

Hybridization system을 이용한 유산균의 장용성 건식 피복

박동준* · 안은영¹ · 김세승² · 임지영³ · 한경식¹ · 김세현¹ · 오세종⁴

한국식품개발연구원, ¹고려대학교 식품과학부, ²(주)남양알로에
³국민대학교 식품영양학과, ⁴한국야쿠르트

Dry Enteric Coating Process of Lactic Acid Bacteria by Hybridization System

Dong June Park*, Eun Young An¹, Jae Seung Kim², Jee Young Imm³,
Kyoung Sik Han¹, Sae Hun Kim¹ and Se Jong Oh⁴

Korea Food Research Institute, ¹Division of Food Science, Korea University
²Namyang Aloe Corporation, ³Department of Foods and Nutrition, Kookmin University
⁴R & D Center of Korea Yakult Co Ltd.

Surface-modified powders were produced by hybridization system using core freeze-dried lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121) and enteric coating materials. Scanning electron microscopy showed that the surface of freeze-dried lactic acid bacteria changed to smooth round shape during surface reforming process, although no significant physical damages affecting the activity of the lactic acid bacteria were observed based on viability and salt-tolerance tests. Significant difference was not found in acid tolerance test probably due to the inherent acid tolerance of *L. acidophilus* ATCC 43121. Significantly improved heat tolerance was obtained by surface modification process. Among the tested coating materials, Sureteric showed a higher surface-reforming ability than Eudragit S100 and L100-55. Core : coating ratio agent of 9 : 1 (w/w) with rotor speed of 15,000 rpm for 3 min were determined to be optimum conditions for the process.

Key words: hybridization, enteric, dry coating, lactic acid bacteria

서 론

기능성 유산균은 장내 균총의 정상화, 유당 불내증의 완화, 혈중 콜레스테롤 수준의 저하, 항암 효과 및 면역 체계 강화 등의 생리적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 이러한 기능성 유산균주가 포함된 식품이 체내에서 기대되는 생리적 기능을 수행하기 위해서는 유산균을 함유한 식품의 제조 공정 및 저장기간동안 그 활성을 유지해야 하며 섭취 후에도 가능한 한 활성의 저하 없이 장관에 도달하여야 한다. 일반적으로 유산균은 체내의 위산이나 공기에 노출될 경우 생존율이 감소하여^(2,3) 근래에는 유산균의 미세캡슐화를 통하여 유산균의 활성을 유지시키기 위한 연구들이 진행되고 있다⁽⁴⁾.

미세캡슐화는 내부물질과 외부물질과의 바람직하지 않은

접촉을 차단하여 내부물질을 외부환경으로부터 보호하고 원하는 시점에서 내부물질을 방출시키는 것을 주목적으로 식품 및 제약산업에서 상업적으로 응용되고 있다^(5,6). 미세캡슐화를 위한 방법으로서 분무건조, spray cooling, extrusion, coacervation 등의 다양한 방법이 적용되고 있으나 대부분의 방법은 액체상의 내부물질과 피복물질을 필요로 하며 분말의 소재에 적용하기는 용이하지 않다. 특히 가장 보편적으로 사용되는 분무건조에 의한 미세캡슐화 기술은 수화된 피복재에 피복대상이 되는 내부물질을 분산시켜 고온의 건조실에 분무하는 공정으로 이루어지므로 열에 민감한 균체의 피복기술로는 적합하지 않을 수 있다.

본 연구에서 사용한 hybridization system을 이용한 표면처리 기술은 미세한 분체에 보다 작은 입자의 피복재를 압축 공기로 쏘아 분체표면의 성질을 개선하기 위해 개발된 방법으로 최근 비타민 C, 비피더스균 등의 미세캡슐화에 적용되고 있다⁽⁷⁾. Hybridization system에 의한 표면처리는 분체간의 정전기적 힘으로 내용물질 주위에 피복물질을 부착하여 규칙적 배열의 혼합물(ordered mixture)을 형성하고⁽⁸⁾ 규칙적 배열의 혼합물이 압축공기와 회전 rotor에 의해 기계적, 열적 에너지를 개별 입자에 부여하여 단시간내에 고형화 처리 및

*Corresponding author : Dong June Park, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Sungnam-si, Kyunggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9132
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: djpark@kfri.re.kr

피복된 분체를 회수하는 원리로 되어 있다^{9,10}. Hybridization system을 이용한 건식 표면가공처리 기술은 포집되는 내용물의 함유율을 증가시키고 냉각시스템에 의해 가공 처리 중에 발생하는 열을 30°C 이하로 유지시킴으로써 습식 피복기술에 의하여 생산되는 제품에 비하여 품질의 변화가 적다는 장점을 가지고 있어 식품, 의약품 및 화장품 산업 등으로 활용성의 증가가 예상된다¹¹⁻¹³.

본 연구에서는 hybridization system에 의한 건식 피복기술(dry coating process)을 식품분야에 적용하기 위한 일차적인 시도로서 기능성 유산균주를 미세캡슐화하고 캡슐화과정에서 일어나는 유산균의 활성과 내산성, 내열성 및 내염성의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

유산균의 배양 및 분말화

Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 균주를 MRS (Difco, USA) 배지에 3회 계대배양 후 실험에 사용하였다. 유산균 배양을 위한 배지는 10% 환원탈지유에 glucose 0.3%, bacto peptone 0.3%, proteose peptone 0.3%, yeast extract 0.3% 및 mineral solution을 첨가하여 제조하였으며 pH 6.5로 조정 후 멸균하였다. 준비된 배지에 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주를 1%(w/v) 수준으로 접종하고 배지의 pH를 6.0으로 유지하며 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양액을 원심분리한 다음 회수 및 건조를 용이하게 하기 위해 10% 환원탈지유와 10% lactose를 함유한 용액을 동량 첨가하고 동결 건조하여 유산균 분말로 사용하였다.

장용성 건식 피복을 위한 전처리

균일한 분체 표면 처리를 위하여 피복재를 사용하지 않고 유산균 분말을 Hybridization system 내에서 처리하여 입자의 표면을 일정하게 유지하는 구형화 공정을 실시하고 그 적합성을 조사하였다. 분체표면처리를 위하여 실험에 사용한 피복재는 장용성 피복재인 Eudragit S-100(Rohm Pharma, Germany), Sureteric(Colorcon, UK) 및 Eudragit L100-55(Rohm Pharma, Germany)이었으며 Eudragit S-100과 Eudragit L100-55는 표면처리 전 Impact mill(ZPS 100, Alpine Co., Germany)을 사용하여 초미분쇄를 실시하고 기류분급기(ATP 100 Air-classifier, Alpine Co., Germany)로 회수하여 초기 피복재의 입자 크기가 5~10 µm 수준이 되도록 유지하였다. 피복재의 입자크기는 particle size analyzer(CILAS 106, CILAS, France)로 확인하였으며 Sureteric은 분쇄 전 초기 입도가 5.31 µm로서 별도의 초미분쇄 공정은 필요치 않았다.

분체표면 처리 조건에 따른 표면변화

유산균체 분말을 50, 50~100, 100~200 및 200 µm 이상의 크기별로 분획하고 hybridization system의 운전 조건 중 처리속도(5,000, 7,000, 10,000 및 15,000 rpm), 운전시간(3분 및 6분), 유산균체와 피복재의 비율(2:1, 4:1 및 9:1)에 따른 표면구조의 변화를 조사하였다. 분체표면 처리 시 압축공기는 6 kg/cm²를 사용하였으며, 처리 중 온도는 25°C 이하로 유지하였다. 처리구 당 약 5 g 정도의 분획된 유산균 분말을

시료로 사용하였으며 표면 변화는 주사전자현미경으로 관찰하였다.

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)에 의한 분체표면 분석

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체의 표면을 측정하였다. 양면 테이프를 알맞은 크기로 잘라 표본대에 부착한 후 그 위에 관찰하고자 하는 시료분말을 가볍게 떨어뜨렸다. 준비된 표본은 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시켰다. 표본의 형태는 15 kV의 accelerating voltage에서 관찰하였으며 대표적인 화상을 즉석필름(FP-3000B45, 9×12 cm, Fuji, Japan)으로 출력하여 비교하였다.

표면처리된 유산균의 활력, 내산성, 내염성 및 내열성 평가

표면처리 전, 후의 유산균의 활력변화는 MRS agar를 사용하여 37°C, 48시간 혐기 배양 후 생균수를 측정하였다. 내산성 평가는 Kobayashi 등¹⁴의 방법을 변형하여 KCl·HCl buffer(pH 1.5)에 pepsin(Sigma, USA)을 1000 unit/mL이 되도록 첨가하여 인공위액을 제조하였으며 이 용액 9.9 mL에 0.1 g의 시료를 첨가하고 37°C의 항온수조에서 교반하면서 0분, 150분 및 300분 동안 배양하였다. 내염성 평가는 Gardiner 등¹⁵의 방법을 변형하여 Glycine·HCl buffer(pH 1.5)에 최종 농도가 15%가 되도록 NaCl을 첨가하고 시료를 분주한 후 0, 60 및 180분 동안 배양하였다. 내열성 평가는 이¹⁶의 방법을 변형하여 Glycine·HCl buffer(pH 3) 9.9 mL에 시료를 0.1 g씩 분주한 다음 55°C로 조절된 항온수조에서 교반하면서 0, 40, 60, 120, 180 및 240 분에 시료를 채취하였다. 처리한 모든 시료들을 중성 pH인 phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 피복재를 제거한 후 MRS agar를 이용하여 37°C, 48시간 혐기 배양한 다음 생균수를 측정하였다.

통계처리

통계 분석은 SAS system¹⁷을 이용하여 각 처리구간 감소된 총균수의 차이를 p<0.05의 수준에서 t-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

유산균체의 구형화

동결건조된 유산균체는 매우 불균일한 형태를 나타내어 균일한 표면처리를 기대하기는 어려웠다. 표면가공처리의 효율성을 향상시키기 위하여 7,000 rpm에서 구형화 처리를 실시하고 표면 성상의 변화를 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 유산균체의 구형화 처리 시 구형화 정도는 초기 분획들의 크기에 따라 차이를 나타내었으며 대체적으로 처리속도가 증가함에 따라 구형화 정도는 향상되었다. 그러나 유산균체의 초기입도가 작은 경우에는 구형화의 뚜렷한 효과는 관찰되지 않았다. 특히 초기의 입도가 100 µm 이하일 경우 구형화 종료 후의 평균입도가 20 µm 이하로 감소되었으며 2차적인 분쇄효과를 보여 표면가공 처리에 다소 부적합하였다. 평균입도 100 µm 이상 200 µm 이하인 분획의

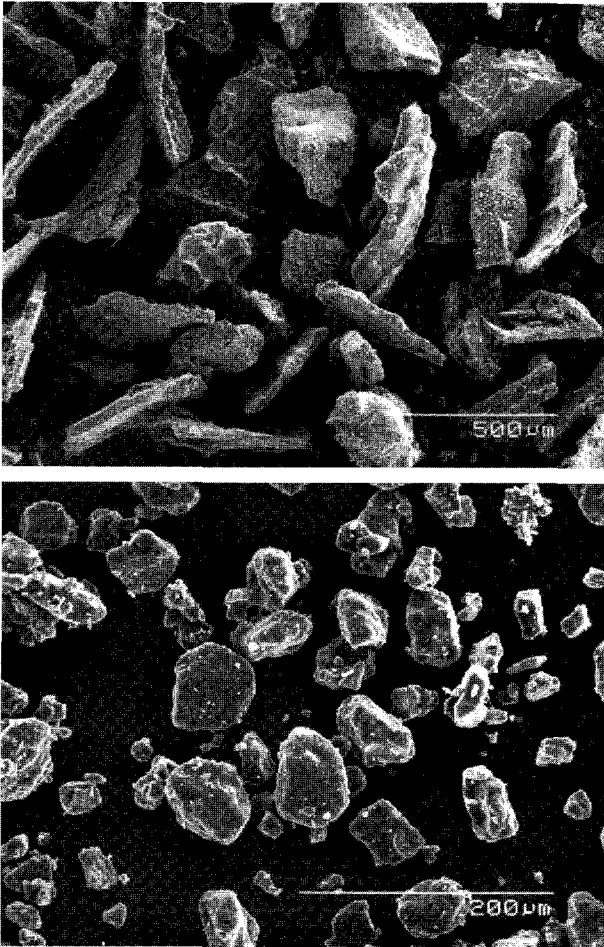


Fig. 1. Surface of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 before globing process (A), and after globing process (B) at 7,000 rpm for 3 min.

경우에는 운전속도 7,000 rpm 이상의 처리구에서 구형화 효과가 우수한 것으로 나타났다. 실제 피복재를 함께 투여하여 실시한 분체복합화 과정에서도 입자들의 부수적인 분쇄효과가 관찰되었으며 평균입도가 200 μm 이상인 경우를 제외하고는 구형화가 유산균체의 표면처리 과정에 있어서 필수적이지 않은 것으로 나타났다.

피복재에 따른 표면처리특성

적절한 분체복합화 처리조건의 설정을 위하여 표면처리 후 분체 표면의 특성 변화를 전자현미경으로 관찰하였다. 유산균체와 피복재의 배합비의 경우 9:1, 4:1 및 2:1로 표면처리를 실시한 결과 9:1의 배합 비율에서도 피복재의 종류와 관계없이 충분한 표면 처리 효과가 관찰되었다. 4:1 및 2:1의 배합비율에서는 표면처리에 참여 후 개별적으로 존재하는 잔여 피복재의 비율이 증가하는 것으로 나타났다. 표면처리를 위한 rotor의 회전속도가 증가함에 따라 분체의 구형도는 증가하는 경향을 나타내었으며 표면이 매끄럽고 균일하게 변화하였다. 표면 처리 시간은 12,000 rpm을 넘는 고속처리의 경우 3분과 6분 처리 시간에서 전자현미경으로 관찰되는 외관상의 특성 변화는 관찰되지 않았다. 전자현미경으로 분체 표면의 외관상 변화를 관찰하여 판단한 표면처리 효과

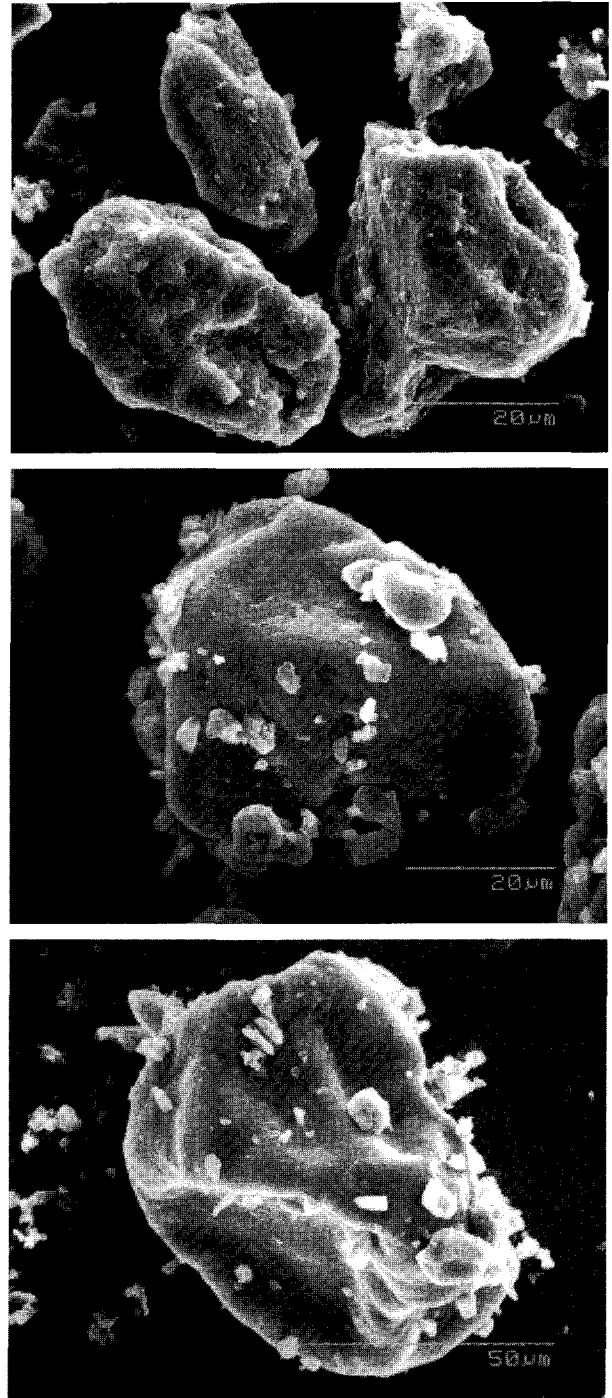


Fig. 2. Surface change of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 coated with different coating materials. Surface modification was made using Hybridizer system with rotor speed of 15,000 rpm for 3 min.

는 유산균체 : 피복재의 비율 9:1, rotor speed 15,000, 처리 시간 3분으로 나타났으며 위의 조건에서 표면처리를 실시한 결과는 Fig. 2와 같다.

Eudragit S100의 입자는 표면처리 전 무수한 격자모양의 입자가 뭉쳐 있는 형태를 보였으며 미분쇄 또는 표면처리를 위한 분체 복합화 과정에서 쉽게 보다 미세한 입자로 재분쇄되어 유산균체의 표면에 부착되기는 하였으나 표면 특성

Table 1. Changes of viable cell count of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 at various Hybridization conditions without coating materials

Rotor speed of Hybridizer (rpm) ¹⁾	Number of viable cells (CFU/mL)
Control	2.45 × 10 ¹⁰
5,000	1.71 × 10 ¹⁰
7,000	1.46 × 10 ¹⁰
10,000	1.08 × 10 ¹⁰
15,000	1.44 × 10 ¹⁰

¹⁾Hybridization was done for 3 min at the designated speed and the measurements were made in duplicate.

Table 2. Changes of viable cell count of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 coated with Sureteric

Batch	Number of viable cells (CFU/mL)	
	Surface modification for 3 min ¹⁾	Surface modification for 6 min ²⁾
Control	3.25 × 10 ¹⁰	
I	3.85 × 10 ¹⁰	2.25 × 10 ⁹
II	3.60 × 10 ¹⁰	2.70 × 10 ⁹
III	6.30 × 10 ¹⁰	2.75 × 10 ⁹
IV	4.30 × 10 ¹⁰	3.85 × 10 ⁹
V	4.80 × 10 ¹⁰	5.70 × 10 ⁹
Average	4.57 × 10 ¹⁰	3.45 × 10 ⁹

¹⁾²⁾Surface modification was done either for 3 min or 6min with rotor speed of 15,000 rpm.

Table 3. Changes of acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus* 43121 after surface modification

Incubation time in artificial gastric juice (h)	Viable cell (CFU/mL)	
	Control	After surface modification ¹⁾
0	9.60 × 10 ⁹	9.90 × 10 ⁹
2.5	1.89 × 10 ¹⁰	1.34 × 10 ¹⁰
5	1.85 × 10 ¹⁰	1.31 × 10 ¹⁰

¹⁾Surface modification was done for 3 min with Sureteric at the rotor speed of 15,000 rpm.

을 변화시키는 피복 효과는 우수하지 않았다(Fig. 2A). Sureteric의 경우에는 초기 입자의 모양이 부정형이지만 충격에 의하여 쉽게 퍼지는 전연성이 있어서 표면처리 효과가 다른 피복재에 비하여 상대적으로 우수하였으며 유산균체만을 구형화 처리하였을 때의 외관(Fig. 1)과는 현저한 차이가 관찰되었다. 이같은 표면 특성의 변화는 Sureteric에 의한 유산균체의 피복이 양호하게 수행된 결과인 것으로 판단된다(Fig. 2B). Eudragit L100-55의 입자의 표면처리 효과는 Eudragit S100과 Sureteric의 중간 정도였으며 Sureteric으로 표면처리를 실시한 경우와 비교할 때 분체 표면에 보다 많은 굴곡이 관찰되었다(Fig. 2C).

분체표면 처리 후 유산균체의 활성 변화

분체 표면처리 후 유산균의 활성유지는 분체 가공에 의한 기능성 획득여부를 판별하기 전 반드시 확인되어야 할 요소이다. 분체 표면 처리 과정에서 일어나는 유산균의 활성변화를 조사하기 위하여 일차적으로 유산균체만을 피복재 없이 다양한 처리 속도로 처리한 후 유산균체의 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Hybridizer의 rotor 회전 속도를 최고 수준인 15,000 rpm까지 증가시킨 경우에도 유산균의 활성은 비처리 대조구와 유사한 수준으로 유지되었으며 이 같은 결과는 Hybridization system에 의한 분체 복합화 처리가 유산균의 활성에 유의적인 영향을 미치지 않음을 의미한다.

피복재 Sureteric을 이용하여 유산균체와 분체 복합화를 실시한 후 피복재의 존재시 유산균의 활성 변화를 조사하였다. 표면처리는 15,000 rpm에서 3분 및 6분간 실시하였으며 실험의 재현성을 검증하기 위하여 동일한 처리를 5회 반복하고 피복 전 후의 유산균의 총균수를 동일한 batch에서 2회씩 반복 측정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 유산균의 활성은 15,000 rpm 3분의 처리 조건에서는 피복재와의 분체복합화 후에도 모두 대조구와 유사한 수준인 약 10¹⁰ cfu/mL 이상으로 나타나 유의적인 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 15,000 rpm에서 6분간 과도하게 분체 복합화를 실시한 경우 유산균체의 활력은 평균 3.45 × 10⁹ CFU/mL로 나타나 비처리 대조구에 비하여 약 1/10 정도 감소하였다. 따라서 실험에 이용한 분체 가공 조건 중 15,000 rpm, 3분 이하의 처리 조건에서는 유산균의 활성에 변화가 없는 것으로 판단되며 과도한 표면처리 조건에서는 분체간의 물리적 접촉에 의하여 유산균 활력의 감소가 일어날 수 있는 것으로 판단된다.

표면처리된 유산균의 내산성, 내염성 및 내열성의 변화

표면관찰에 의해 양호한 피복 효과를 확인한 Sureteric을 *L. acidophilus* ATCC 43121 균주와 1:9로 혼합하고 Hybridizer의 회전속도를 15,000 rpm으로 3 분간 처리하여 표면처리에 의한 분체복합화를 실시한 후 내산성, 내염성 및 내열성의 변화를 조사하였다.

표면처리된 유산균의 산에 대한 저항력을 조사하기 위하여 대조구 및 Sureteric으로 표면처리한 유산균을 인공위액에 일정시간 노출시킨 후 균수의 변화를 측정한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이 대조구와 처리구는 모두 산에 대하여 매우 우수한 저항력을 보였으며 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이 같은 결과는 실험에 사용한 균주(*L. acidophilus* 43121) 자체가 가지고 있는 강한 내산성 때문으로 생각되며 pH 1.5의 강한 산성과 pepsin이 존재하는 환경조건에서도 초기 균수의 변화가 관찰되지 않았다⁽¹⁸⁾. 한편, 장용성 피복재를 용해시켰을 때 나타난 생균수는 대조구와 유사한 수준으로 나타났음을 근거로 할 때, 중성 조건(pH 7.0)에서 표면처리된 피복재의 용해가 효과적으로 일어난 것으로 판단된다.

표면처리 전후의 유산균을 15%의 NaCl을 함유한 buffer(pH 1.5)에 1시간 또는 3시간 동안 노출시키고 생균수를 측정한 결과 표면처리 전 후의 유산균의 염에 대한 민감성의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 3). Gardiner 등은⁽¹⁵⁾ 분무건조방법을 이용하여 피복한 *L. paracasei* NFBC 338 균주를 대상으로 염에 대한 민감성을 조사한 결과 피복 전 5% NaCl 농도에서 민감성이 약 4%로 나타났지만 피복후에는 70% 정도로 염에 대한 민감성이 현저하게 증가하는 것으로 보고하였으며, 이는 분무건조과정 중 일어나는 세포막의 손상과 관련이

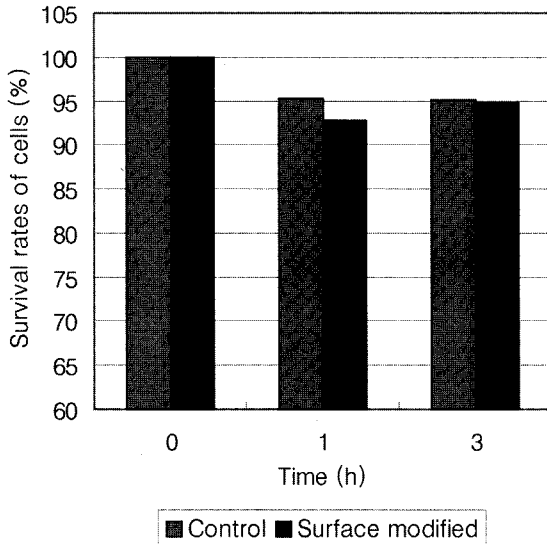


Fig. 3. Change of salt tolerance of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 after surface modification.

Salt tolerance was determined after exposing samples for 1 h or 3 h in the glycine · HCl buffer (pH 1.5) containing 15% NaCl. Surface modification was done for 3 min with Sureteric at the rotor speed of 15,000 rpm.

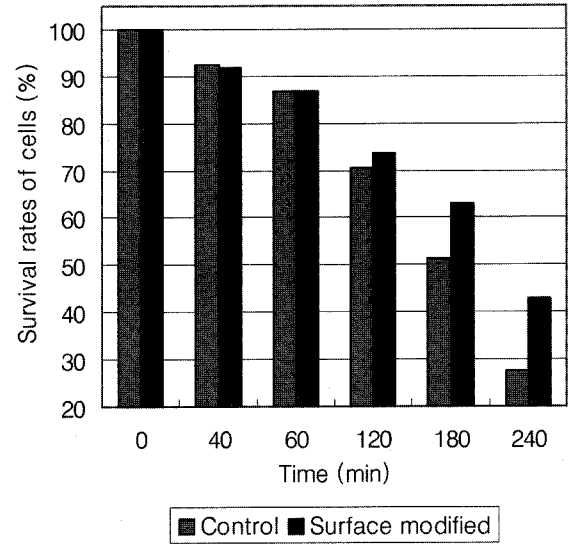


Fig. 4. Change of heat tolerance of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 after surface modification.

Heat tolerance was determined after exposing samples for the designated times in a 55°C water bath. Surface modification was done for 3 min with Sureteric at the rotor speed of 15,000 rpm.

있다고 하였다. 본 연구에서는 15% NaCl 농도에서도 피복 전, 후 유산균의 유의적인 활성 저하는 나타나지 않았으며 따라서 실험에 사용된 표면처리 조건에서는 유산균 세포막의 손상과 같은 물리적 손상을 일으키지 않는 것으로 생각된다.

표면처리를 통한 내열성의 변화를 조사하기 위하여 고온 단시간 가열처리 방법을 일차적으로 검토하였으나 5분 이내의 짧은 가열 시간에서는 초기시료의 상태 및 실험오차 등에 의하여 실험의 재현성이 낮았으므로 가열 과정에 일어나는 민감한 변화를 측정하기 위하여 55°C의 항온수조에서 장시간동안 가열하며 표면처리 전 후의 유산균 생존율의 변화를 조사하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 열처리 후 초기 균수 대비 생균수의 감소율은 120 분 이후부터 대조구와 처리구간의 유의적인 차이가 관찰되었으며 표면처리한 균주의 열안정성이 우수하였다($p < 0.05$). 또한 240분까지 장기간 열처리시 대조구와 처리구간의 균수는 더 큰 차이를 나타내었다 ($p < 0.05$). 위의 결과는 표면처리를 통하여 유산균의 열안정성이 일부 향상될 수 있음을 의미하며 현재 유산균의 열안정성 및 저장안정성 향상을 위한 다양한 피복물질의 탐색과 그 유용성을 검증하고 있다.

요 약

유산균의 활용성을 증진시키기 위한 방안으로서 건식 Hybridization system을 이용하여 장용성 피복재로 유산균분말의 표면처리를 실시하였다. 전자현미경 관찰 결과 표면처리는 유산균의 표면을 매끄러운 구형의 모양으로 변화시켰으며 표면처리를 통한 분체복합화 과정에서 유산균의 활력은 유의적인 변화없이 유지되었다. 또한 유산균의 내열성은 처리여부에 따른 유의적 변화를 보이지 않음으로써 표면처리 과정 중 유산균 세포막의 물리적 손상은 일어나지 않은

것으로 판단된다. 표면처리된 유산균의 내산성은 처리전후에 차이를 나타내지 않았으나 이는 균주 자체의 높은 내산성에 기인한 것으로 판단된다. 표면처리 후의 유산균은 유의적으로 높은 열저항성을 보여 표면처리가 유산균의 내열성 향상을 위하여 활용될 수 있는 가능성을 나타냈다. 조사된 장용성 피복재 중 Sureteric은 다른 피복재에 비하여 우수한 표면처리 효과를 보였으며 유산균분말의 표면처리를 위한 적합한 처리조건은 유산균의 초기입도가 100~200 μm, 유산균:피복재의 혼합비율(w/w)은 9 : 1, 처리속도는 15,000 rpm, 3분이었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원(200106-3)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Fuller, R. Probiotics 2, Applications and Practical Aspects. pp. 10-161, Chapman & Hall Press Inc., London, UK (1997)
2. Maffai, H.V.L. and Brega, F.J.N. Gastric pH and microflora of normal and diarrhaic infant. Gut. 16: 719-726 (1975)
3. Conway, P.L., Blomberg, L., Welin, A. and Cohen, P.S. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12 (1987)
4. O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. and Conway, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. J. Appl. Microbiol. 91: 1059-1066 (2001)
5. Bakan, J.A. Microencapsulation of foods and related products. Food Technol. 27: 34-39 (1973)
6. Fanger, G.O. Microencapsulation: A brief history and introduction, p. 1. In: Microencapsulation Processes and Applications, Vndergaer, J.E.(ed.). Plenum Press, New York, USA (1974)

7. Ono, K. Powder milling and composition technology, (1st) Powder process technology seminar. Korean Institute of Chemical Engineers (KIChE), Daejeon (1994)
8. Nystrom, C. and Westerberg, M. The use of ordered mixtures for improving the dissolution rate of low solubility compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 161-165 (1986)
9. McGinity, J.W., Ku, C., Bodmeier, R. and Harris, M.R. Dissolution and uniformity properties of ordered mixes of micronized griseofulvin and directly compressible excipient. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 11: 891-898 (1985)
10. Staniforth, J.N., Rees, J.E., Lai, F.K. and Hersey, J.A. Interparticle forces in binary and ternary ordered powder mixes. *J. Pharm. Pharmacol.* 34: 141-145 (1982)
11. Takafumi, I., Honda, H., Kikuchi, Y., Ono, K., Katano, T. and Koishi, M. Preparation of drug-diluent hybrid powders by dry processing. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 361-368 (1989)
12. Takafumi, I., Honda, H. and Koishi, M. Drug dissolution from indomethacin-starch hybrid powders prepared by the dry impact blending method. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 770-774 (1993)
13. Thiel, W.J., Nguyen, L.T. and Sberna, F.J. Content uniformity of microdose tablets (dosage 1 microgram-10 mg) produced by fluid bed granulation of interactive mixtures. *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 335-343 (1986)
14. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29: 691-697 (1974)
15. Gardiner, G.E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P. and Stanton, C. 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 (2000)
16. Lee, K.W. Studies on the microencapsulation of lactic acid bacteria and their survival. Ph.D. dissertation, Seoul National Univ., Seoul (1998)
17. SAS Institute Inc. SAS/STAT Software. Changes and Enhancements. through Release 6.11. Cary, NC, USA (1996)
18. Chai, C.H. Studies on probiotics strains with cholesterol lowering effect and mechanism of cholesterol assimilation by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. M.S. thesis, Korea Univ., Seoul (2000)

(2002년 7월 31일 접수; 2002년 9월 19일 채택)