



# 유산균의 미세캡슐화 기술

Microencapsulation of lactic acid bacteria

조영희

Young-Hee Cho

단국대학교, 동물자원학과

Department of Animal Resource and Science, Dankook University

## I. 서론

최근 삶의 질, 건강과 식이에 대한 소비자들의 관심이 증가하면서 기본적인 영양성분 공급을 넘어 건강을 향상시켜 주는 식품에 대한 요구가 크게 증가하고 있다. 이러한 요구는 기능성 식품의 구매 증가와도 밀접한 관련이 있다. 건강증진의 효과가 입증된 여러 기능성 식품 중에서 가장 빠르게 성장하고 있는 품목 중의 하나가 프로바이오틱(probiotic) 유산균이 함유된 제품들이다. Probiotic은 ‘생명을 위하여(for life)’라는 그리스 말에서 유래하며 ‘섭취시 장내미생물의 성질을 개선시켜 숙주에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물의 단독 또는 복합균주’를 말한다(Ann, 2011). 프로바이오틱 유산균이 숙주에게 유익한 영향을 주기 위해 가장 중요한 요소 중 하나는 생균수와 활력이다. 프로바이오틱 유산균이 체내에서 효과적으로 작용하기 위해서 하루에 권장되는 생균수는

$10^6$  cfu/g 이다. 이 정도 생균활성을 유지해야 유당 불내증의 감소, 정상 장내균총의 유지, 면역력 강화, 항암활성 등의 유용한 작용을 기대할 수 있다 (Sohail *et al.*, 2013).

경구 투여된 유산균은 pH 2인 위의 염산환경, 단백질 가수분해 효소인 pepsin의 공격, 항생작용을 하는 담즙산 등으로 인해 위장과 소장상부에서 사멸될 수 있으므로 이러한 환경에서 생존할 수 있도록 하는 방법이 필요하다. 또한 제품의 제조공정과 유통기한까지 생균수와 생리활성을 유지하는 것 또한 해결해야 할 과제이다. 이러한 필요에 의해 프로바이오틱 유산균을 캡슐화하거나 코팅하는 방법이 대두되기 시작하였으며, 이 때 캡슐은 외부로부터 내부의 유산균을 보호하고 안정성과 견고성을 가져야 하며 동시에 장내에서는 파괴되어 목적인 곳에 유산균이 유리되어야 한다 (Ann, 2011; Martin *et al.*, 2013).

캡슐화(Encapsulation)기술은 고체, 액체, 기체상

Corresponding authors: Young-Hee Cho  
 Department of Animal Resource and Science, Dankook University  
 Cheonan, 330-714, Korea  
 Tel: 82-41-550-3658  
 Fax: 82-41-622-2207  
 E-mail: yhcho@dankook.ac.kr

의 물질을 특정 조건하에서 조절된 속도로 내용물을 방출할 수 있도록 어떤 물질이나 조직내부에 포장하는 기술로 미세한 포장단위를 미세캡슐(microcapsule)이라 하며 크기는 수  $\mu\text{m}$  단위에서 수  $\text{mm}$ 로 다양하다(Cho *et al.*, 1997). 내부에 코팅되는 물질은 core material(핵물질), payload, active, internal phase, fill 등으로 부르며, 외부의 피복부위는 wall material(피복물질), carrier, membrane, shell, coating 등으로 부르는데 이 피복부위는 두께와 층수에 따라 다양하게 분류된다. 미세캡슐은 불안정한 핵물질을 외부환경으로부터 보호하므로 핵물질의 안정성을 향상시키고, 저장기간을 늘려 줄 뿐만 아니라 내용물이 원하는 시점에 용출될 수 있도록 용출속도를 조절하는 목적으로 이용되고 있다(Vidhyalakshmi *et al.*, 2009).

유산균의 미세캡슐, 특히 식품분야에 있어서 미세캡슐의 이용은 다른 공업분야와 비교해 볼 때 사용 가능한 피복물질이나 용매에 제약이 있고, 처리비용, 기능성 등을 고려하여 적절한 공정을 선택하는 것이 중요하다.

## II. 본론

### 1. 유산균 미세캡슐화 방법

#### 가. 분무 건조(Spray drying)

분무 건조는 식품산업에서 미세캡슐화를 하는 상업화된 방법 중 가장 오래된 것으로, 경제적이다. 그 생산수율도 가장 높다(Kailasapathy, 2002). 분무 건조에 의한 미세캡슐화는 피복물질을 수화시킨 후 대상물질을 분산시키고 이 혼합물을 고온의 chamber로 분무하는 것을 말한다. 피복물질 용액이 분무시스템으로부터 미립화되어 총면적이 증대되면서 열풍공기와의 접촉으로 급속히 증발을 일으키고 매트릭스 또는 다핵성의 미세캡슐을 형성한다(Cho *et al.*, 1997).

이 공정의 장점은 대량화가 용이하고 제조단가가 낮으며, 연속적으로 미세캡슐을 제조할 수 있

다는 것이다. 그러나 공정에 이용되는 100-180°C 정도의 고온과 급속건조가 살아있는 프로바이오틱 균주에는 적합하지 않다는 단점이 지적되어 왔다(Kailasapathy, 2002). 그러므로 최근에는 피복물질과 분무 건조 공정조건을 달리하여 유산균의 생존력을 높이고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다. Desmond 등(2002)은 *Lactobacillus paracasei* NFBC 338의 캡슐화에 피복물질로 아라비아 검을 사용하였을 때, 분무 건조 공정에서 균주의 생존율이 10배 정도 증가하는 결과를 보였다. Lian 등(2002)은 inlet 온도와 outlet 온도를 각각 100°C와 50°C로 설정하고 피복물질로 10% 젤라틴과 아라비아 검을 사용하여 분무건조 공정 중 비피더스균의 생균활성을 향상시켰다고 보고하였다.

#### 나. 외부 젤화법(Extrusion/external gelation)

외부 젤화법은 alginate나 카라기난과 같은 hydrocolloids를 피복물질로 사용하는 캡슐공정 중 가장 오래되고 일반적인 방법 중의 하나이다. Hydrocolloid(예, Na-alginate) 수용액에 균주를 혼합하고, 주사기(lab scale)나 extruder(pilot scale)를 통과하여 gelling 용액(예,  $\text{CaCl}_2$ 와 같은 2가 양이온 용액)에 떨어뜨려 캡슐을 제조한다(Reis *et al.*, 2006; 2006; Serna-Cock and Vallejo-Castillo, 2013). Na-alginate 수용액에 칼슘이온을 첨가하여 열에 안정한 젤을 형성할 수 있으며, 칼슘이온은 시간이 지남에 따라 alginate 내부로 확산되어 들어가면서 단단한 젤을 형성한다(Cho *et al.*, 1997).

캡슐의 크기와 모양은 사용되는 노즐의 직경, 노즐과  $\text{CaCl}_2$  용액 사이의 거리 등에 따라 달라진다. 이 방법은 단순하고 경제적이다, 무엇보다도 독성이 강한 용매를 사용하지 않으므로 유산균 캡슐에 가장 적합한 방법 중 하나이다(Dong *et al.*, 2013). 그러나 캡슐의 크기가 노즐의 직경에 제한을 받고 캡슐의 형태가 일정하지 않으며 점도가 너무 높은 용액은 사용에 제약이 있으며, 또한 공정을 scale-up 하는데 어려움이 있다는 단점이 지적되어 왔다(Reis *et al.*, 2006). 최근에는 lab-scale



의 air spray gun (Lee *et al.*, 2004) 이나 encapsulator와 같은 prototype microencapsulation system(Chandramoulia *et al.*, 2004)을 고안하여 캡슐의 크기 및 scale-up에 대한 단점을 개선하려는 노력이 이루어지고 있다.

다. 에멀전-내부 젤화법(Emulsification internal gelation)

피복물질 용액을 한 방울씩 떨어뜨리는 기존의 외부 젤화법의 단점을 개선하기 위해 고안된 방법이다. 최근에 프로바이오틱 유산균의 캡슐화에 가장 많이 이용되고 있는 방법으로 유화(emulsification)와 층분리(phase separation)의 2단계 공정으로 진행된다. 먼저 유산균을 함유한 hydrocolloid용액을 유화제가 첨가된 유지에 혼합하여 균질화시켜 W/O형 유화액을 제조한다. 유화액을 서서히 교반하면서 gelling 용액을 첨가하면 내부 젤화과정을 거쳐 단단한 미세캡슐이 형성되고 oil상과 분리된다(Park and Kang, 2005; Serna-Cock and Vallejo-Castillo, 2013). 이 방법은 외부 젤화법에 비해 캡슐의 형태가 일정하고 scale-up이 비교적 용이하다는 장점이 있지만, 캡슐 크기가 일정하지 않고 유지 사용에 의한 제조원가 상승과 폐기물 처리의 어려움이 있다.

라. 효소를 이용한 캡슐방법

유청단백질이나 카제인 등의 단백질계 피복물질의 효소적 젤화를 이용한 캡슐방법으로 transglutaminase 효소를 이용한 캡슐화 방법이 많이 알려져 있다(Serna-Cock and Vallejo-Castillo, 2013). 제조공정은 그림 1에서 보는 바와 같다. Zou 등(2012)은 transglutaminase를 이용하여 *Bif. bifidum*을 캡슐화 한 결과, 분무건조 공정에 의해 제조한 캡슐에 비해 프로바이오틱 유산균의 보호효과가 현저히 증가하였다고 보고하였다.

2. 유산균 캡슐에 사용되는 피복물질

캡슐화 공정에 사용되는 피복물질은 여러 고분

자 화합물 중에서 캡슐의 물리·화학적 특성을 고려하여 선택하여야 한다. 이상적인 피복물질의 조건을 살펴보면 다음과 같다(Agnihotri *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 1997;).

- ① 흡습성이 낮고, 점도가 높지 않아 캡슐화 공정 중 조작성이 용이할 것
- ② 우수한 유화력과 유화안정성
- ③ 가공과 저장 중 핵물질과 반응성이 적을 것
- ④ 핵물질의 방출억제
- ⑤ 외부환경으로부터 핵물질의 보호
- ⑥ 맛과 색을 갖지 않으며, 필름 형성능력이 우수할 것
- ⑦ 식품산업에서 사용이 허용된 용매(물, 에탄올 등)에서 용해도가 우수할 것
- ⑧ 경제성이 우수할 것

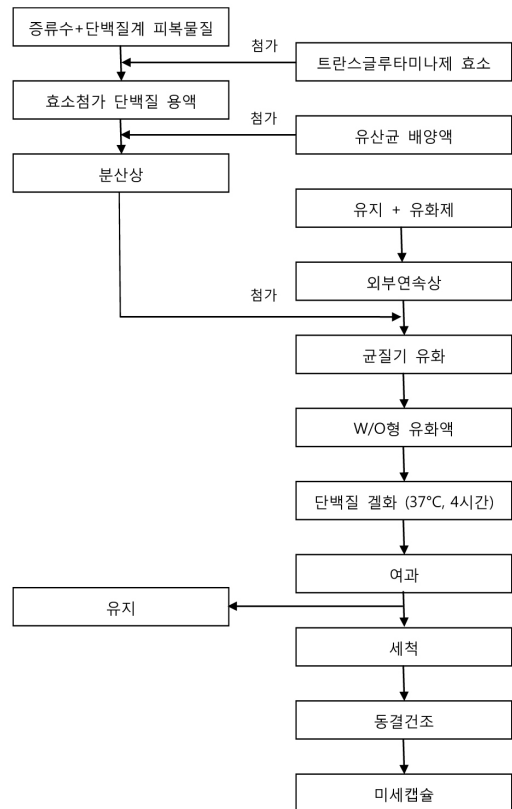


그림 1. Transglutaminase를 이용한 유산균 캡슐 제조과정(Park *et al.*, 2006).

가. Sodium alginate(알긴산)

Sodium alginate는 현재까지도 유산균 캡슐에 가장 많이 이용되는 피복물질이다. 구조는 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid로 구성되어 있으며,  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond으로 연결되어 있다. 이 두 monomer의 비에 따라 3가지 type으로 구분되는데 M 구획(polymannuronic), G 구획(polyguluronic), MG 구획이다. G 구획의 함량이 많을수록 좀 더 굳은 다공성 젤의 형성과 젤 상태를 오랫동안 유지하는 경향이 강하다. 그림 2에서 보는 바와 같이, sodium alginate용액에  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ 와 같은 2가 양이온을 첨가하면 서로 평행한 두 G 구획 부위 사이에 존재하는 2개의 카르복시기와 2개의 히드록시기로 이루어진 빈 공간을 채워, V 모양의 구멍을 가지는 달걀 상자 모델의 3차원의 입체구조를 형성하여 젤화가 이루어진다(Park and Kang, 2005; Yoon et al., 2002).

Alginate를 단독으로 사용한 캡슐은 다공성 형태를 띄기 때문에 칼슘 킬레이트제(Ca chelating agent), 일가 이온(monovalent ion), 또는 극한 외부 환경에 비교적 취약하다는 단점이 있다(Martin et al., 2013). 이를 보완하기 위해 말토덱스트린(Sohail et al., 2013), 젤란검(Rosas-Flores et al., 2013), unmodified starch(Martin et al., 2013), 키토산(Krasaekoopt et al., 2004; Kanmani et al., 2011) 등의 고분자화합물을 alginate와 함께 피복물질로 사용하거나 다중 캡슐화하는 연구가 진행되었으며 캡슐제조 공정, 저장기간뿐만 아니라 *in vitro* 위장관 실험에서도 생균활성이 크게 증가했다는 연구 결과를 보이고 있다.

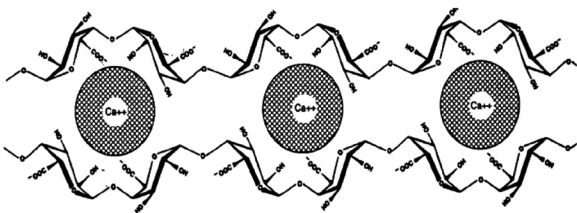


그림 2. Alginate와 칼슘이온의 상호작용(Rousseau et al., 2004).

나. Gum arabic(아라비아 검)

가장 일반적으로 사용되는 캡슐화 물질로 Acacia나무에서 자연적으로 추출되는 hydrocolloid이다. 구조는  $\beta$ -D-galactopyranose가 1,3결합으로 연결된 주사슬의 6위치에 L-rhamnose, D-glucuronic acid와 L-arabinose 등의 구성당이  $\alpha$  또는  $\beta$ -1, 6결합으로 연결되어 있으며, 약 2%의 단백질이 결합되어 있다(Desmond et al., 2002; Yoon et al., 2002). 단백질부분에서 발견되는 아미노산은 주로 serine과 hydroxyproline으로 이들은 소수성을 나타내며, glucuronic acid는 유화액에서 oil particle의 주위에 음전하를 띄어 유화성질을 갖는다. 또한 분자의 형태가 구형이며, 가지가 많은 분자구조를 가지고 있어 분자구조 내에 비슷한 구성당을 갖거나 분자량을 갖는 다른 물질과 비교 시 수용액에서 낮은 점도를 갖는 독특한 성질을 갖는다. 또한 수용액에서 50%까지 용해가 가능하며, 낮은 pH에서도 안정하며 결합력이 뛰어나서 피막형성과 표면활성의 특징을 갖는다(Yoon et al., 2002). Gum arabic은 분무건조공정을 이용하여 유산균을 캡슐화할 때 피복물질로 많이 사용되고 있다.

다. 기타 검류

위에 설명한 2종류의 hydrocolloid 외에 다양한 검류가 캡슐공정에 피복물질로 사용되고 있다. 구아검, 카라기난, 로커스트 콩검, 젤란검 등이 유산균캡슐에 이용되고 있는데, 단독으로 사용되기 보다는 다른 피복물질과 함께 사용하는 경우가 많다. 구아검과 로커스트 콩검은 galactomannan을 주사슬로 하고 있으며, 카라기난은 D-galactose-4-sulfate와 3, 6 dehydrated-D-galactose가 결합한 구조를 가진 천연 다당류로 식품 첨가제로 많이 사용되고 있다(Shi et al., 2013).  $\kappa$ -카라기난의 수용액을 만들어 냉각시키면 double-helix구조의 형성이 3차원적 망상구조를 이루어 겔화된다. 젤란검은 *Pseudomonas elodea*가 생성하여 분비하는 직선형의 음이온성 복합다당류이다. 기본구조는 4당류



반복 단위(1,3-β-D-glucose, 1,4-β-D-glucuronic acid, 1,4-β-D-glucose와 1,4α-L-rhamnose)로 구성되어 있다(Rosas-Flores *et al.*, 2013). 이들은 모두 긴 사슬 형태로 존재하므로 부피가 커서 낮은 농도에서도 점도가 매우 높은 용액을 형성하며 온도를 낮추면 겔을 형성하게 된다(Yoon *et al.*, 2002). 젤란검은 냉수에 녹아 점성이 큰 용액을 형성하는데, 0.05-0.4% 정도의 매우 낮은 농도에서도 강도 높은 겔을 형성할 수 있다. 이러한 특징 때문에 전분이나 다른 겔화제에 첨가되어 안정화와 구조화에 기여하며, 미세캡슐화에서 이점을 가지고 있다.

Shi 등(2013)은 *Lactobacillus bulgaricus*를 카라기난과 로커스트 콩검으로 다중캡슐화하여 위장관에서 유산균의 안정성을 향상시켰으며, 저장 중 생존활성이 1달간 유지되었다고 보고하였다. Rosas-Flores 등 (2013)은 alginate에 젤란검을 첨가하여 유산균을 캡슐했을 때, 캡슐효율과 균주의 안정성이 증가했다고 보고하였다.

### 라. 단백질

피막형성능력이 있는 단백질로는 젤라틴, 분리대두단백, 유청단백질, 카제인 등이 있다. 이들 단백질의 물리화학적 특성을 살펴보면, 한 분자 구조 내에 다른 화학 그룹이 배열되어 있고 양쪽성을 가지며 다른 물질들과의 상호반응성이 있고 분자량이 크다. 또한, 용해성, 점도, 유화력, 피막형성 능력 등의 기능적 특성이 우수하다(Cho *et al.*, 1997). 유청단백질은 분무건조공정(Picot and Lacroix, 2004), 에멀전-내부 젤화 기술(Gerez *et al.*, 2012), transglutaminase 효소를 이용한 캡슐화 방법 (Zou *et al.*, 2012) 등 최근 유산균 미세캡슐 공정에서 피복물질로의 이용이 점차 증가하고 있다.

### III. 결론

미세캡슐화 기술은 단순한 고정화기술 (immobilization technology)에서 복잡한 캡슐화 공정까지 다양하게 개발되어 왔다. 프로바이오틱 유산균주의 미

세캡슐화에 있어 가장 중요한 것은 캡슐화 공정뿐만 아니라 이후, 저장기간 중에서 균주의 안정성, 생존력 및 적정균수를 유지하는 것이며, 이후 식품에 적용되었을 때 이용효율을 높이는 것이다. 이를 위해 미세캡슐화된 유산균주가 유산균수와 생리활성을 유지하기 위해서는 몇 가지 사전 고려가 필요하다. 첫번째, 캡슐 전 유산균 농축물의 균수 농도와 old cell과 young cell의 비율, 두번째, 가공공정상에서의 활력저해 요인에 대한 고려, 세번째, 물리적 충격에 대한 buffering effects의 고려 등이다. 이러한 여러 가지 문제점과 고려사항에 의해 살아있는 프로바이오틱 유산균을 미세캡슐화하는 기술을 상업화 대량화하는 방법은 다른 분야에 비해 크게 발전하지 못하고 있다. 최근에는 프로바이오틱과 프리바이오틱을 함께 캡슐화하여 symbiotic 효과를 통한 위장관에서의 균주의 생존력 및 생존활성을 증대시키고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이와 같이 미래에는 유산균 캡슐의 상업화 및 대량화를 위한 연구와 더불어 프로바이오틱과 프리바이오틱 또는 프로바이오틱과 영양·기능성분을 함께 캡슐화 하는 co-encapsulation 기술에 대한 연구가 필요하다.

### 참고문헌

1. Agnihotri, N., Mishra, R., Goda, C., and Arora, M. (2012) Microencapsulation – A novel approach in drug delivery: A Review. *Indo Global J. Pharm. Sci.* **2**, 1-20.
2. Ann, Y. G. (2011) Probiotic lactic Acid bacteria. *Korean J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
3. Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peirisb, P., and Jonesb, M. (2004) An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Meth.* **56**, 27-35.
4. Cho, Y. H., Shin, D. S., and Park, J. Y. (1997) Microencapsulation technology in food industry. *Food Sci. Ind.* **30**, 98-111.
5. Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., and Stanton, C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 1003-1011.
6. Dong, Q. Y., Chen, M. Y., Xin, Y., Qin, X. Y., Cheng, Z., Shi, L. E., and Tang, Z. X. (2013) Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *Int. J.*

- Food Sci. Technol.* **48**, 1339–1351.
7. Gerez, C. L., Font de Valdez, G., Gigante, M. L., and Grosso, C. R. F. (2012) Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Lett. Appl. Microbiol.* **54**, 552-556.
  8. Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **3**, 39-48.
  9. Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul V. (2011) Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC 13 for long-term storage. *Biochem. Eng. J.* **58-59**, 140-147.
  10. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737-743.
  11. Lee, J. S., Cha, D. S., and Park, H. J. (2004) Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7300-7305.
  12. Lian, W. C., Hsiao, H. C., and Chou, C. C. (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 79-86.
  13. Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. (2013) Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT-Food Sci. Technol.* **53**, 480-486.
  14. Park, J. Y., Cho, Y. H., Shim, H. K., Lee, J. H., Choi, K. H., and Choi, S. W. (2006) Preparing Method of Microcapsule Comprising Oil and Fat. Korea Patent 10-0616133.
  15. Park, S. J. and Kang, J. Y. (2005) Preparation and characterization of calcium alginate microcapsules by emulsification-internal gelation. *Polymer* **29**, 369-374.
  16. Picot, A. and Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* **14**, 505-515.
  17. Reis, C. P., Neufeld, R. J., Vilela, S., Ribeiro, A. J., and Veiga, F. (2006) Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J. Microencapsulation* **23**, 245-257.
  18. Rosas-Flores, W., Ramos-Ramirez, E. G., and Salazar-Montoya, J. A. (2013) Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydr. Polymer.* **98**, 1011-1017.
  19. Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J. F., and Muller, G. (2004) Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *Eur. Polym. J.* **40**, 2709-2715.
  20. Serna-Cock, L. and Vallejo-Castillo, V. (2013) Probiotic encapsulation. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**, 4742-4753.
  21. Shi, L. E., Li, Z. H., Zhang, Z. L., Zhang, T. T., Yu, W. M., Zhou, M. L., and Tang, Z. X. (2013) Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 147-151.
  22. Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., and Bhandari, B. (2013) The viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in alginate and maltodextrin. *Food Bioproc. Technol.* **6**, 2763-2769.
  23. Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., and Subhasree, R. S. (2009) Encapsulation “the future of probiotics” a review. *Adv. Biol. Res.* **3**, 96-103.
  24. Yoon, S. K., Oh, H. I., Lee, H. J., Moon, T. H., and Noh B. S. (2002) Food Chemistry. Soohaksa, Seoul, Korea, pp. 115-132 (in Korean).
  25. Zou, Q., Liu, X., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. P., Zhang, H., and Chen, W. (2012) Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in whey protein-based microcapsules by transglutaminase-induced gelation. *J. Food Sci.* **77**, M270-M277.