pISSN 2384-0269
eISSN 2508-3635

J Milk Sci Biotechnol 2017;35(3):143-151
https://doi.org/10.22424/jmsb.2017.35.3.143

REVIEW

# 비피도박테리아의 생존성 증진을 위한 캡슐화 기술

송민유 · 박원서 · 유자연 · 함준상*

농촌진흥청 국립축산과학원

# Microencapsulation Technology for Enhancement of *Bifidobacterium* spp. Viability: A Review

Minyu Song, Won Seo Park, Jayeon Yoo, and Jun-Sang Ham*

National Institute of Animal Science, RDA

**Received:** September 18, 2017
**Revised:** September 25, 2017
**Accepted:** September 26, 2017

*Corresponding author :
Jun-Sang Ham
National Institute of Animal Science.
RDA. Wanju, Korea.
Tel : +82-63-238-7366,
Fax : +82-63-238-7397,
E-mail : hamjs@korea.kr

**Copyright** © 2017 Korean Society of Milk Science and Biotechnology.
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.

## Abstract

The intestinal microbiota has been shown to have a vital role in various aspects of human health, and accumulating evidence has shown the beneficial effects of supplementation with bifidobacteria for the improvement of human health, ranging from protection against infection to various positive effects. However, maintaining bacterial cell viability during storage and gastrointestinal transit remains a challenge. Microencapsulation of probiotic bacterial cells provides protection against adverse conditions during processing, storage, and gastrointestinal passage. In this paper, we review the current knowledge, future prospects, and challenges of microencapsulation of probiotic *Bifidobacterium* spp.

## Keywords

*Bifidobacterium*, encapsulation, viability

## 서 론

유익한 박테리아는 종종 기능성 식품 및 영양 보충제에 포함되어 생균제로 섭취된다. 이는 사람뿐만 아니라, 가축에서 건강을 증진하고, 병원균 부담을 경감하기 위해 직접 급여하는 미생물(direct-fed microbials)을 포함한다(Puccio *et al*., 2007; Neal-McKinney *et al*., 2012; Watson and Preedy, 2015). *Bifidobacterium longum*은 비피도박테리움 속내 알려진 48 분류군의 하나로 인체의 위장관(GIT, Gastrointestinal tract)에 정착한다(Milani *et al*., 2014; Sun *et al*., 2015). 이 절대 혐기균은 유아 장관의 초기 정착자들 중의 하나이지만, 성인 장관에서는 낮은 농도로 존재한다(Schell *et al*., 2002; Sela *et al*., 2008). *Bifidobacterium longum*, *infantis*, 그리고 *suis*는 이전에 별개로 분류되었으나, 최근에 *B. longum*의 아종(subspecies)으로 재분류되었다(Sakata *et al*., 2002). 이들이 하나의 종으로 통일된 것은 일차적으로는 이들 그룹 사이에 유전적 및 표현형적 유사성이 공유된데 기초한다. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*가 종종 프로바이오틱으로 사용되는 반면, *B. longum*은 인류와 함께 진화한 것과 같은 특별한 관심을 받는다. 이것은 *B. longum*이 모유 올리고당을 활용하고, 유아에서 성년까지 보호적 장관 미생물균총을 확립한다는 것에서 명확하다(Sela and Mills, 2010). *Bifidobacterium longum*은 다양한 전달 방식을 이용하여 여러 가지 프로바이오틱스 적용에 효율적으로 이용된다(Adhikari *et al*., 2000; Fortin *et al*., 2011; Amine *et al*., 2014; Lewis *et al*., 2015). 프로바이오틱스가 건강에 유익한 영향을 주기 위해서는 상대적으로 많은 양이 권장되며, 전형적으로 일일 $10^6$~$10^7$ CFU/g이다(Krasaekoopt *et al*., 2003; Roy, 2005). 그런데, 프리바이오틱 세포를 식품에 직접 첨가하는 것은 저장 및 장관 통과시 상당한 세포 생존성 감소를 가져온다(Sultana *et al*., 2000; de Vos *et al*., 2010). 그러므로, 저장 및 소화과정에서 이들 프로바이오

틱스는 건강에 유익함을 달성할 수 있는 권장 수준 아래로 생존성이 감소될지 모른다. 프로바이오틱 세포를 하이드로겔 매트릭스내에 캡슐화하면 외부 환경요인으로부터 보호되어 가공, 저장 및 소화동안 박테리아 생존성을 증진한다(de Vos *et al.*, 2010; Fareez *et al.*, 2015; Yeung *et al.*, 2016). 캡슐화는 장관내에 정확한 활동 위치에서 프로바이오틱스 방출을 조절함으로써 프로바이오틱 효율을 증진시킬 수도 있다(de Barros *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

# 본 론

## 1. 캡슐화에 의한 프로바이오틱스 보호

마이크로캡슐화는 하이드로콜로이드 물질 코팅내에 박테리아 세포를 포집하는 이화학적 또는 기계적 공정으로 높은 산도와 낮은 pH, 담즙산염, 냉온 충격(냉동이나 동결건조와 같은 공정조건으로 유발), 산소, 열 충격(분무건조와 같은 공정으로 유발), 그리고 화학적 항생제와 같은 악조건에서 보호한다(Adhikari *et al.*, 2000; Krasaekoopt *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2000; Mortazavian *et al.*, 2008; Krasaekoopt *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2002). 다른 이점으로는 관능적 안정성 증가나 제품내 균일한 분포를 위한 세포의 고정화도 달성될 수 있다(Mortazavian *et al.*, 2007). 발효제품의 높은 산도와 낮은 pH는 특히 냉장 저장 중 프로바이오틱스의 생존성 손실을 일으키는 주요 요인이다(Shah *et al.*, 1995; Dave and Shah, 1997). 프로바이오틱 캡슐화에 일반적으로 사용되는 기술은 유화(emulsion), 압출(extrusion), 분무건조(spray drying), 동결건조(freeze drying), 그리고 전분에 부착하는 것이다. Kebary *et al.*(1998)은 비피도박테리아를 alginate로 캡슐화하여 냉동 아이스밀크내 생존성을 유의적으로 증가시킨 반면, κ-carrageenan 사용시에는 효과가 없었음을 보였으며, 우유 내에 캡슐화된 *B. longum*이 캡슐화 안된 세포와 비교 시 저장 중 높은 생존성을 보였다(Hansen *et al.*, 2002). 냉장 저장 중 요구르트내 *B. infantis*의 높은 생존성은 세포가 gelatin-xanthan 혼합물로 캡슐화되었을 때 보고되었다. 캡슐화 공정 후 비드의 평균 크기는 3 mm이었다(Sun and Griffiths, 2000). alginate-starch 혼합물로 캡슐화되고, 비드 크기가 0.5~1.0 mm로 캡슐화된 프로바이오틱스는 요구르트에서 저장 중 좀더 생존성이 높다(Sultana *et al.*, 2000). Lee and Heo (2000)는 칼슘 alginate로 캡슐화된 *B. longum*이 위액 유사조건(pH 1.5)에서 생존성이 상당히 증가됨을 보였으며, 캡슐 내 프로바이오틱스의 사멸율이 alginate 농도(1~3%), 비드 크기(1~3 mm), 그리고 초기 세포수가 증가함에 비례하여 감소됨을 발견했다. 위와 유사한 조건(pH 1.5)은 *B. infantis*의 생존수를 극히 낮추지만(30분 후 $1.23\times10^9$에서 <10 cfu/mL), 캡슐화 후에는 같은 조건에서 생존성 손실이 처음 생균수의 0.67%를 초과하지 않았다(Sun and Griffiths, 2000). 저항 전분은 위산, 중성 pH, 그리고 췌장 소화효소에 분해되지 않고 비드가 소장에 들어갔을 때 세포를 방출하기 때문에 프로바이오틱스 캡슐화 목적에 효과적임이 밝혀졌다(Ebglyst *et al.*, 1992; Sun and Griffiths, 2000). 코팅 재료의 형태와 농도뿐만 아니라, 캡슐의 지름도 프로바이오틱스의 생존성을 증가시키는 결정적 요소가 된다.

## 2. 캡슐화 재료

중합체 시스템에서 프로바이오틱 미생물의 캡슐화는 낮은 pH와 높은 담즙 농도로부터 프로바이오틱스를 보호하기 위해 실험실 규모의 공정은 쉬워 보일 수 있다(Anal and Singh, 2007; Heidebach *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2012; Huq *et al.*, 2013). 그런데, 이 공정의 스케일업은 산업적 투자가 필요하다. 캡슐화 재료의 선택은 캡슐의 기능적 특성과 사용되는 코팅 공정에 달려있다. 프로바이오틱 미생물 캡슐화에 일반적으로 사용되는 재료는 κ-carrageenan, alginate, cellulose acetate phthalate, 변성 전분, 키토산, 젤라틴, xanthan, gum arabic, 그리고 동물성 단백질(우유, 젤라틴)이다. 다양한 기술로 생산된 캡슐을 추가적 필름으로 코팅하면 저장 중 산소에 노출을 방지할 뿐만 아니라, 산성 pH에서 안정성을 개선할 수 있다(Jung *et al.*, 2007; Krasaekoopt *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Alginate 캡슐의 코팅은 외부에 1~2 μm의 균일층을 생성하고, 비피도박테리아의 생존을 개선할 수 있다(Annan *et al.*, 2008).

## 3. 캡슐화 방법

### 1) 사출법(extrusion)과 유화법(emulsion)

사출과 유화 기술은 프로바이오틱 미생물 캡슐화의 2가지 기초적 방법이다. 일반적으로, 사출 기술은 간단하고 저렴한 방법으로 세포손상을 최소화하여 프로바이오틱 세포가 상대적으로 높은 생존성을 갖도록 한다. 생체적합성과 유연성도 이 방법의 장점이다. 이 방법의 가장 중요한 단점은 비드의 생성이 늦어 대규모 생산에 적용할 수 없다는 것이다. 일반적으로 이 방법으로 생성되는 비드의 크기(2~5 mm)는 유화법에 의해 생산되는 비드보다 크다(예, 유화법으로 만들어진 구형 비드는 지름이 25 μm에서 2 mm). 사출법에서 캡슐의 크기는 sodium alginate 용액의 점도, 사출기 구멍 지름, 그리고 주사기와 calcium chloride 수집 용액과의 거리에 달려 있다(Smidsrod and Skjak-Braek, 1990). 높은 sodium alginate 농도는 점도가 높아 입자를 크게 만든다. 저온 사출법은 미생물과 효소의 캡슐화에 사용될 수 있다.

유화법은 유화 형성을 위해 식물 기름을 사용하기 때문에 사출법보다 비싸다(Mortazavian *et al.*, 2007). 이 방법에서 작은 부피의 세포/중합 슬러리(분산상)는 해바라기, 대두, 옥수수, 또는 파라핀오일과 같은 큰 부피의 식물 기름(연속상)에 첨가한다. Sheu and Marshall (1993)은 w/o 시스템을 이용하여 박테리아를 가두는 법을 개발했

**Table 1.** Survival of encapsulated *Bifidobacterium* spp. under gastrointestinal conditions

| Encapsulation materials & Methods | *Bifidobacterium* spp. | Survival under gastrointestinal conditions | References |
|---|---|---|---|
| 2% sodium alginate with poly-L-lysine or chitosan(Extrusion technique) | *Bifidobacterium bifidum* | Higher than $10^6$ cfu/mL | Cui *et al*., 2000 |
| 2~4% alginate (Extrusion technique) | *Bifidobacterium longum* | Depending on alginate concentration and bead size | Lee and Heo, 2000 |
| 0.75% gellan/1 % xanthan gum (Extrusion technique) | *Bifidobacterium infantis* | Higher than $10^6$ cfu/mL | Sun and Griffiths, 2000 |
| 0.75% gellan/1 % xanthan gum (Extrusion technique) | *Bifidobacterium lactis* | Higher than $10^6$ cfu/mL | McMaster *et al*., 2005 |
| 2% alginate with Hi-maize starch (Emulsion technique) | *Bifidobacterium* spp. | Higher than $10^6$ cfu/mL | Sultana *et al*., 2000 |
| 3% alginate (Emulsion technique) | *Bifidobacterium adolescentis*<br>*Bifidobacterium breve*<br>*Bifidobacterium lactis*<br>*Bifidobacterium longum* | 8.2~1.0 log cfu/mL | Truelstrup Hansen *et al*., 2002 |
| 35% gum arabic<br>15% skim milk<br>30% gelatin<br>35% soluble starch<br>(Spray-drying technique) | *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 | 89.17%<br>65.16%<br>92.73%<br>92.70% | Lian *et al*., 2003 |
| 35% gum arabic<br>15% skim milk<br>30% gelatin<br>35% soluble starch<br>(Spray-drying technique) | *Bifidobacterium longum* B6 | 93.53%<br>81.26%<br>87.15%<br>95.47% | Lian *et al*., 2003 |
| 10% heat-denatured whey protein isolate (Spray-drying/emulsion technique) | *Bifidobacterium breve*<br>*Bifidobacterium longum* | 1.0 log cfu/mL<br>3.8 log cfu/mL | Picot and Lacroix, 2004 |

Source: Iravani *et al*., 2015

다. 캡슐화 물질을 우선 박테리아와 혼합하고 혼합물을 Tween 80 (유화제)을 포함하는 기름조에 분산한다. 그 다음, 생산된 유화물은 $CaCl_2$를 첨가하여 유화를 파괴하고 생산된 캡슐은 원심분리로 수집한다. 젤화 전 캡슐 믹스의 농도와 점도, 혼합물의 교반속도 그리고 유화제 종류는 최종 형성되는 비드의 지름을 결정하는 중요한 지표로 보고되었다. 매우 큰 비드(약 1,000 $\mu$m 이상)는 거친 조직과 약한 구조일 수 있다(Mortazavian *et al*., 2008). 비드의 지름은 프로바이오틱 세포의 생존성과 대사 속도 및 최종 제품의 관능적 특성에 유의적으로 영향을 미치며 또한 제품내 비드의 분산 품질에도 영향을 미친다(Mortazavian *et al*., 2007; Mortazavian and Sohrabvandi, 2006).

### 2) 동결건조와 분무건조

동결건조와 분무건조법의 사용과 이 두 공정의 핵심 지표는 높은 생존수준에 중요하다(Anal and Singh, 2007). 동결건조와 분부건조법은 대규모 프로바이오틱스의 캡슐화에 사용될 수 있으나, 두 방법 모두 미생물이 극한 환경조건에 노출된다. Semyonov *et al*.(2010)은 높은 생존성의 *L. paracasei* 건조 캡슐 제조를 위해 분무-동결건조(SFD)를 평가하였다. 그들은 maltodextrin과 trehalose로 캡슐화된 세포의 생존성을 조사하였다. 결과적으로, SFD는 높은 생존성(> 60%)의 건조 캡슐 생산에 사용될 수 있다. Trehalose 농도와 maltodextrin 분자량이 최종 프로바이오틱 생존성에 영향을 미치는 주요한 요인으로 보인다. 분무건조는 분무기 형태, 공기압과 출구 공기 온도와 같은 주요 지표가 조절되면 경제적으로 다량의 프로바이오틱 미생물 생산에 사용될 수 있다(Gardiner *et al*., 2000; Champagne and Mollgaard, 2008).

동결건조에서 제품은 임계온도 이하로 동결된 후에 압력이 낮아지는 일차 건조과정이 따르며, 선반 온도는 보통 증가하고 비결합수는 승화에 의해 제거된다. 최종적으로, 이차 건조단계는 탈착에 의해 결합수가 제거되고, 제품은 점차 상온으로 돌아온다(Jennings, 1999; Oetjen, 1999). 동결건조 기술에서 배지의 pH, 보호제 함량(예, 탄수화물), 생물량 이력(배지 환경, 수확 시기), 초기 세포 농도, 동결 속도 및 온도(예, 액체질소의 사용)를 포함하는 중요 인자들이 조절되어야 한다(Carvalho *et al*., 2004). 동결 건조동안 생존성 손실에 극히 중요한 요인은 세포내 빙결 형성과 재결정으로 발생되는 삼투압 충격과 세포막 손상이다.

캡슐 제조에 제안된 많은 방법 중에서 분무건조는 작고 조절 가능한 입자 크기로 물에 불용성인 건조 캡슐 제조에 가장 적절한 기술이다(Picot and Lacroix, 2003; Groboillot *et al*., 1994). 이 시스템은 높은 안정성, 취급 용이성과 미생물 저장 및 식품의 관능적 특성에 미치는 제한된 효과 등 다양한 이유로 고정화된 프로바이오틱 미생물을 식품에 첨가하는데 이상적이다. 그런데, 분무건조에 의한 프

로바이오틱 미생물의 캡슐화는 열에 의한 불활화 때문에 거의 고려되지 않는다. 분무건조 과정 동안 높은 공기 온도에 노출되는 것은 미생물의 생존성에 부정적 영향을 미친다. 반대로, 생물 물질의 안정성에 물의 역할이 중요하기 때문에, 물의 제거는 박테리아 세포막과 단백질의 기능 및 구조에 비가역적 변화를 일으킬 수 있다(Picot and Lacroix, 2003).

### 3) 캡슐화에 영향을 미치는 중요한 지표

프로바이오틱스를 스트레스와 열처리에서 보호하기 위해 연구자들은 다양한 캐리어 매질 시스템을 사용하여 저항성을 연구하였다(Leverrier *et al.*, 2005; Boza *et al.*, 2004). Lian *et al.*(2002)은 프로바이오틱 스트레인과 캐리어가 분무건조 후에 비피도박테리아의 생존성에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과, 10%(w/w) gelatine, 아라비아 검 또는 가용성 전분에서 분무건조시 비피도박테리아의 가장 높은 생존성을 보였다. 미생물 중에서 *B. longum* B6가 실험조건하에서 분무건조에 가장 둔감하였다. 또한, *B. longum* B6와 *B. infantis* CCRC 146336을 젤라틴, 가용성전분, 탈지유 또는 아라비아 검의 10%(w/w) 캐리어 물질과 분무건조하여 캡슐화하였고, 이들 미생물의 생존성을 모사된 위액(pH 2.0과 3.0) 및 담즙액(0.5%와 2.0%)에서 시험하였으며, 분무건조에 의한 프로바이오틱 미생물의 캡슐화는 위액에 노출 시 높은 생존성을 보인다고 결론지었다. 스트레스 처리, 탈수 전 미생물의 생장기, 유전적 변형 및 생장 배지처럼 여러 가지 요인들이 탈수동안 프로바이오틱 미생물의 생존성에 영향을 줄 수 있다. 급격한 환경 변화에 박테리아가 세포상태의 저항성 증가를 유도하는 대사적 재프로그램으로 반응한다는 것이 밝혀졌다. 미생물의 스트레스 반응이 생장기에 달려 있다는 것도 잘 알려져 있다. Saarela et al.(2004)은 *B. animalis* subsp. *lactis*의 늦은 대수기(15 h) 또는 이른 정체기에 동결건조 및 저장 안정성을 보고하였다. 유산균의 열 및 삼투압 저항성은 종 의존적이다. 분무건조 후 프로바이오틱스의 생존성은 사용된 캐리어의 종류 및 농도뿐만 아니라, 분무건조기의 배기 온도에 달려 있다(Ananta *et al.*, 2005; Hisiao *et al.*; Lian *et al.*, 2003; Lian *et al.*, 2002). *B. animalis* subsp. *lactis*는 배기온도 80~90℃에 환원탈지유(20% w/v)에서 분무 건조 시 70% 이상 생존했음을 보였다(Simpson *et al.*, 2005). 탈수 동안 프로바이오틱스의 생존성을 보호하기 위해 분무건조와 냉동건조 전에 다양한 보호제를 첨가한다(Morgan *et al.*, 2006). 탈지유 분말, 유청 단백질, 트레할로스, 글리세롤, 베타인, 설탕, 포도당, 유당, adonitol과 폴리머(예, polyethylene glycol 및 dextran)이 보호제로 사용된다(Anal and Singh, 2007; Heidebach *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2002). 탄수화물의 첨가가 프로바이오틱스의 생존성을 개선 하고 동결건조 중 박테리아에 보호 효과가 있다는 것은 잘 기술되어 있다. 트레할로스가 동결건조 시 효과적인 동결보호제라는 것도 보고되었으며(Conrad *et al.*, 2000; Patist and Zoerb, 2005), 트레할로스, 트레할로스/유당 및 유당/말토스는 동결건조에 가장 효과적인 이당류로 보고되었다(Meng *et al.*, 2008). 요구르트 및 동결건조 요구르트에서 프로바이오틱 박테리아(*L. acidophilus, L. casei, L. rhamnosus* 및 *Bifidobacterium* spp.)의 생존성에 미치는 캡슐화, 프리바이오틱스, 그리고 동결보호제의 영향이 연구된 바 있다(Capela *et al.*, 2006). 동결보호제(Unipectine ™ RS 150) 2.5%(w/v) 첨가 시 *L. casei* 생존성이 7% 개선되었고, 프리바이오틱 (Raftilose ™ RS 150) 1.5%(w/v) 첨가 시 4℃에서 4주간 저장 시 프로바이오틱 미생물 생존성을 log 1.42 증진시켰다. Alginate로 캡슐화 시 동결건조 요구르트를 21℃에 저장 시 프로바이오틱 미생물의 생존성을 log 0.31 증진시켰다. 동결보호제로 일반적으로 사용되는 탈지유와 설탕은 세포내 손상을 방지할 수 있다고 생각된다. 설탕의 보호작용은 고점도 또는 유리상(glass-like phase)에서 염을 포착함으로써 손상을 일으키는 세포액의 공융을 제한하는 능력때문이라고 제안되고 있는 반면, 탈지유는 세포막을 안정화함으로써 세포 손상을 방지할 수 있다(Saarela *et al.*, 2006). 목적을 고려한 캡슐 재질의 선택은 매우 중요하다. 예를 들어, alginate 캡슐에서 칼슘 이온이 누출되면 분해될 수 있으므로, alginate 캡슐은 높은 산도와 킬레이팅 물질이 함유된 환경을 피해야 한다. 그런데, 액상 우유, 크림 및 요구르트와 같은 우유 기반 매질은 고수준의 칼슘 때문에 젤 구조에서 칼슘 이온의 용출이 제한될 수 있어 젤 구슬이 모양과 주조를 유지한다(Hansen *et al.*, 2002). 캡슐 물질로 저항 전분을 이용하면 구슬이 효소 분해에 저항성을 만든다. 때로는 고수분 제품 조건에 저항성 구슬을 만드는 것이 소수성 성분의 캡슐화에 필요하다(Hansen *et al.*, 2002).

캡슐 제조 용액의 농도와 최종 구슬 지름은 캡슐화 효율에 중요한 요인이다. 구슬 지름 증가에 따라 극심한 환경 요인에 대한 보호 효과가 증가한다(Hansen *et al.*, 2002). Sultana *et al.*(2000)은 지름이 0.5~1.0 mm인 alginate 캡슐은 요구르트의 냉장저장 중 비피도박테리아의 생존성을 유의하게 증가하나, 모사 위액 pH에서는 그렇지 못하다고 보고했다. 특별한 한계(캡슐과 제품의 형태를 고려) 이상으로 구슬의 지름을 증가시키는 것은 부적절한 입맛 및 풍미 때문에 적절하지 못하다. 게다가, 캡슐 지름 증가는 소화 효소에 의한 분해를 감소시키므로, 캡슐 형성에 저항성 전분을 사용할 때 지름을 증가시키는 것은 주의해야 한다(Dimantov *et al.*, 2003). 캡슐 제조 농도 관련 연구에서 alginate 용액 농도를 0.75%에서 1.8%로 높이는 것은 *L. acidophilus*의 위액 모사조건하 생존성을 높인다는 것을 보였으나, 2% 이상은 용액 점도 증가로 구형 및 균일한 구슬 제조가 불가능하였다(Chandramouli *et al.*, 2004). 해로운 환경요인의 형태와 정도는 캡슐 효율성을 낮추는 가장 중요한 지표중 하나이다. 예를 들어, 캡슐은 위액과 같은 심한 산성 조건보다 요구르트 같은 약한 산성 조건을 견딘다(Sultana *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002). 지름 100 $\mu$m의 alginate 캡슐은 대부분의 발효제품에 효과

적이나, 위산은 그렇지 못하다(Cui *et al.*, 2000). 캡슐화된 박테리아에 의한 전분의 분해도 보고된바 있으므로(Takata *et al.*, 1977), 캡슐 재질의 선택 전에 박테리아가 전분을 분해할 수 있는지도 고려되어야 한다.

### 4. 프로바이오틱스를 캡슐화한 발효유의 관능적 품질

프로바이오틱스의 캡슐화는 발효유제품의 관능적 품질에 특정한 결과를 가져온다. 최종 제품의 관능적 특성에 영향을 미치는 캡슐의 모양과 크기는 산업적 생산에 중요한 문제이다. 게다가, 분무건조시에 배기 온도는 메일라드 반응(카라멜화와 유사한 비효소적 갈변화의 형태) 때문에 캡슐의 색깔에 영향을 미칠 수 있다(McMaster *et al.*, 2005; O'Riordan *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2007). 캡슐화된 프로바이오틱 미생물의 첨가는 외관 및 색깔, 산도, 풍미, 또는 요구르트의 후미를 변화시키지 않으나, 조직적 특성에 영향을 미친다(Krasaekoopt *et al.*, 2006). 비록 프로바이오틱스의 캡슐화가 관능적 특성을 개선하는 효과적 방법으로 적용될 수 있어도 부적절한 사용은 최종 제품의 이취 및 조직감 손상을 가져올 수 있다. 예를 들어, 우유 내 *B. longum* 및 *B. lactis*의 캡슐화는 특별한 이취를 발생한다. 이러한 사실은 세포의 캡슐화로 작은 쓴맛 펩타이드를 생산하는 대사경로의 변화 때문이다(Truelstrup Hansen *et al.*, 2002). Adhikari *et al.*(2002)은 비피도박테리아를 발효 전에 첨가시 캡슐화가 요구르트내 아세트산 농도를 낮췄다. *Bifidobacterium* 속이 생산하는 아세트산은 요구르트 같은 발효유제품에서 식초 맛을 낸다(Adhikari *et al.*, 2000). 이러한 이취는 저장 기간내 발효 중 생산된다. 비피도박테리아의 캡슐화는 요구르트내 아세트산 생성량을 줄여 프로바이오틱 발효유제품의 풍미를 개선하기 때문에 이러한 문제를 극복하기 위해 사용된다(Adhikari *et al.*, 2000). 특정 한계 이상의 지름을 가진 구슬(>100 $\mu$m, 특히 1 mm 이상)은 거친 외관 때문에 액상 우유 및 요구르트의 입맛을 저해할 수 있다. 지름 1~3 mm 구슬은 최종제품의 조직과 풍미 모두에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다(Chandramouli *et al.*, 2004). 특별한 크기 이상(캡슐과 미생물의 종류를 고려할 때)의 구슬 지름은 세포의 생존성에 영향이 없다는 것이 증명되었다.

## 결 론

여러 가지 캡슐화 방법이 프로바이오틱 미생물을 보호하여 생존성을 증진한다는 것이 밝혀졌다. 최선의 캡슐화 방법의 선택은 유통기간 동안 프로바이오틱 미생물이 치료 효과를 가질 수 있는 충분한 생균수 수준을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 프로바이오틱 미생물의 일반적인 산업적 적용은 아직 거리가 있으며, 많은 사항들에 의문이 남아 있다. 좀더 효율적인 캡슐화 물질과 기술 또는 일반적으로 사용되는 기술의 개선, 캡슐화에 의한 별도 비용 감소, 가공 요인과 캡슐화 효율 사이의 관계 및 최고의 생존성과 가장 만족스러운 관능적 특성에 도달하는 가공 요인의 최적화에 더 많은 연구가 집중되어야 한다. 나쁜 환경 조건에서 박테리아의 생존을 증진할 수 있도록 캡슐화에 영향을 미치는 가장 중요한 요인이 확인, 조절, 그리고 최적화되어야 한다. 저비용으로 식품에 사용할 수 있는 혁신적인 캡슐 기술은 유제품 내 및 위장관 이동 중 생존성과 안정성 증진이 필요하다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 비피더스균의 대량배양 및 유육제품 적용 연구, PJ01196001)과 2017년도 농촌진흥청(국립축산과학원) 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

## References

Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 83: 1946-1951.

Adhikari, K., Gruen, I. U., Mustapha, A. and Fernando, L. N. 2002. Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurts during manufacture and refrigerated storage. J. Food Qual. 25:435-451.

Amine, K. M., Champagne, C. P., Raymond, Y., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Salmieri, S. and Lacroix, M. 2014. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. Food Control. 37:193-199.

Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Sci. Technol. 18:240-251.

Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. Int. Dairy J. 15:399-409.

Annan, N. T., Borza, A. D. and Hansen, L. T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Res. Int. 41:184-193.

Boza, Y., Barbi, D. and Scamparini, A. 2004. Survival of *Beijerinckia* sp. microencapsulated in carbohydrates by spray-drying. J. Microencapsul. 21:15-24.

Capela, P., Hay, T. K. C. and Shah, N. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Res. Int. 39:203-211.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P. and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 14:835-847.

Champagne, C. P. and Møllgaard, H. 2008. Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. In: Franworth ER (ed) Handbook of fermented functional foods. CRC Press Taylor & Francis Group, United States of America.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J. Microbiol. Methods. 56:27-35.

Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R. and Pablo, J. J. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. Cryobiology. 41: 124-127.

Cui, J., Goh, J., Kim, P., Choi, S. and Lee, B. 2000 Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. Int. J. Pharm. 210:51-59.

Dave, R. I. and Shah, N. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture. Int. Dairy J. 7:31-41.

de Barros, J. M., Lechner, T., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. and Edwards, A. D. 2015. Enteric coated spheres produced by extrusion/spheronization provide effective gastric protection and efficient release of live therapeutic bacteria. Int. J. Pharm. 493:483-494.

de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Int. Dairy J. 20:292-302.

Dimantov, A., Greenberg, M., Kesselman, E. and Shimoni, E. 2003. Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems. Innov. Food Sci. Eng. Technol. 5:93-100.

Englyst, H. N., Kingman, S. M. and Gummings, J. H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. Eur. J. Clin. Nutr. 2:33-50.

Fareez, I. M., Lim, S. M., Mishra, R. K. and Ramasamy, K. 2015. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. Int. J. Biol. Macromol. 72:1419-1428.

Fortin, M. H., Champagne, C., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P. and Lacroix, M. 2011. Viability of *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese curd during manufacture and storage: Effect of microencapsulation and point of inoculation. Dairy Sci. Technol. 91:599-614.

Gardiner, G., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. and Ross, R. P. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl. Environ. Microbiol. 66:2605-2612.

Groboillot, A. F., Boadi, D. K., Poncelet, D. and Neufeld, R. J. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 14:75-107.

Hansen, L. T., Allan-Wojtas P. M., Jin, Y. L. and Paulson, A. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* ssp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol. 19:35-45.

Heidebach, T., Först, P. and Kulozik, U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. J. Food. Eng. 98:309-316.

Hisiao, H, C., Lian, W. C. and Chou, C. C. 2004. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. J. Food Sci. Agric. 84:134-139.

Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B. and Lacroix, M. 2013. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53:909-916.

Iravani, S., Korbekandi, H. and Mirmohammadi, S. V. 2015. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. J. Food Sci. Technol. 52:4679-4696.

Jennings, T. A. 1999. Lyophilisation: Introduction and basic principles. CRC press, Boca Raton.

Jung, J. K., Kil, J. H., Kim, S. K., Jeon, J. T. and Park, K. Y. 2007. Survival of double-microencapsulated *Bifidobacterium breve* in milk in simulated gastric and small intestinal conditions. J. Food Sci. Nutr. 12:58-63.

Kebary, K. M. K., Hussein, S. A. and Badawi, R. M. 1998. Improving viability of *Bifidobacterium* and their effect

on frozen ice milk. J. Dairy Sci. 26:319-337.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT Food Sci. Technol. 39:177-183.

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.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int. Dairy J. 13:3-13.

Lee, J. S., Cha, D. S., and Park, H. 2004. Survival of freezed-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J. Agric. Food Chem. 52:7300-7305.

Lee, K. Y. and Heo, T. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salts solution. Appl. Environ. Microbiol. 66:869-873.

Leverrier, P., Fremont, Y., Rouault, A., Boyaval, P. and Jan, G. 2005. *In vitro* tolerance to digestive stresses of propionibacteria: Influence of food matrices. Food Microbiol. 22:11-18.

Lewis, Z. T., Shani, G., Masarweh, C. F., Popovic, M., Frese, S. A., Sela, D. A., Underwood, M. A. and Mills, D. A. 2015. Validating bifidobacterial species and subspecies identity in commercial probiotic products. Pediatr. Res. 79:445-452.

Lian, W. C., Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. Int. J. Food Microbiol. 74:79-86.

Lian, W. C., Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. Int. J. Food Microbiol. 86:293-301.

McMaster, L. D., Kokott, S. A. and Slatter, P. 2005. Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods World. J. Microbiol. Biotechnol. 21:723-728.

Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C. and Ross, R. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. Food Chem. 106:1406-1416.

Milani, C., Lugli, G. A., Duranti, S., Turroni, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Vlappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D. and Ventura, M. 2014. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 80:6290-6302.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A. and Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: A review. J. Microbiol. Meth. 66:183-193.

Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S. and Reinheimer, J. A. 2008. Viability of calcium-alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. Aust. J. Dairy Technol. 63:24-29.

Mortazavian, A. M. and Sohrabvandi, S. 2006. Probiotics and Food Probiotic Products; Based on Dairy Probiotic Products. Eta Publication, Tehran.

Mortazavian, A. M., Razavi, S. H., Ehsani, M. R. and Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian J. Biotechnol. 5:1-18.

Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H. and Konkel, M. E. 2012. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. PLoS ONE. 7:e43928.

Oetjen, G. W. 1999. Freeze-drying. Wiley-VCH, Weinheim.

O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. and Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. J. Appl. Microbiol. 91:1059-1066.

Patist, A. and Zoerb, H. 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids Surf., B. 40: 107-113.

Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A. and Malcata, F. X. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria-With an emphasis on table olives. Trends Food Sci. Technol. 26:31-42.

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.

Picot, A. and Lacroix, C. 2003. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. Int. Dairy J. 13:455-462.

Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F., Rochat, F., Grathwohl, D. and Steenhout, P. 2007. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 andprebiotics. Nutrition. 23:1-8.

Roy, D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. Lait. 85:39-56.

Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajärvi, I. and Mättö, J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. J. Appl. Microbiol. 96:1205-1214.

Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P. and Mättö, J. 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. Int. Dairy J. 16:1477-1482.

Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M. and Benno, Y. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1945-1951.

Sela, D. A. and Mills, D. A. 2010. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. Trends Microbiol. 18:298-307.

Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D. and Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:14422-14427.

Sela, D., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M. and Mills, M. A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:18964-18969.

Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N. and Shimoni, E. 2010. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. Food Res. Int. 43:193-202.

Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., Britz, M. L. and Kyle, W. S. A. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. Int. Dairy J. 5:515-521.

Sheu, T. Y. and Marshall, R. T. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J. Food Sci. 58: 557-561.

Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. J. Appl. Microbiol. 99:493-501.

Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends Biotechnol. 8:71-78.

Su, L., Lin, C. and Chen, M. 2007. Development of an oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. Int. J. Dairy Technol. 60:49-54.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 62:47-55.

Sun, W. and Griffiths, M. W. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. Int. J. Food Microbiol. 61:17-25.

Sun, Z., Zhang, W., Guo, C., Yang, X., Liu, W., Wu, Y., Song, Y., Kwok, L. Y., Cui, Y., Menghe, B., Yang, R., Hu, L. and Zahng, H. 2015. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: A snapshot of its genetic diversity and evolution. PLoS ONE. 10: e0117912.

Truelstrup Hansen, L., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L. and Paulson, A. T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol. 19:35-45.

Yeung, T. W., Arroyo-Maya, I. J., McClements, D. J. and Sela, D. A. 2016. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. Food Funct. 7:1797-1804.

Watson, R. R. and Preedy, V. R. 2015. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: bioactive foods in health promotion. Boston, MA: Academic Press.

Zhang, Z., Zhang, R., Decker, E. A. and McClements, D. J. 2015. Development of food-grade filled hydrogels for oral delivery of lipophilic active ingredients: pH-triggered release. Food Hydrocoll. 44:345-352.