2×10^9
Average survival ratio (%)	—	1.4	1.9

Table 3. pH stability of capsules in 0.1M phosphate buffer solution (pH 7.07 and 8.35); (+) existing, (-) breaking

Sample	pH	Time/hr						
		0.5	1	3	18	24	48	96
A	7.07	+	+	-	-	-	-	-
	8.35	+	-	-	-	-	-	-
B	7.07	+	+	-	-	-	-	-
	8.35	+	+	-	-	-	-	-
C	7.07	+	+	-	-	-	-	-
	8.35	+	+	-	-	-	-	-
D	7.07	+	-	-	-	-	-	-
	8.35	+	-	-	-	-	-	-
E	7.07	+	-	-	-	-	-	-
	8.35	+	-	-	-	-	-	-
F	7.07	+	+	-	-	-	-	-
	8.35	+	+	-	-	-	-	-

그렇지 않은 캡슐보다 캡슐의 세기가 단단한 것을 확인할 수 있는데 이것은 알긴산과 키토산의 정전기적 작용에 의한 것으로 추측된다. 또한 키토산은 염기성 바이오 고분자 이므로 산성보다는 염기성에서 강함을 알 수 있다.

4-6. 팽창(Swelling) 시험

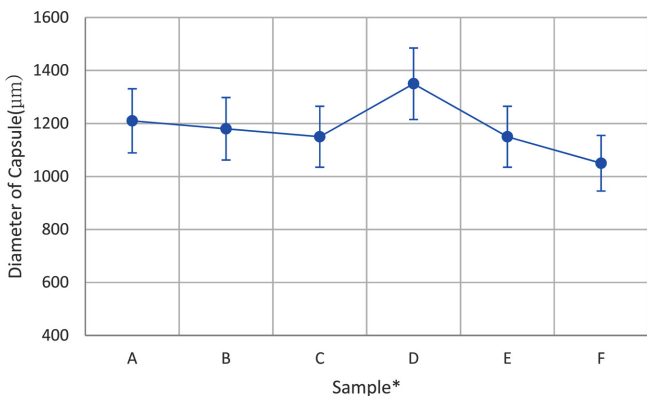
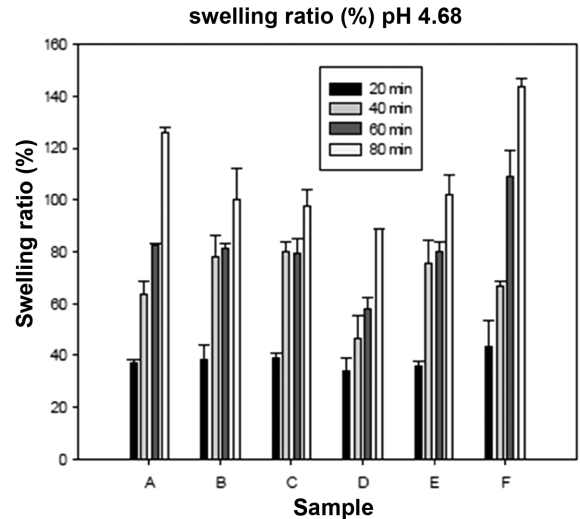
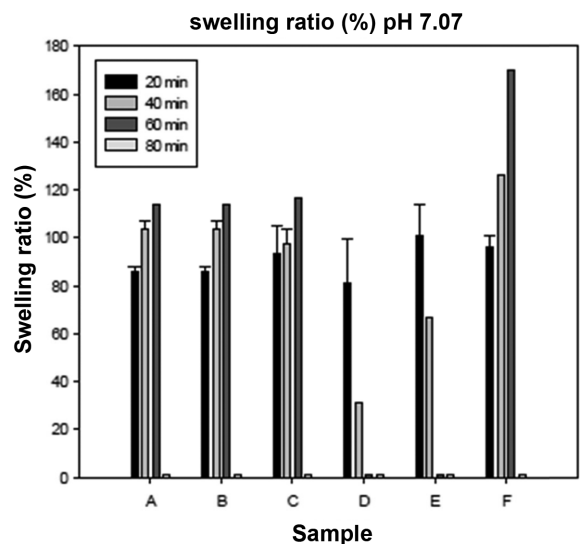
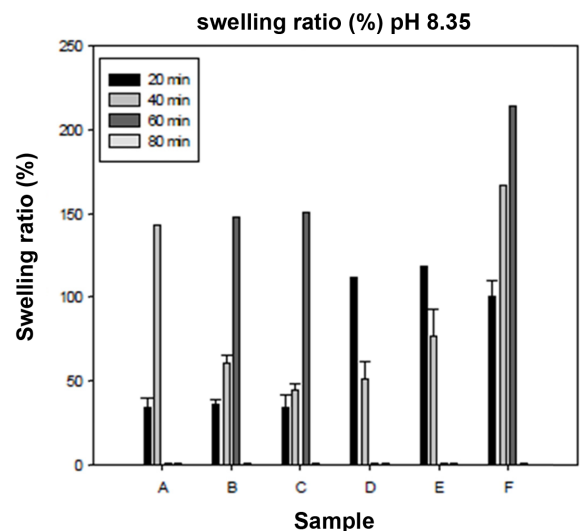
먼저 전자 현미경을 이용하여 팽윤 전의 캡슐의 지름을 측정하고 0.1 M 인산염 완충용액에 넣어 각각 실온(22±2 °C)에서 교반한 후 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 지름을 측정하였으며 팽창율은 퍼센트로 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Swelling (\%)} = (D_t - D_0) / D_0 * 100$$

여기서, D_0 는 초기 지름, D_t 는 t 시간이 흐른 후의 지름이다.

건조 후 샘플의 크기를 측정한 결과 알긴산 나트륨 농도가 높은 것이 크기가 가장 작았다(Fig. 7) 알긴산 나트륨의 농도가 높을 수록 가교가 많이 일어나기 때문이라고 생각된다. 각 농도에 따른 각 샘플의 팽창에 대한 그래프를 Fig. 8~10에 나타내었다.

pH 4.68에서는 전체적으로 100% 이상의 팽창이 일어나지만 캡슐의 형태는 안정하였다. 알긴산의 농도가 높을수록 팽창율이 커지는 경향이였다. pH 7.07과 pH 8.35에서는 키토산은 염기성 바이오 고분자 이므로 염기성에서 알긴산보다 강한 특성을 보이지만 1시간 경과한 후 모든 캡슐이 완전히 붕해가 일어나 크기 측정이 불가하였다.

**Fig. 7. Size of capsules for several samples according to Na-alginate concentration.****Fig. 8. Swelling ratios of several samples in 0.1 M phosphate buffer solution (pH=4.65).****Fig. 9. Swelling ratios of several samples in 0.1 M phosphate buffer solution (pH=7.07).****Fig. 10. Swelling ratios of several samples in 0.1 M phosphate buffer solution (pH=8.35).**

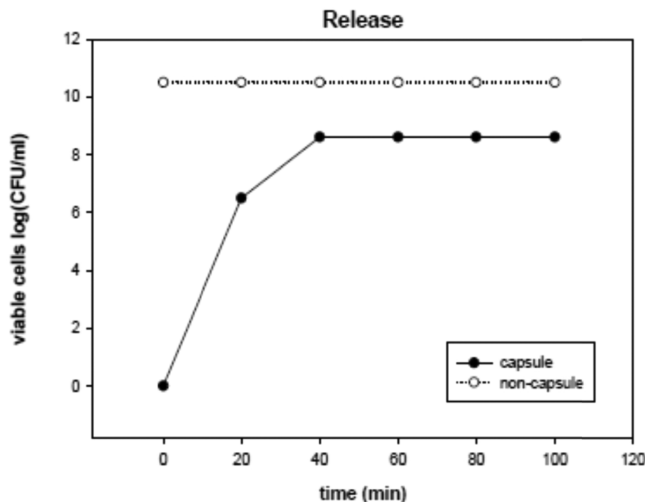


Fig. 11. Lactic acid bacteria release with time in 0.1 M phosphate buffer solution (pH=7.07).

4-7. 방출 실험

소화기관인 소장은 pH는 7.0 이상의 염기성을 띄므로 유사한 조건에서 시간에 따른 유산균의 방출속도를 실험하였으며 실험 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 실험에 사용된 용액은 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) (pH=7.07)이고 샘플은 1.5% 알긴산 나트륨으로 제조된 캡슐을 사용하였다. 그의 대조군으로 캡슐화 하지 않은 유산균을 직접 사용하였다. 캡슐 샘플 1 g을 PBS 10 ml에 넣고 실온에서 교반하며 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 희석법에 의해 희석하여 MRS 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다. 이때 배양 조건은 37 °C, 18~20 hr 이다. 대조군으로 캡슐화하지 않은 유산균 1 g을 직접 PBS 10 ml에 넣어 같은 방법으로 샘플을 제조하였다.

정해진 시간마다 생균수를 측정한 결과 알긴산나트륨은 pH 7 이상에서 서서히 붕해가 일어나며 내부 물질이 방출되었으며 약 40분 후 완전히 방출된 것을 확인할 수 있었다. 이는 소화기관에 투입되었을 때 pH 7이상인 소장, 대장 기관에서 내부 물질인 유산균이 완전히 방출될 수 있음을 알 수 있다.

5. 결 론

건조전알긴산 칼슘과 키토산-알기네이트 캡슐의 표면과 단면을 SEM으로 비교 측정한 결과 키토산을 첨가 한 경우 키토산과 알긴산의 정전기적 반응에 의해 가교 밀도가 높고, 기공도 균일한 것을 알 수 있었다. 또한, 동결 건조한 경우는 유동화 건조한 경우에 비해 표면의 에그박스 형태가 상대적으로 많이 훼손 된 것을 알 수 있었지만 이 부분에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

FT-IR 측정 결과는 에서 -COOH와 -COO의 특정 피크의 세기가 감소함을 관찰할 수 있었으며 이것으로 칼슘 이온과 알긴산의 가교 반응을 확인할 수 있었고, 또한, 키토산과 알긴산이 결합함을 알 수 있었다.

캡슐을 제조한 후 기존의 건조 방법인 동결 건조방법과 본 연구에서 고안한 유동화 건조장치를 이용하여 건조한 캡슐을 비교 평가하였다. 유동층 건조 방법의 건조시간은 시료에 따라 조금의 차이는 있지만 보통 30~40분이 소요되었으며 동결 건조방법은 16~24시간이 소요되었다. 또한 이 두 건조방법을 유산균의 생균수로 비

교해 보았을 때, 유동층 건조 방법은 1 ml당 균수가 약 2.4×10^9 , 동결 건조방법은 약 3.2×10^9 이었다. 이로 미루어 볼 때 비록 유동층 건조 방법이 동결 건조 방법보다 '0.75:1'의 비로 생균수가 작지만, 짧은 건조 시간을 고려할 때 산업용으로 적용이 가능함을 알 수 있었다.

또한 보조 캡슐재료로 키토산을 이용한 경우 알긴산 칼슘보다 키토산-알기네이트가 산성뿐만 아니라 염기성에서도 강한 면을 보여 주었다. 이는 키토산이 염기성 고분자이며, 알긴산과 키토산은 상호 정전기적 작용에 의해 보다 강한 네트워크를 형성할 수 있기 때문이다. 키토산-알기네이트와 키토산이 첨가되지 않은 캡슐의 생균수를 비교 측정한 결과 같은 조건에서 키토산이 첨가되지 않은 캡슐은 1 ml당 1×10^9 마리의 균이 존재하지만 키토산이 첨가된 캡슐은 1 ml당 1×10^3 마리의 균이 존재함을 알 수 있었다.

캡슐이 소화기관에 투입 되었을 때 안정성을 알아보기 위해 pH 안정도, 팽윤 그리고 방출 실험을 한 결과 알긴산 나트륨을 이용하여 만든 캡슐은 산성에서는 단순 팽창만 일어나고 안정하지만 pH 7이상의 상태에서는 팽창과 붕해가 동시에 일어나 내부 물질을 완전히 방출함을 알 수 있었다. 이는 유산균을 함유한 캡슐이 인체 내에 투입되었을 때 위산에 잘 견뎌내고, 소장과 대장에서 붕해가 잘 일어날 수 있음을 보여준다.

References

1. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., "Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt," *International Dairy Journal*, **13**, 3-13(2003).
2. Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S. and Noori, N., "Effect of Chitosan-alginate Encapsulation with Inulin on Survival of Lactobacillus Rhamnosus GG During Apple Juice Storage and Under Simulated Gastrointestinal Conditions," *Food Science and Technology*, **69**, 365-371(2016).
3. Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F., Marzo, F. and Villarin, M. C., "Microencapsulation of a Probiotic and Prebiotic in Alginate-chitosan Capsules Improve Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions," *International Journal of Food Microbiology*, **142**, 185-189(2010).
4. Hyndman, C. L., Groboillot, A. F. and Poncelet, D., "Microencapsulation of Lactococcus Lactis Within Cross-linked Gelatin Membranes," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **56**, 259-263(1993).
5. Larisch, B. C., Poncelet, D. and Champagne, C. P., "Microencapsulation of Lactococcus Lactis ssp. Cremoris," *Journal of Microencapsulation*, **11**, 189-195(1994).
6. Jankowski, T., Zielinska, M. and Wysakowska, A., "Encapsulation of Lactic Acid Bacteria with Alginate/starch Capsules," *Biotechnology Techniques*, **11**, 31-34(1997).
7. Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Peter, J. C. and Smith, D. T., "Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model," *Febs Letters*, **32**, 1(1973).
8. Kang, J. Y. and Seo, S. H., "Controlled Release of Piracetam Used Alinate Beads," *Bull. K. H. Pharma. Sci*, **26**, 83-103(1998).
9. Jarudilokkul, S., Tongthammachai, A. and Boonmuayvittaya, V., "Preparation of Chitosan Nanoparticles for Encapsulation and Release of Protein," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(5), 1247-1251(2011).

10. Seong, I. K., Song, J. Y. and Kim, B. S., "Preparation of Chitosan/Poly- γ -glutamic Acid Nanoparticles and Their Application to Removal of Heavy Metals," *Korean Chem. Eng. Res.*, **49**(4), 475-479(2011).
11. Devi, M. G., Dutta, S., Hinai, A. T. A. and Feroz, S., "Studies on Encapsulation of Rifampicin and Its Release from Chitosan-dextran Sulfate Capsules," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(1), 118-124(2015).
12. Walker, W. A. and Duffy, L. C., "Diet and Bacterial Colonization: Role of Probiotics and Probiotics," Elsevier Science Inc, (1998).
13. Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D. and Zhang, M., "Chitosan-alginate Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Biomaterials* **26**, 3919-3928(2005).
14. Moon, H. S., "Industrial Use and Development Direction of Lactic Acid Bacteria," *Food Industry and Nutrition*, **6**, 71-77(2001).
15. Chung, D. H., "The Science of Lactobacillus," Shinil Co., (2004).
16. Jung, H. K., Kim, E. R. and Juhn, S. L., "Adherence of Probiotics to Gastrointestinal Track and Their Promoting Factors," *J. Korean Dairy Technol. Sci.*, **19**, 125-132(2001).
17. Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A. and Tolken, R. H., "Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus Thermophilus to Infants in Hospital for Prevention of Diarrhea and Shedding of Rotavirus," *The Lancet*, **344**, 1046-1049(1994).