

## 유산균을 함유한 알긴산 미세입자의 제조와 특성

최창용<sup>†</sup> · 강성구<sup>1\*</sup> · 박석규<sup>2</sup> · 장미경 · 나재운\*

순천대학교 고분자공학과, <sup>1</sup>순천대학교 공동실험실습관, <sup>2</sup>순천대학교 식품영양학과

Received December 4, 2007 / Accepted December 17, 2007

**Preparation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Encapsuled with Alginate Microsphere.** Changyong Choi<sup>†</sup>, Seong-Koo Kang<sup>1\*</sup>, Seok-Kyu Park<sup>2</sup>, Mi-Kyeong Jang and Jae-Woon Nah<sup>\*</sup>. Department of Polymer Science and Engineering, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, <sup>1</sup>Research Instrument Center, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, <sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea - This study is performed to assess the preparation and characterization of lactic acid bacteria (*Sterpococcus thermophilus*) loaded with alginate microsphere using alginate and chitosan for the efficient delivery of lactic acid bacteria to large intestine. Size and morphology of alginate microsphere were confirmed 6~10  $\mu\text{m}$  with spherical shape by scanning electronic microscope (SEM). Biodegradation study of alginate was investigated at different buffer solutions (pH 1.2 and 7.4). This result showed that alginate microsphere did not degrade at pH 1.2 buffer solution but it's degradation occurred from first day at pH 7.4 buffer solution. Survivability test of lactic acid bacteria in alginate microsphere showed that it was keeping activity of lactic acid bacteria by chroma meter. Therefore, the introduction of alginate microsphere might be a potential system to efficiently delivery lactic acid to large intestine.

**Key words :** Alginate, chitosan, lactic acid bacteria, microsphere

### 서 론

Alginate는 Laminaria속 갈조류와 해초류의 세포벽을 구성하는 천연 다당류로서 D-mannuronic acid와 L-glucuronic acid가 1,4-glycosidic linkage를 통하여 결합되어 있는 공중합체로 알려져 있다[19,28]. Alginate는 인체에 무해하며, 특히 소화기관에 대해서 매우 안정한 첨가제로 다양한 생리적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Alginate의 생리적 효과는 금속이온과의 반응성에 의한 중금속의 체외배출 작용 및 흡수억제, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈당강하 작용, 식이 섬유에 의한 장장 작용, 면역증강 작용, 장내 유해미생물의 증식억제 작용 등이 보고되고 있다[1,5,6,10,16,17]. 특히 alginate는 화학적으로 2개의 나트륨 이온과 1개의 칼슘, 마그네슘 이온의 양이온 교환에 의하여 가교 결합을 함으로써 수용성 겔 또는 구형을 형성하는 특징을 가지고 있어 인체에 유용한 미생물을 쉽게 담지 할 수 있다[3,7,11,30]. 가교제로 사용되는 금속이온 중 특히 칼슘이온은 인체 필수원소의 하나로 인체에서 뼈, 치아의 생성, 세포막 투과성 등에 관여하고 부족할 때 대표적인 증상인 골다공증을 유발한다. 따라서 alginate를 이용한 미세입자는 alginate 자체의 생리활성 및 가용되는 금속이온에 의해 다양한 기능을 부여 할 수 있다[14,20,21]. Alginate는 낮은 pH에서 팽윤 및 분해가 일어나

지 않고, 중성에서 팽윤 및 분해가 일어남으로써 alginate 미세입자는 위에서는 안정한 상태로 있으며, 소장 및 대장에서 팽윤되어 함유된 유용한 물질을 방출을 조절 할 수 있다[12,22,30].

키토산은 무척추동물 특히 새우나 게와 같은 갑각류, 연체 동물인 감 오징어의 뼈 및 곤충류의 껍질 주성분인 키틴을 탈아세틸화하여 추출시킨 양이온 다당류이다. 키토산은 생체 적합성, 생분해성, 무독성 등의 장점이 입증되어 수술용 봉합사, 약물 전달체, 혈액응고 방지제, 인공위장막 등의 의학 분야뿐만 아니라 식품, 섬유, 환경, 화장품, 농축산 등에 이르기까지 다양한 분야에서 활발히 연구가 이루어지고 있다[8,13,23,25,27,29]. 키토산의 양이온 다당류 특징은 세포의 활성을 높여주고, 질병에 대한 면역성 및 저항력을 향상시켜, 여러 가지 질병이나 종양 또는 암에 대한 저항력까지 증강시키는 역할을 하며, 점막과의 접착력이 우수하여 장, 코 등의 점액질로 구성되어 있는 인체의 장기에 효과적으로 장시간 체류하는 특징을 가지고 있다[2,9].

유산균은 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 유산(젖산)을 생성하는 박테리아로서 단백질을 분해하지만 부패시키는 능력은 없다. 지금까지 밝혀진 유산균은 300~400여종 정도 알려지고 있으며 그 가운데 20여 종류가 주로 발효유 및 발효산업에 이용되고 있다. 유산균은 그램(Gram) 염색 반응에서 양성이고 포자를 형성하지 않으며 사람이나 동물의 소화관, 구강, 질, 발효유제품, 자연발효식품 가축의 사료로 이용되는 등 자연계에 널리 분포 되어 있으며, 이들 유산균은 인류의 생활에 직·간접적으로 밀접한 관계를 맺고 있는 유

\*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3566, Fax : +82-61-750-5423

E-mail : jwnah@suncheon.ac.kr

<sup>†</sup>Equally qualified as first authors

익한 공동체임을 알 수 있다. 특히 이러한 유산균은 장내에서 미생물의 증가로 발생할 수 있는 소화불량이나 복부 팽만 등의 예방 및 치료제로 유산균 제제가 사용되고 있다. 일반적으로 유산균을 생균제로 사용하여 경구 투여된 경우 위장의 낮은 pH와 담즙산 등으로 인하여 위장과 소장 상부에서 사멸될 수 있으므로, 낮은 pH에서 생존할 수 있거나 낮은 pH에 노출을 방어하는 방법이 필요하다[24,26]. 이러한 필요성에 의해 최근에는 유산균을 캡슐화 기술을 이용하여 장내까지 안전하게 운반하고 장내에서 유산균이 유리될 수 있도록 하는 연구가 진행되고 있으나 캡슐화된 입자의 크기가 수백  $\mu$ m에서 수십 mm 정도여서 기능성 식품의 첨가제로 응용하기에는 제한적이다. 또한 캡슐을 형성하는 물질의 pH에 따른 분해과정에 대한 연구는 미흡한 실정이다[4,15, 18,26].

따라서 본 연구에서는 유산균의 생존율을 높여 장내에 도달 할 수 있도록 유산균을 함유한 alginate 미세입자의 제조공정을 개발하고, 그 공정에 관련된 중요 변수들을 최적화하였다. 즉, alginate를 이용해 유산균을 1차 미세캡슐(입자)화한 후, 대장의 점막과 효과적으로 점착되는 특성을 갖고 있는 키토산으로 2차 캡슐화함으로써, 내산성 및 저장·운반성을 향상시키도록 유산균을 함유하는 2중층 미세입자를 제조하여 다기능성을 갖는 유산균 담지하는 미세입자를 개발하였다.

**재료 및 방법**

**재료**

유산균 미세입자의 담지체로는 alginate(Fulka, Japan)를, 가교제로는 CaCl<sub>2</sub>(Sigma, USA)를 사용하였다. 사용된 유산균은 *Streptococcus thermophilus*로 (주)메디오젠(Korea)사에서 구입하여 사용하였으며, 유산균 미세입자의 외부 코팅제로

는 분자량 220 kDa인 키토산을 KITTOLIFE (Korea)에서 기부 받아서 사용하였다. 기타 시약은 일급시약을 구매하여 그대로 사용하였다.

**S. thermophilus가 담지된 Alginate 미세입자의 제조 및 특성분석**

S. thermophilus가 담지되어 있는 alginate 미세입자(유산균 함유)의 제조공정은 Fig. 1과 같다. 즉 2% alginate 수용액 10 ml과 2% S. thermophilus 수용액 10 ml을 균일하게 혼합한 후 1% tween 20 수용액 250 ml에 균질기를 이용하여 13,000 rpm으로 교반하면서 가하여 유산균 미세입자가 생성되도록 10분 동안 충분히 유화시킨다. 유화된 용액에 가교제인 0.2 M CaCl<sub>2</sub> 수용액 25 ml을 천천히 가한 후, 10분 동안 교반시키면서 충분한 가교가 일어나도록 하였다. 유산균 미세입자가 제조된 후 여과와 세척과정으로 유화제 및 미반응 CaCl<sub>2</sub>를 제거하였다. 지속적으로 1% 키토산 용액에 넣은 후 교반하여 유산균 미세입자를 키토산으로 코팅하고, 여과와 세척 후 동결 건조를 통하여 유산균 미세입자를 제조하였다. 이 유산균 미세입자의 크기와 형태는 금으로 진공증착 시킨 후 시차주사전자 현미경(SEM; S-3500N, HITACHI, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, 이때의 가속전압은 20 kV로 하였다.

**유산균 미세입자의 분해 과정**

유산균 미세입자의 생분해 과정은 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 대장과 위의 조건인 pH 7.4와 pH 1.2에서 각각 실험하였다. 미세입자를 1% 농도가 되도록 PBS에 넣은 후에 37°C에서 교반하면서, 1일 간격으로 시료를 채취하여 건조시킨 후 시차주사 전자현미경을 이용하여 형태 변화를 관찰하였다.

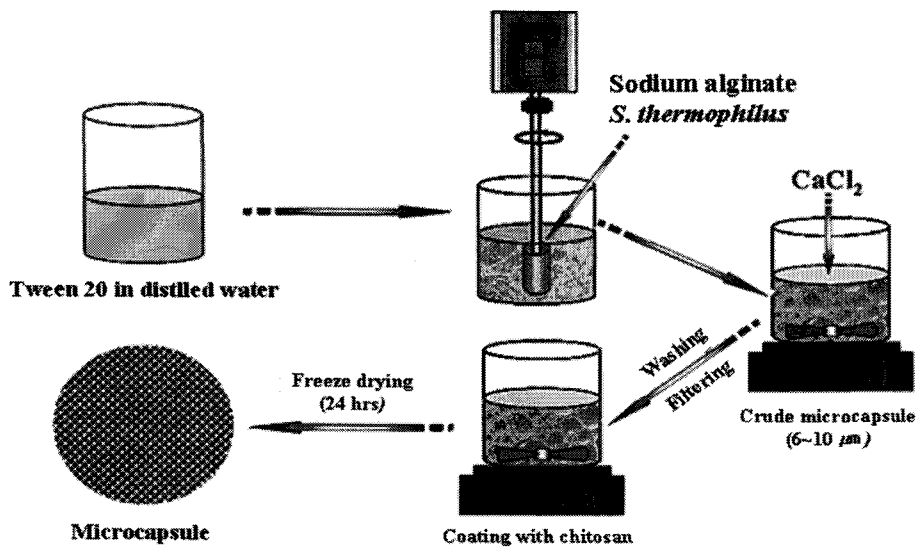


Fig. 1. Preparation of lactic acid bacteria microcapsule by emulsion method.

**유산균의 활성 특성**

유산균 미세입자 5 mg을 PBS (pH1.2)에 6시간 동안 정치시킨 후, PBS (pH7.4) 2 ml에 넣고 24시간 동안 균일하게 교반시킨 후 50 µl에 분주하였다. Lactobacilli MRS agar로 고정시키고 25°C에서 3일간 배양시킨 후 콜로니의 개수를 측정하여 생균수를 산출하였다. 또한 Lactobacilli MRS broth에 유산균 마이크로캡슐 용액 40 µl 분주하고 25°C에서 배양하면서 24시간마다 pH 변화를 측정하여 유산균의 생존율을 확인하였다. 그리고 litmus milk에 유산균 미세입자 용액 40 µl를 분주하고 25°C에서 배양하면서 24시간마다 색차계 (Chroma Meter CR-200, MINOLTA, Japan)를 이용하여 색도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

Alginate가 미세입자를 형성할 수 있는지를 확인하기 위하여 *S. thermophilus*를 담지시키지 않고 순수한 alginate를 이용하여 입자를 제조하였다. 이때 alginate의 농도를 1, 2, 3%로 조절하고, CaCl<sub>2</sub>의 농도를 0.1, 0.2, 0.3 M로 변화시키면서 실험을 실시하였다. 이 결과 alginate의 농도가 1%에서는 입자를 형성시키지 못하였으며, 3%인 경우에 젤을 형성하였다. 또한 CaCl<sub>2</sub>의 0.1 M 농도에는 입자를 잘 형성하지 못하였으며, 0.3 M에서 젤의 형태를 유지하였다. 본 연구에서는 alginate의 농도는 2%, CaCl<sub>2</sub>의 농도는 0.2 M 일 때를 최적 조건으로 도출하였으며, 이때 입자의 크기가 아주 작은 미세입자를 형성하는 것을 확인하였다. 이 결과는 Fig. 2의 투과전자현미경(TEM)과 원자력간현미경(AFM) 이미지와 같았으며 그 크기는 150-200 nm로 나타났다.

유산균 미세입자를 제조한 결과는 Fig. 3의 SEM의 이미지로 나타났다. Fig.에서 볼 수 있듯이 입자의 크기는 6-10 µm인 아주 구형의 미세입자가 형성되어 있음을 확인할 수 있었다. 여기에서 *S. thermophilus*가 담지 되지 않았을 경우 alginate의 입자보다 커진 이유는 alginate 미세입자 내에 유산균인 *S. thermophilus*가 담지 되어 있고, alginate 미세입자의 코팅재료인 키토산에 의해 입자가 커진 것으로 사료된다. 최근에 많은 연구가 이루어지고 있는 유산균 캡슐은 그 크기가 1-2 mm 또는 400 µm 이상으로 식품의 첨가제로 사용하기에는 제한적인 문제점을 갖고 있으나[15,18], 본 연구의 유산균 미세입자는 크기를 줄임으로써 다양한 응용이 기대된다.

유산균 미세입자가 위에서는 안정하고, 대장에서 팽윤과 분해가 일어나는지를 실험하기 위하여 pH 7.4와 1.2의 PBS에서 생분해 실험을 한 결과는 Fig. 4와 5에 각각 나타났다. Fig. 4는 pH 7.4에서 생분해 실험을 한 결과로써 1일째부터 팽윤과 동시에 분해가 일어나기 시작하여, 7일째는 완전히 분해가 되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 pH 1.2에서는 거의 분해가 일어나지 않음을 알 수 있었다.

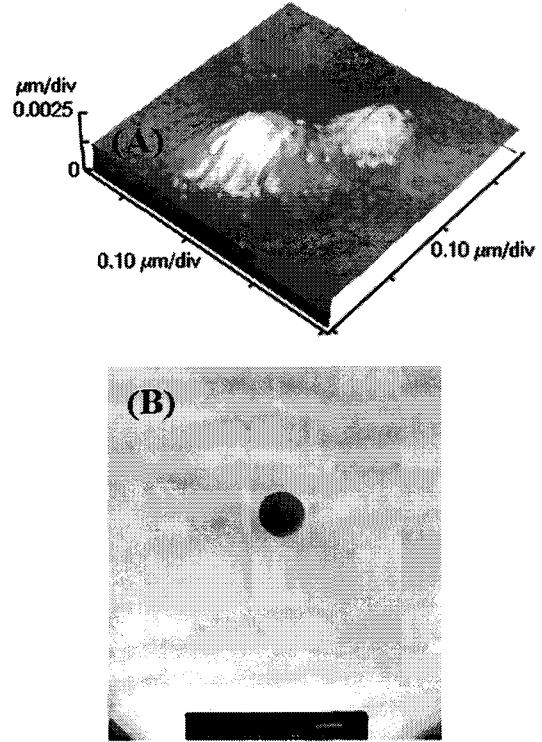


Fig. 2. AFM (A) and TEM (B) morphology of alginate nanocapsule.

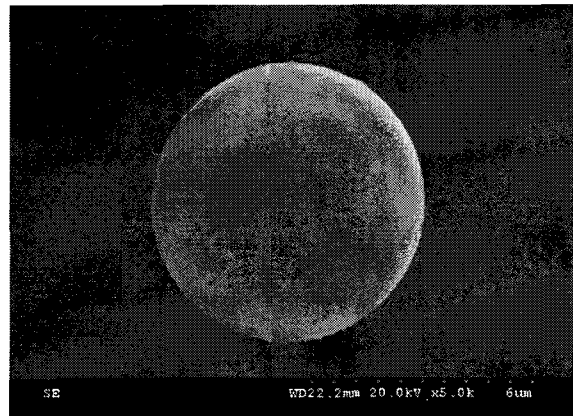


Fig. 3. SEM morphology of lactic acid bacteria microcapsule.

이 결과는 alginate의 일반적인 특성인 산성에서 alginate가 분해나 팽윤이 일어나지 않고, 중성의 pH에서는 분해가 된다는 것과 잘 일치하고 있다[30]. 또한 alginate 미세입자의 코팅재료로 사용된 키토산은 대장의 점막과 효과적으로 점착되는 특성을 갖고 있으므로 유산균 미세입자는 충분한 시간동안 대장에서 머물러 있을 수 있다. 따라서 pH 1.2에서 분해가 전혀 일어나지 않음으로써 내부의 유산균이 위에서 전혀 사멸되지 않고, 대장에서 활성을 나타내게 할 수 있을 것이다. 이 분해 실험 결과는 대장에서 유산균의 효과와 alginate, 키토산의 고유의 생리적인 특성을 모두 나타낼

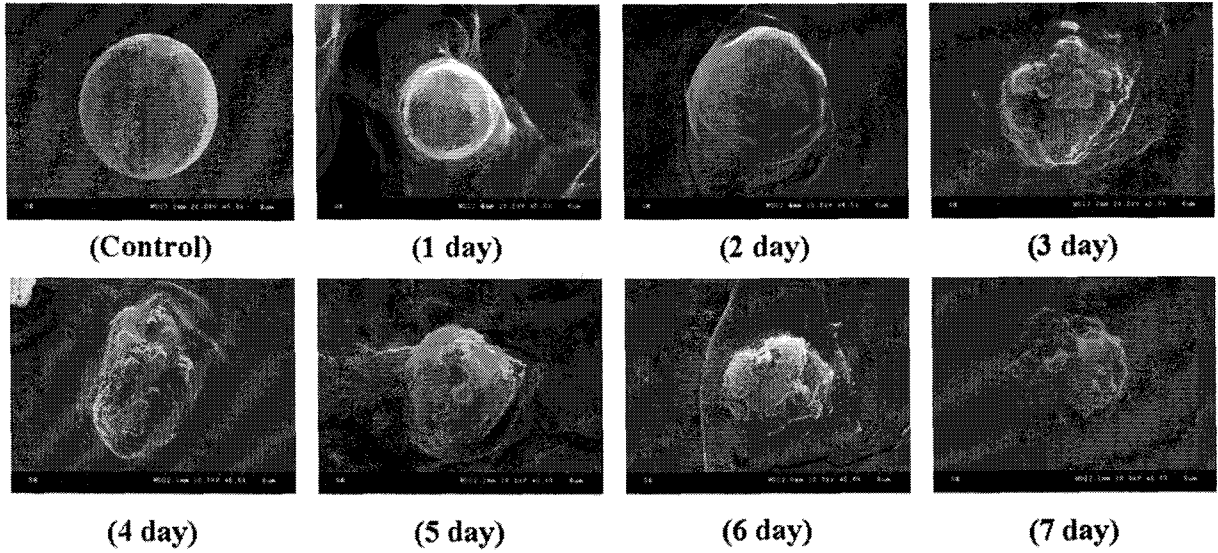


Fig. 4. SEM morphology of biodegradation of lactic acid bacteria microcapsule in PBS (pH 7.4).

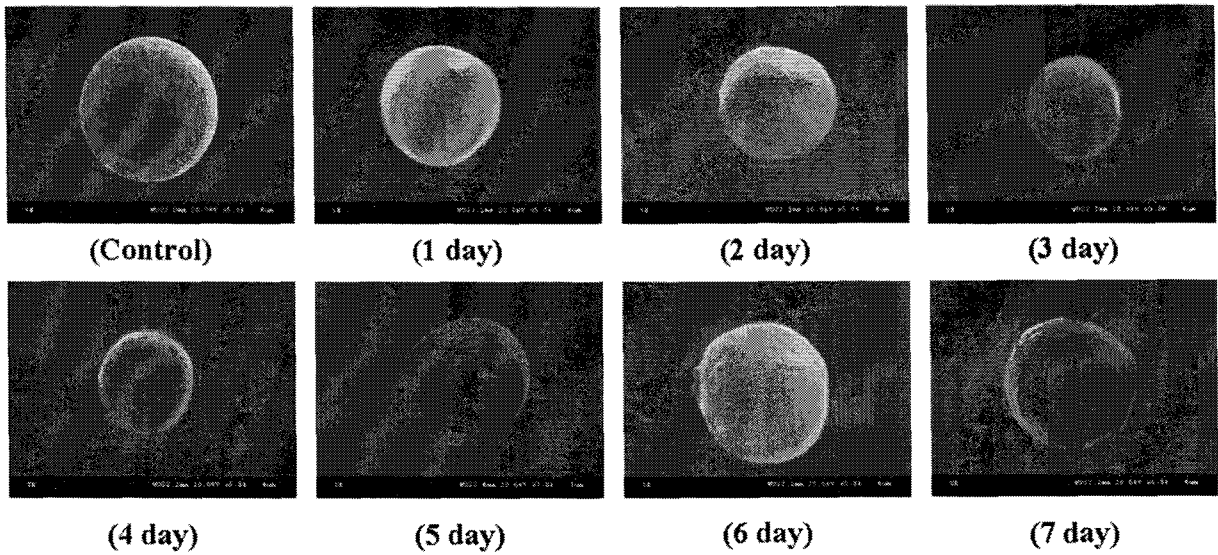


Fig. 5. SEM morphology of biodegradation of lactic acid bacteria microcapsule in PBS (pH 1.2).

수 있는 다기능성 미세입자라고 사료된다.

유산균 미세입자를 PBS 1.2에서 정치한 후, PBS 7.4에서 생균수를 측정된 결과를 Fig. 6에 나타냈으며, 이 결과 생균수는  $326 \pm 15 \times 10^3$  CFU/g 임을 확인하였다. 이 결과는 유산균을 담지한 alginate의 미세입자가 낮은 pH에서 안정적으로 유산균을 보호할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 기존의 유산균 캡슐의 생균수는 1 g당  $10^7$  CFU/ml 정도로 본 연구 결과보다는 높게 나타났으나 이들 유산균 캡슐은 크기가 400  $\mu\text{m}$  이상으로 본 연구의 유산균 미세입자의 크기인 10  $\mu\text{m}$  보다 커서 응용성 등을 고려할 때 우수한 결과로 사료된다[15,18].

또한 유산균의 pH 변화를 측정된 결과는 Fig. 7에 나타냈으며, 초기 pH는 6.7에서 24시간 후에 5.6까지 급격하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 유산균의 경우 당류를 발효해



Fig. 6. Total viable cell of lactic acid bacteria microcapsule.

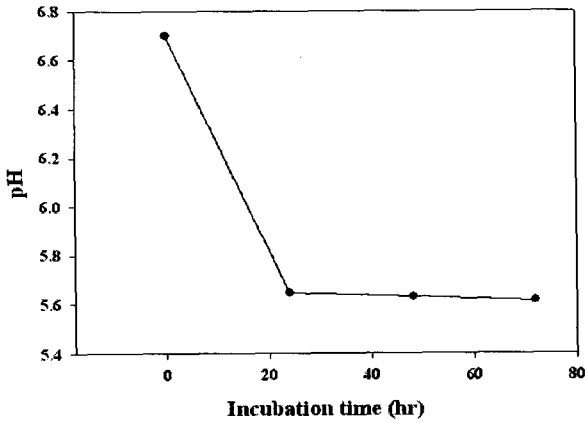


Fig. 7. Changes in pH of lactic acid bacteria microcapsule during incubation at 25°C for 72 hr.

서 몸에 유용한 젖산을 생성하기 때문이며, 이 결과로부터 유산균 미세입자내의 유산균이 사멸되지 않고 생존함과 동시에 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

유산균의 litmus milk의 색 변화를 관찰한 결과는 Fig. 8과 9에 나타냈다. 유산균이 활성을 나타내는 경우, 유산균이 생성하는 젖산에 의해서 색이 어두운 색에서 밝은 색으로 바뀌게 되는데, Fig. 8과 9에서 볼 수 있듯이 시간이 지남에 따라 대조군에 비해서 밝기가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 유산균의 생균수, pH 변화와 잘 일치하고 있다. 이러한 유산균의 활성 실험은 유산균을 담지한 미세입자가 성공적으로 유산균을 담지하고 있으면서, pH 7.4에서 유산균의 활성을 보이는 것을 의미하는 것으로 인체의 위에서는 완벽하

게 유산균을 보호하고 있음과 동시에 대장에서는 유산균의 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

해조류에서 추출한 다양한 생리활성을 갖고 있는 alginate를 유산균 담지체로 하여 유산균을 담지한 결과, 아주 작은 구형의 유산균 미세입자를 제조할 수 있었다. 유산균 미세입자는 위에서는 전혀 분해가 일어나지 않은 상태에서 유산균을 안정하게 담지하고 있다. 대장에서 분해가 됨으로써 유산균의 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 제조된 유산균 미세입자는 위에서 유산균의 사멸을 방지하므로서 효과적으로 대장까지 전달시킬 수 있을 것이다. 특히 유산균 미세입자는 유산균의 자체효과 외에 유산균을 담지하기 사용된 alginate와 코팅제로 사용된 키토산의 유용한 생리 활성을 모두 나타낼 수 있는 다기능성 유산균 미세입자로 응용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 (주)키토라이프(KITTOLIFE, Korea)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Armstrong, B., A. J. Van Merwyk and H. Coates. 1977.

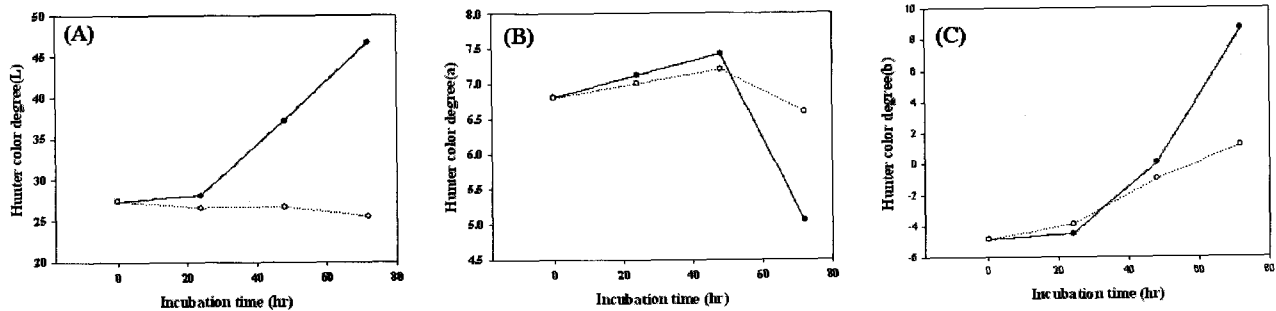


Fig. 8. Changes in Hunter color degree (A; lightness (L), B; redness (a) and C; yellowness (b)) of lactic acid bacteria microcapsule during incubation at 25°C for 72 hr. (●; lactic acid bacteria microcapsule, ○; control).

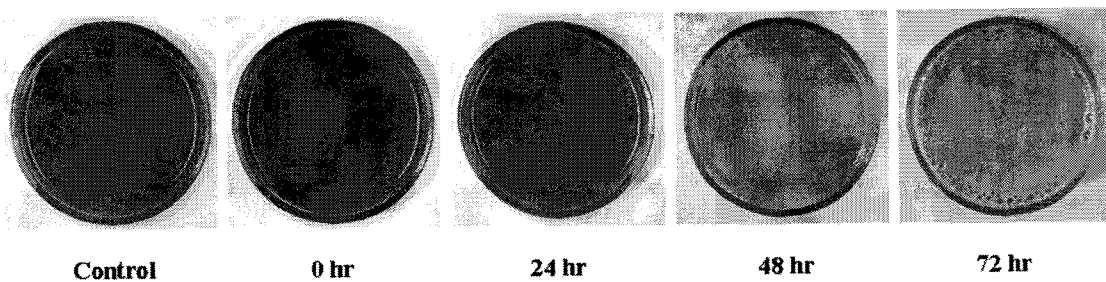


Fig. 9. Changes in colors of lactic acid bacteria microcapsule with litmus milk during incubation at 25°C for 72 hr.

- Blood pressure in seventh-day adventist vegetarians. *Am. J. Epidemiol.* **105**, 444-449.
2. Brine, C. J., P. A. Sandford and J. P. Zikakis. 1992. *Advances in Chitin and Chitosan*. pp. 659-670. Elsevier Applied Science, London.
  3. Cosby, N. C. 1950. Microencapsulation of single, multiple, zona pellucida-free mouse preimplantation embryos in sodium alginate and their development in vitro. *J. Reprod. Fert.* **90**, 19-57.
  4. Deeth, H. C. 1984. Yoghurt and culture's products. *Aus. J. Dairy Technol.* **39**, 111-113.
  5. Fujihara, M. and T. Nagumo. 1993. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydrate Res.* **243**, 211-245.
  6. Fujike, K., H. Matsuyama and T. Yano. 1994. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* **17**, 349-354.
  7. Go, K. M., J. S. Koo, Y. I. Kim and J. H. Yang. 1999. Preparation and stability of sodium alginate beads containing  $\beta$ -carotene. *J. Kor. Pharm. Sci.* **29**, 323-327.
  8. Guerrero, L., F. Omil, R. Mendez and J. M. Lema. 1998. Protein recovery during the overall treatment of waste waters from fish-meal factories. *Bioresource Technology* **63**, 221-228.
  9. Gebelein, C. G. and R. L. Dunn. 1990. *Progress in Biomedical Polymers*. pp. 283-290. Plenum Press, New York.
  10. Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod. 1967. Studies on the sequence of the uronic acid residue in alginic acid. *Acta. Chem. Scand.* **21**, 691-704.
  11. Haug, A. and O. Smidsrod. 1965. The effect of divalent metals on the properties of alginate. *Acta. Chem. Scand.* **19**, 341-347.
  12. Han, S. C., E. J. Heo, K. Y. Lee, Y. Z. Kim and J. C. Kim. 2003. Antioxidant effect of vitamin-C/alginate gel-entrapped liposomes for resistance of DHA autoxidation. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 229-233.
  13. Ilum, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research* **15**, 1326-1332.
  14. Jung, J. Y., S. S. Hui and Y. H. Choi. 1999. Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. *Food Engineering Progress* **3**, 90-97.
  15. Kim, K., K. I. Jang, C. H. Kim and K. Y. Kim. 2002. Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 255-262.
  16. Kimmura, T., K. Takahashi, Y. Ueda, H. Obika, Y. Kobayashi and K. Tsuji. 1993. Effects of the primary structure of alginate on fecal excretion of sodium in rats. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **67**, 1177-1183.
  17. Kobayashi, N., Y. Kanazawa, S. Yamabe, K. Iwata, M. Nishizawa, T. Yamagishi, O. Nishikaze and K. Tsuji. 1997. Effects of depolymerized sodium alginate on serum total cholesterol in healthy women with a high cholesterol intake. *J. Home Econ. Japan* **48**, 255-230.
  18. Lee, K. W., K. I. Jang, Y. B. Lee, J. S. Sohn and K. Y. Kim. 2007. Development of probiotic microcapsules for the preservation of cell viability. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 66-70.
  19. Lim, Y. S. and B. J. You. 2005. Effects of dialysis and various drying methods on physical properties of alginates prepared from sea tangle, *Laminaria japonica*. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**, 226-231.
  20. Lee, H. J., H. S. Kim, K. H. Chung, E. S. Lee and U. H. Chun. 1999. Optimization of the condition of immobilized *Photobacterium phosphoreum* with strontium alginate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 136-144.
  21. Lee, K. Y. and T. R. Heo. 1998. Particle size effects in buffer system using calcium carbonate bead immobilized with alginate for the cultivation of *Bifidobacterium*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 429-433.
  22. Lee, S. B., S. M. Seo, Y. M. Lim, S. K. Cho and Y. M. Lee. 2004. Preparation of alginate/poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels using gamma-ray irradiation grafting. *Macromolecular Res.* **12**, 269-275.
  23. Modrzejewska, Z. and W. Kaminski. 1999. Separation of Cr(VI) on chitosan membranes. *Industrial Engineering Chemistry Res.* **38**, 4946-4950.
  24. Morichi, T. 1974. Preservation of lactic acid bacteria by freeze-drying. *Jpn. Agric. Rec. Quart.* **8**, 171-176.
  25. Olivia, F., B. Pierre and G. Robert. 1998. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development Industrial Pharmacy* **24**, 979-985.
  26. Park, B. G., J. H. Lee, H. K. Shin, J. H. Lee and P. S. Chang. 2006. Optimization of conditions for the double layer microencapsulation of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 767-772.
  27. Rege, P. R., D. J. Shukla and L. H. Block. 1999. Chitosans as tableting excipients for modified release delivery systems. *International J. Pharmaceutics* **181**, 49-60.
  28. Son, E. H., Y. S. Yoon and S. Pyo. 1999. Immunomodulating activity of alginate. *J. Applied Pharmacology* **7**, 377-384.
  29. Singh, D. K. and A. R. Ray. 1999. Controlled release of glucose through modified chitosan membranes. *J. Membrane Science* **155**, 107-122.
  30. Yang, J. H. and J. P. Lim. 1998. Antibacterial effect of calcium alginate microcapsule containing chitosan. *J. Kor. Pharm. Sci.* **28**, 151-158.