

유산균을 안정화시킨 마이크로캡셀의 제조 및 평가

전흥렬[†] · 박동우 · 이영재 · 권석형* · 최영욱*

일양약품(주) 중앙연구소 *중앙대학교 약학대학
(1999년 5월 11일 접수)

Microcapsules for Stabilization of Lactic Acid Bacteria

Hong-Ryeol Jeon[†], Dong-Woo Park, Young-Jae Lee, Suk-Hyung Kwon* and Young-Wook Choi*

Central Research Institute, Il Yang Pharm. Co., Ltd., Yongin, Kyunggi 449-900, Korea

*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received May 11, 1999)

ABSTRACT—A new technique has been developed for the preparation of *Lactobacillus* microcapsules to enhance the stability against high temperature, humidity, gastric acid and bile acid. Employing fluidized bed coating, primary sub-coating was processed in non-organic solvent system, so that *Lactobacillus* did not directly contact with organic solvent. Secondary enteric-coating was processed in organic solvent with low temperature (below 33°C) technique, which minimized the heat lability of *Lactobacillus*. Survival rate of *Lactobacillus* within microcapsule was not less than 95% and acid tolerance was above 30% in the artificial gastric acid. Further more it was dissolved in the artificial intestine juice within 2~3 hr. Average size of *Lactobacillus* microcapsules was 450 μm(25-50 mesh) and its viability was above 90% in the direct tableting.

Keywords—Fluidized-bed coating, Microcapsule, *Lactobacillus*, Acid tolerance, Survival rate

유산균의 임상효과에 대하여 메치니코프의 불노장수설¹⁾에
서 시작하여 많은 연구자들에 의해 장내환경의 개선과 장내
부패의 억제 및 설사, 변비의 치료효과,²⁻⁴⁾ 혈중 콜레스테롤
의 저하효과,⁵⁻⁸⁾ 발암억제효과^{9,10)} 등이 보고되어 있다.

그러나 유산균 제제를 복용시 생균으로서 장내에 도달하
여, 그곳에서 증식할 수 있는 능력을 갖게되는 경우와 장에
도달하는 과정에서 위산이나 담즙산에 의해 사멸하여 도달
하는 경우로 구분하여 효용을 생각할 필요가 있다.¹¹⁾ 전자는
위대병원균에 대하여 유산균이 영양소를 경쟁적으로 섭취하
거나, 장소를 점거하고, 항생균성물질(Bacteriocin)을 생성하
며 유산(Lactic acid)을 생성하여 장내 pH를 저하시킴으로써
증식을 저지하거나, 장내의 유해물질을 분해하거나 그 합성
을 저지하고, 숙주의 면역력을 높이는 작용을 함으로써 효용
성이 높은 반면, 후자의 경우는 단지 사균 세포벽 등의 균
체성분이 숙주에 흡수되어 면역기능의 증강에 작용하거나 유
산발효중에 생성되어 포함되어 있던 항생균성물질, 유산 등
에 의한 장내환경의 균형화에만 작용함으로써 효용성이 낮
다. 따라서 유산균 제제의 효용성을 높이기 위해서 균 자체
의 내산성을 높인 변이 균주의 개발연구가 시도되고 있으나

많은 비용과 시간이 필요로 하므로 유산균을 내산성 보호막
으로 코팅하여 생균으로서 장내에 도달되도록 위산이나 담즙
산에는 안정하고 장액에는 쉽게 용출되는 마이크로캡셀¹²⁻¹⁴⁾
제형연구가 요구된다. 그러나 유산균은 pH 4이하의 산성,
40°C이상의 온도, 유기용매 및 보존중 높은 습도 등의 조건
에서 급격히 사멸하기 때문에 유산균의 제형화 공정중 사멸
을 개선, 보존중 안정성 개선 및 복용시 위산에 안정하고 장
내생존 도달율이 높은 제제의 개발에 대한 연구는 거의 없
었다. 최근에 Maruyama¹⁵⁾ 등에 의해 타정시 유산균의 생존
에 미치는 부형제의 영향이 보고된 바 있으며, 식품분야에서
유산균을 지방류, 유화제 및 보호제와 함께 혼합하여 마이크
로 캡셀로 개발하기 위한 연구, 유산균을 지방류로 1차 코
팅한 후 젤라틴 2차 코팅에 의한 마이크로비드 제조에 관한
연구,¹⁶⁻²¹⁾ 장용성 고분자를 이용한 유기용매 코팅에 대한 연
구^{22,23)} 등이 소개되었으나, 이러한 제제기법은 유산균을 위
산으로부터 보호하여 장내에서 그 효능을 효과적으로 발휘
하는데 여의치 못하였으며, 특히 용매로서 유기용매를 사용
하거나 고온에서 제제화함에 따라 공정중 유산균의 생존율
이 낮았다.

따라서 본 연구에서는 유산균을 유동층조립기에서 유기용
매를 사용하지 않는 수계코팅기제로 1차 코팅하고 pH 감응
성 방출제어형 코팅기제로 2차 코팅하고자 하였으며 코팅은

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 0331)281-7851, E-mail : cosmosil@chollian.net

33°C 이하의 낮은 온도에서 실시하여 공정중에 유산균의 생존율을 최대화하고 위산 및 담즙산에 안정하여 장내 생존도 달율이 우수한 마이크로캡셀 제조 기법을 확립하고자 하였고 입도별로 정제화를 위한 가능성도 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

유산균은 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus faecalis*를 일본 와카모토사로부터 공급받아 사용하였다. 코팅기제는 Kollicoat MAE 30DP (BASF, Germany), HPMC (ShinEtsu, Japan), Eudragit (Rohm, Germany), Zein-Dp (Showa Sangyo, Japan), Shellac (Colorcon, England), HPMCP (ShinEtsu, Japan) 등을 사용하였고, 가소제는 PEG 6000 (Sanyo, Japan)과 glycerin (LG chemical, Korea)을 사용하였다. 코팅용매는 ethanol (Duksan Pure Chemicals, Korea)을 사용하였고, 유산균의 선택배지로 Elliker broth (Becton Dickinson, U.S.A)를 사용하였다. 정제의 부형제는 starch (Sam Yang Genex, Korea)와 lactose (DMV, Netherland)를 사용하였다.

기기로는 Fluidized bed coater (SFC-MINI, Freund co., Japan), Anaerobic Jar (Becton Dickinson, U.S.A.), Colony counter (Sigma, U.S.A.), Standard sieve (Chung Gye, Korea), Tableting machine (Erweka, AR400, Germany), Dissolution tester (Vankel, VK7000, U.S.A.)등을 사용하였다.

유산균 마이크로캡셀의 제조

유산균 분말을 Fluidized bed coater를 사용하여 Table I의 처방으로 Figure 1과 같은 마이크로캡셀을 제조하였다. 유산균은 온도 및 유기용매에 예민하므로 33°C이하에서 코팅을 진행하였으며 장용성코팅에 앞서 1차 수용성 보호코팅을 하여 유기용매와의 직접적인 접촉을 피하였다. 또한, 1차 수용성 보호코팅 없이 순간적으로 피막을 형성하여 공정의 차이에 의한 유산균 생존율을 비교하였다. 기제로는 천연고분자물질군으로 이루어진 그룹과 합성고분자로 이루어진 그룹을 사용하여 비교하였다.

Table I-Formulation of *Lactobacillus* Microcapsules

	Primary aqueous coating	Secondary enteric coating
Preparation I	-	Zein, Shellac
Preparation II	Sod. alginate soln.	Zein, Shellac
Preparation III	HPMC	Eudragit

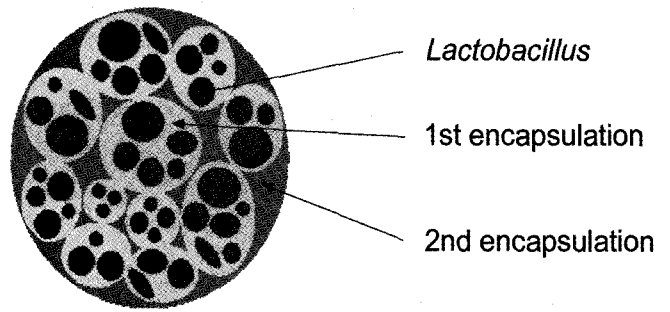


Figure 1-Schematic Representation of the *Lactobacillus* Microcapsule.

입도분포측정

상기의 처방으로 제조된 유산균 마이크로캡셀의 입도분포는 표준체 18호 (1000 μm), 25호 (710 μm) 및 50호 (300 μm)를 사용하여 측정하였다. 일정량의 시료를 상단에 넣은 후 3분간 체분석기로 흔든 후, 각 체에 잔존된 양을 무게로 측정하여 백분율을 구하였다.

마이크로캡셀의 붕해 및 생균수 측정

제조된 마이크로캡셀을 용출시험기 내에서 인공장액을 사용하여 패들법 (100 rpm)으로 붕해시킨 다음, 이 액을 일정량 취하여 Elliker배지에 분주하여 배양한 후 72시간 후에 colony수를 세었다. 붕해시간은 육안으로 관찰하여 완전히 입자의 형태가 없어지는 시점으로 정하였다.

마이크로캡셀의 내산성실험

제조된 마이크로캡셀을 용출시험기 내에서 인공위액을 사용하여 회전검체통법(100 rpm)으로 1시간동안 교반한 후 식염수로 세척한 다음 인공장액에 옮겨 패들법으로 붕해시킨다. 이 액을 일정량 취하여 Elliker배지에 분주하여 배양한 후 72시간후에 colony수를 비교하였다. 단, 마이크로캡셀의 크기를 고려하여 회전검체통을 80호 망으로 싣는다.

유산균 마이크로캡셀 함유 정제의 제조

유산균 마이크로캡셀을 부형제로서 전분유당과립을 사용하여 정제로 타정하였다. 타정압은 각각 5 kg/cm², 7 kg/cm²으로 하였다. 이때, 정제중 유산균 마이크로캡셀의 함량은 33%로 하였다.

정제에서 유산균의 생존율 및 내산성실험

마이크로캡셀과 같은 방법으로 정제에서 타정에 의한 유산균의 생존율과 내산성 등을 시험하고, 타정압에 의한 유산균의 안정성과 코팅층에 대한 영향을 살펴보았다.

Table II-Particle Distribution of Each Preparations (Mean ± S.D., %)

Preparation	>18 mesh	18~25 mesh (mean:800 μm)	25~50 mesh (mean:450 μm)	≤ 50 mesh
I	3.1 ± 1.4	28.3 ± 3.2	61.6 ± 4.1	7.0 ± 1.2
II	5.2 ± 1.9	22.8 ± 2.5	68.7 ± 5.9	3.3 ± 1.0
III	5.7 ± 1.8	31.2 ± 2.6	69.1 ± 3.8	3.0 ± 1.3

Table III-Acid Tolerance* of Each Preparations after Fluidized Coating(Mean ± S.D., %)

Preparation	18~25 mesh	25~50 mesh	≤ 50 mesh
I	33.2 ± 5.6	24.6 ± 3.7	19.1 ± 3.5
II	39.8 ± 5.2	35.7 ± 5.1	21.4 ± 4.1
III	53.4 ± 4.2	47.2 ± 4.8	40.7 ± 3.4

*calculated by (cfu/g in simulated intestinal fluid after simulated gastric juice)/(cfu/g in simulated intestinal fluid) × 100(%)

결과 및 고찰

마이크로캡셀의 입도분포, 내산성 및 봉해

유동층조립기를 사용하여 제조한 마이크로캡셀의 입도분포 및 처방과 입도분포에 따른 내산성 등을 Table II, III에 나타내었다. 처방에 관계없이 비교적 고른 입도분포를 보였으며 표준체 50호 이하의 작은 입자는 18~25호나 25~50호 입자보다 상대적으로 낮은 내산성을 나타내었다. 1차 수

용성 보호코팅을 한 처방이 장용코팅만을 한 처방보다 내산성이 우수했으며, 기제로서 합성고분자 물질을 사용한 처방이 천연 고분자물질을 사용한 처방보다 내산성이 우수했다. 봉해시간은 처방 I과 II의 경우 인공위액에서 1시간동안 입자가 깨지지 않았으며 인공장액에서 3시간 이내에 거의 모든 입자가 봉해되었다. 또한, 처방 III의 경우 인공장액에서 15분 이내에 모두 봉해되었다.

정제 제조시 유산균의 생존율 및 내산성

유산균 마이크로캡셀을 부형제와 함께 혼합하여 타정하였을 때 타정압에 의한 유산균의 생존율과 내산성을 Table IV에 나타내었다. 유산균 마이크로캡셀이 타정시 타정압 5 kg/cm²과 7 kg/cm² 모두에서 처방 및 입도에 관계없이 유산균이 거의 사멸하지 않고 90%이상 생존함을 알 수 있었고, 단지 천연코팅기제보다는 합성코팅기제를 사용했을 때 생존율이 높았다. 정제 자체의 봉해시간은 모든 처방에서 10분 이내로 마이크로캡셀의 봉해에 큰 영향을 주지 않았다. 내산성은 모든 처방에서 50 호체이상의 유산균 마이크로캡셀을 사용할 경우 내산성이 떨어졌으며 천연코팅기제의 경우는 1차코팅을 한 것이 장용코팅만을 한 처방보다 내산성이 높았고, 합성코팅기제로 1, 2차 코팅한 것이 천연코팅기제로 1, 2차 코팅한 것보다 내산성이 높았다. 향후 유산균 마이크로캡셀로 제조된 정제에 대해 안정성시험을 추가 실시하여 유산균 정제의 개발 가능성을 타진하고자 했다.

Table IV-Viability Rate of Lactobacillus in Tablet against Various Tableting Pressure

Preparation (Tableting pressure)	size range (mesh)	Before tableting (cfu/g)	After tableting (cfu/g)	Viability (%)	Acid tolerance (%)
I (5 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.57 × 10 ⁸	2.40 × 10 ⁸	93.4	35.2
	25 ~ 50	2.62 × 10 ⁸	2.45 × 10 ⁸	93.5	26.3
	≤ 50	3.00 × 10 ⁸	2.83 × 10 ⁸	94.3	20.5
I (7 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.57 × 10 ⁸	2.37 × 10 ⁸	92.2	34.1
	25 ~ 50	2.62 × 10 ⁸	2.39 × 10 ⁸	91.2	25.0
	≤ 50	3.00 × 10 ⁸	2.68 × 10 ⁸	89.3	18.7
II (5 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.23 × 10 ⁸	2.08 × 10 ⁸	93.3	42.0
	25 ~ 50	2.00 × 10 ⁸	1.89 × 10 ⁸	94.5	38.2
	≤ 50	2.59 × 10 ⁸	2.40 × 10 ⁸	92.7	24.3
II (7 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.23 × 10 ⁸	2.05 × 10 ⁸	91.9	41.5
	25 ~ 50	2.00 × 10 ⁸	1.88 × 10 ⁸	94.0	36.6
	≤ 50	2.59 × 10 ⁸	2.38 × 10 ⁸	91.9	20.9
III (5 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.86 × 10 ⁸	2.78 × 10 ⁸	97.2	56.7
	25 ~ 50	2.60 × 10 ⁸	2.55 × 10 ⁸	98.1	49.4
	≤ 50	3.20 × 10 ⁸	3.12 × 10 ⁸	97.5	43.0
III (7 kg/cm ²)	18 ~ 25	2.86 × 10 ⁸	2.76 × 10 ⁸	96.5	53.2
	25 ~ 50	2.60 × 10 ⁸	2.51 × 10 ⁸	96.5	46.3
	≤ 50	3.20 × 10 ⁸	3.10 × 10 ⁸	96.9	41.8

결 론

Fluidized-bed coater를 이용하여 제조된 유산균마이크로캡셀의 입도분포, 내산성, 봉해시험 및 이를 이용한 정제의 제조시 생존율과 내산성시험 등을 통하여 다음의 결론을 얻었다.

1. Fluidized bed coater를 사용하여 유산균을 저온(33°C 이하)에서 1차 수용성 보호코팅을 하고 2차 장용코팅하여 18호 (1000 μm)에서 50호 (300 μm) 크기의 유산균 마이크로캡셀을 얻을 수 있는 제조 조건을 확립했으며, 인공위액에 대한 내산성 (유산균생존율)이 20~60%이었다.

2. 봉해시간의 경우 3가지 처방 모두 인공위액에서 코팅이 안정하였으며 인공장액에서는 모두 봉해되는 것을 확인하였다. 따라서 위와 같은 처방으로 위산에 불안정했던 유산균의 안정성을 높이고 장에서의 정착율을 높일 수 있는 조건을 확립하였다.

3. Fluidized-bed coater를 사용하여 제조된 유산균 마이크로캡셀을 5 kg/cm²과 7 kg/cm²의 타정압으로 타정한 정제의 유산균 생존율이 90~97%였으며, 내산성도 타정전의 마이크로캡셀과 차이가 거의 없으므로 유산균정제의 개발이 가능하리라 사료된다.

문 헌

- 1) E. Metchinikoff, *The prolongation of Life*, Arno Press, New York, U.S.A., (1908) (1977 reprint).
- 2) T. Mitsuoka, *Bifidobacteria and Their Role in Human Health*, *J. Indus. Microbiol.*, **6**, 263-68 (1990).
- 3) S. E. Gilliland, Acidophilus Milk Products : A Review of Potential Benefits to Consumers, *J. Dairy Sci.*, **72**, 2483-94 (1989).
- 4) K. M. Shahani and A. D. Ayebo, Role of Dietary *Lactobacilli* in Gastrointestinal Microecology, *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2448-57(1980).
- 5) S. E. Gilliland, C. R. Nelson and C. Maxwell, Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *APPI. Environ. Microbiol.*, **49**, 377-81(1985).
- 6) L. M. Buck and S. E. Gilliland, Comparisons of Freshly Isolated Strains of *Lactobacillus acidophilus* of Human Intestinal Origin for Ability to Assimilate Cholesterol During Growth, *J. Dairy Sci.*, **77**, 2925-33(1994).
- 7) D. K. Waler and S. E. Gilliland, Relationship Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.*, **76**, 956-61 (1993).
- 8) S. E. Gilliland and D. K. Walker, Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effect in Humans, *J. Dairy Sci.*, **73**, 905-11(1990).
- 9) B. R. Goldin and S. L. Gorbach, Effect of *Lactobacillus acidophilus* Dietary Supplements on 1,2-Dimethylhydrazine Dihydrochloride-Induced Intestinal Cancer in Rats, *J. Nat. Cancer Instit.*, **64**, 263-65 (1980).
- 10) B. R. Goldin and S. L. Gorbach, The Effect of Milk and *Lactobacillus* Feeding on Human Intestinal Bacterial Enzyme Activity, *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 756-61 (1984)
- 11) 姜國熙, 乳酸菌食品學, 成均館大學校出版部 (1996).
- 12) H. S. Choi, H. Jang, G. W. Lee and U. K. Jee, The Preparation of Controlled-Release Microcapsules for Captopril and Their Disslution Characterisitcs, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **28**, 7-13 (1998).
- 13) P. B. Deasy, *Microencapsulation and Related Drug Processes*, Marcel Dekker, New York and Basel, pp. 1-19 (1984).
- 14) C. C. Amiet, P. Gadille, B. Digat and J. P. Benoit, Microencapsulation of *Rhizobacteria* by Spray-Drying : Formulation and Survival Studies, *J. Microencapsul.*, **15**, 639-59 (1998).
- 15) I. Maruyama, K. Shinpo and Y. Ando, Influence of Additives on the Survival of Lactic-acid Bacteria in Tableting, *Yakuzaigaku*, **55**, 134-38 (1995).
- 16) M. Monshipouri and R. R. Price, Emulsification Preparation of Calcium alginate Beads in the Presence of Sequesterant, *J. Microencapsul.*, **12**, 255-62 (1995).
- 17) K. K. Kwok, M. J. Groves and D. J. Burgess, Production of 5-15microns Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique, *Pharm. Res.*, **8**, 341-44 (1991).
- 18) F. Lim and R. D. Moss, Microencapsulation of Living Cells and Tissues, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 351-54 (1981).
- 19) P. R. Hari, T. Chandy and C. P. Sharma, Chitosan/Calcium alginate Microcapsules for Intestinal Delivery of Nitrofurantion, *J. Microencapsul.*, **13**, 319-29 (1996).
- 20) R. Bodmeier and J. Wang, Microencapsulation of Drugs with Aqueous Colloidal Polymer Dispersions, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 191-94 (1993).
- 21) S. J. Hwang, G. J. Rhee, H. B. Jo, K. M. Lee and C. K. Kim, Alginate Beads as Controlled Release Polymeric Drug Delivery System, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **23**, 19-26 (1993).
- 22) K. Han, D. S. Shin, U. K. Jee and Y. B. Chung, Preparation and Evaluation of Sustained-Release Eudragit Microencapsules Containing β-Lactam Antibiotics, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 267-79 (1992).
- 23) I. K. Chun and J. H. Park, Preparation and Controlled Release of Microcapsules Containing Ketoprofen-β-Cyclodextrin Solid Dispersion, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 33-40 (1992).