

역미셀을 이용한 마이크론 수준의 초미세 알긴산 입자 제조

임지영 · 조영희¹ · 한대석¹ · 김석중^{2,*}

국민대학교 식품영양학과, ¹한국식품개발연구원, ²대구가톨릭대학교 식품공학과

Formation of Micron-sized Alginate Microparticles Using Reverse Micelles

Jee Young Imm, Young-Hee Cho¹, Daeseok Han¹ and Seok Joong Kim^{2,*}

Department of Food and Nutrition, Kookmin University

¹Korea Food Research Institute

²Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

Micron-sized alginate microparticles were formed in the water pools of reverse micelles (RM) composed of hexane/aerosol OT(AOT)/water through the gelation process between sodium alginate and CaCl₂. The size of microparticles formed increased as Wo (the molar ratio of water to surfactant) increased from 5 to 10. The microparticles became aggregated at Wo of 15, and stable RM no longer existed at Wo of 20. The characteristics of microparticles prepared at Wo of 5 and 10 showed significant differences in area, maximum diameter, minimum diameter, mean diameter, and perimeter of microparticles ($p < 0.05$). However, there was no difference in appearance and roundness between the microparticles. These results indicate that the size of microparticles are affected by Wo, whereas the overall shape of microparticles are not substantially influenced within Wo values used for stable RM formation. The mean diameter of microparticles was about 2~2.5 μm and much smaller (70~1,000 times) than the reported size of alginate microparticles formed in an aqueous medium.

Key words: microparticles, sodium alginate, calcium chloride, reverse micelles, AOT

서 론

식품 및 의약품 산업에서 미세입자는 유용물질 또는 약리 성분을 피복하여 유효물질의 안정성 증대, 체내 특정 조직으로의 운반 및 방출조절 등의 목적으로 그 활용성이 증가하고 있다⁽¹⁻⁵⁾. 식품산업에서 미세입자의 제조 시 사용되는 소재는 독성 또는 체내 대사 시 문제가 없어야 하며, 입자제조가 용이하고 경제적이어야 한다. 알긴산은 해조류에서 추출한 다당류로 β -D-mannuronic acid와 α -L-glucuronic acid가 1-4 결합한 monomer의 직선 사슬 구조를 가지고 있으며 독성이 없고 칼슘이나 다가의 양이온과 결합 시 쉽게 겔을 형성하여 효소 등 내부 물질을 고정화하는 소재로 식품산업에서 널리 이용되고 있다⁽⁶⁻¹⁰⁾.

Wan 등⁽⁴⁾은 nicin을 알긴산 칼슘으로 피복한 경우 단백질 분해효소로부터 nicin의 활성을 효과적으로 보호할 수 있다

고 보고하였으며 Lee와 Heo⁽⁵⁾는 비피더스균에 내산성을 부여하기 위해 알긴산 입자를 이용하였다. 그러나 현재 식품분야에서 상용화된 미세입자의 크기는 최소 150 μm 이상으로^(4,5) 제품 내에서 침전물의 형성, 입자내 포집된 물질의 낮은 체내 흡수율, 섭취상의 어려움 등의 문제점을 일으킬 수 있어 최근에는 더욱 미세한 입자의 제조에 관심이 증대되고 있다. 이에 본 연구에서는 역미셀계를 사용하여 현재까지 보고되어 있는 알긴산 입자보다 더욱 작은 초미세입자의 제조를 시도하였다.

역미셀 (reverse micelles, RM)은 유기용매 등 비극성 환경에 유화제가 존재하는 경우, 자발적으로 유화제의 극성부위가 비극성 환경으로부터 배제되어 서로 뭉치게 되고 비극성 부위는 유기용매쪽으로 향하게 되는 응집체 구조이다⁽¹¹⁾. 특히 극성을 띠는 유화제 응집체의 머리 부분에는 상당량의 물을 용해시킬 수 있어 상분리 없이 안정하게 존재할 수 있으며(이를 water pool이라 한다.) 그 양은 유화제 농도와 밀접한 관계가 있다. 특히, 유화제에 대한 물의 몰 농도비를 Wo로 표시하는데 일정한 Wo 범위에서 안정한 역미셀을 형성하게 된다^(12,13). 일반적으로 역미셀에서 water pool에는 아미노산, 펩타이드, 단백질, DNA, 세포 등을 용해시킬 수 있음이 보고되어 있으며, pH, 이온강도, 유화제, 유기용매 조성,

*Corresponding author : Seok Joong Kim, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Hayang, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea
Tel: 82-53-850-3218
Fax: 82-53-850-3218
E-mail: sjkim@cu.ac.kr

압력, 온도 등이 용해도에 관여하는 것으로 확인되었다⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. 이와 같은 역미셀의 용해특성은 약물의 운송수단, 단백질 등 물질의 회수⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ 등에 활용될 수 있으며 또한, lipase와 같은 효소 반응의 반응계로서 물질의 합성 또는 전환 등의 과정에서 넓은 반응경계면, 물질전달 제한의 감소, 높은 촉매활성 등의 장점을 부여할 수 있다⁽²⁰⁾. 특히, 역미셀내 존재하는 water pool의 크기는 수~수백 nm 수준으로 그 모양과 크기는 유화제의 종류, 농도, counterion의 성질, 용매 등에 의해 조절이 가능하여 이를 이용한 미세입자의 제조에 관심이 증대되고 있다^(21,22).

이에 본 연구에서는 역미셀계를 이용하여 water pool 내에서 알긴산 겔 형성을 통한 초미세입자 제조를 시도하였으며 형성된 입자의 입도 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시약

역미셀 형성에 사용한 용매인 hexane 및 n-butanol은 Fluka사의 HPLC급 제품을, 유화제인 dioctyl sulfosuccinate(AOT), cetyldimethylethylammonium bromide(CDAB), dodecyltrimethylammonium bromide(DTAB), 그리고 미세입자 제조 소재로 사용된 알긴산나트륨(medium viscosity)는 Sigma사에서 구입하였다. 전자현미경 관찰을 위한 미세입자 포집은 0.2 μ m membrane(13 mm, nylon filter type, Alltech Associates, Inc., USA)을 사용하였으며 기타 시약들은 분석용 등급을 사용하였다.

역미셀을 이용한 미세입자의 제조

미세입자 제조에 앞서 알긴산나트륨 수용액을 함유한 역미셀과 염화칼슘 수용액을 함유한 역미셀 각각을 injection method⁽²³⁾로 다음과 같이 제조하였다. Hexane에 AOT를 500 mM의 농도로 용해시킨 후 알긴산나트륨 수용액(0.1%)을 주사기로 서서히 AOT/hexane 용액에 분사시키면서 교반하여 알긴산나트륨을 함유한 안정된 역미셀을 형성시켰으며 염화칼슘 수용액(1%)을 함유한 역미셀도 동일한 방법으로 제조하였다. 제조된 알긴산나트륨 함유 역미셀 용액에 동량의 염화칼슘 함유 역미셀 용액을 서서히 혼합하면서 1시간 동안 교반시켜 알긴산 나트륨과 염화칼슘간의 겔 형성반응을 유도하였다.

한편, 미세입자 제조시 W_o 값([물]/[AOT])이 미세입자 생성 및 특성에 미치는 영향을 조사하기 위해 500 mM AOT/hexane 용액에 첨가되는 수용액층(알긴산나트륨 0.1% 용액과 1% 염화칼슘)의 양을 조절하여 W_o 값이 5, 10, 15가 되도록 역미셀을 형성시킨 후 미세입자 제조에 사용하였다. 사용하는 유화제 종류에 따른 미세입자 제조특성을 조사하기 위해서는 음이온 유화제인 AOT 외에 양이온 유화제인 CDAB, DTAB를 500 mM 농도로 사용하여 미세입자를 제조하였다. 이 경우에는 유화제 용해도 특성상 hexane과 n-butanol(1:1, v/v)로 구성된 유기용매를 사용하였다.

미세입자의 전자현미경 관찰

반응이 완료된 역미셀 용액은 filter syringe kit(13 mm, Alltech Associates, Inc., USA)를 이용하여 0.2 μ m membrane

으로 여과시켰다. 시료를 여과시킨 membrane은 상온에서 24 시간 건조시킨 다음 gold ion sputter coater를 이용하여 50초간 두 번 코팅한 후 주사전자현미경(scanning electron microscope, S-2380N, Hitachi, Japan)으로 membrane 표면에 부착된 알긴산 미세입자를 관찰하였다.

미세입자의 입도특성 분석

각 실험조건으로부터 제조된 미세입자의 입도특성을 비교하기 위하여 시료별로 서로 다른 위치에서 관찰된 시료의 이미지(최소 3장 이상)의 전자현미경 사진을 출력하였다. 출력 이미지에 나타난 입자들의 평균직경, 분포, 표면적, 구형도 등의 미세입자의 특성은 computerized image analysis system(Media Cybernetics, L.P., Image-Pro Plus 4.0, MD, USA)를 사용하여 분석하였으며 입도특성의 통계적 유의성은 paired t-test를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

역미셀 형성조건의 선정

일반적으로 역미셀 제조에 사용되는 용매로는 diethyl ether, chloroform, isooctane 및 hexane 등이 이용되고 있는데⁽²⁴⁾ 본 연구에서는 최종 제품이 식품소재로 활용되는 점을 감안하여 식용유지의 추출 등에 사용되고 있는 hexane을 선정하였다. 또한 역미셀 형성을 위한 유화제는 AOT, cetyltrimethylammonium bromide, Triton 계열, 그리고 lecithin, cephalin 등의 다양한 유화제 중에서⁽²⁴⁻²⁶⁾ 유화제의 극성 core내에 수분 흡수 능력이 우수하여 넓은 W_o 범위에서 안정한 역미셀 형성이 용이한 것으로 보고된 AOT를 선정하였다.

역미셀 제조에 적합한 유화제 농도의 선정을 위하여 다양한 농도(10, 50, 100, 500 mM)의 AOT를 hexane에 용해시킨 후 동일한 양의 물(1%, v/v)을 용매에 투입하며 역미셀 형성에 필요한 시간을 조사한 결과, 용매에 용해된 유화제의 농도가 증가함에 따라 경시적으로 관찰된 역미셀의 형성 속도는 증가하였다(data not shown). 또한, 상분리 없이 역미셀의 형성이 가능한 최대허용 water pool 함량은 유화제의 농도가 100 mM인 경우 12%(최종 부피 기준)인 반면 500 mM에서는 54%까지 증가하였다. 이와 같은 결과는 AOT 농도가 증가할수록 물을 함유할 수 있는 극성 head 부분의 농도가 증가하기 때문으로 일정 반응계에서 다량의 미세입자를 제조하기 위해서는 고농도의 AOT를 사용하는 것이 유리한 것으로 판단된다. 그러나 500 mM 이상의 AOT가 존재하는 경우에는 hexane의 점도가 증가하며 역미셀간 반응을 제한하여 미세입자 형성을 방해하는 것으로 나타났다. 위의 실험에 근거하여 500 mM을 미세입자 형성을 위한 유화제의 농도로 선정하였다.

역미셀계 내에서 미세입자 제조

알긴산 미세입자의 제조를 위하여 일차적으로 알긴산나트륨 함유 역미셀과 염화칼슘 함유 역미셀을 각각 제조하였다. 즉, 알긴산 함유 역미셀은 0.1% 알긴산나트륨 수용액 900 μ L를 10 mL의 AOT(500 mM)/hexane 용액에 injection-method로 주입하여 제조하였으며 이 경우 주입된 알긴산 수용액은 전체 부피 기준으로 4.5%(v/v)이며 AOT 농도에 대한 비율인

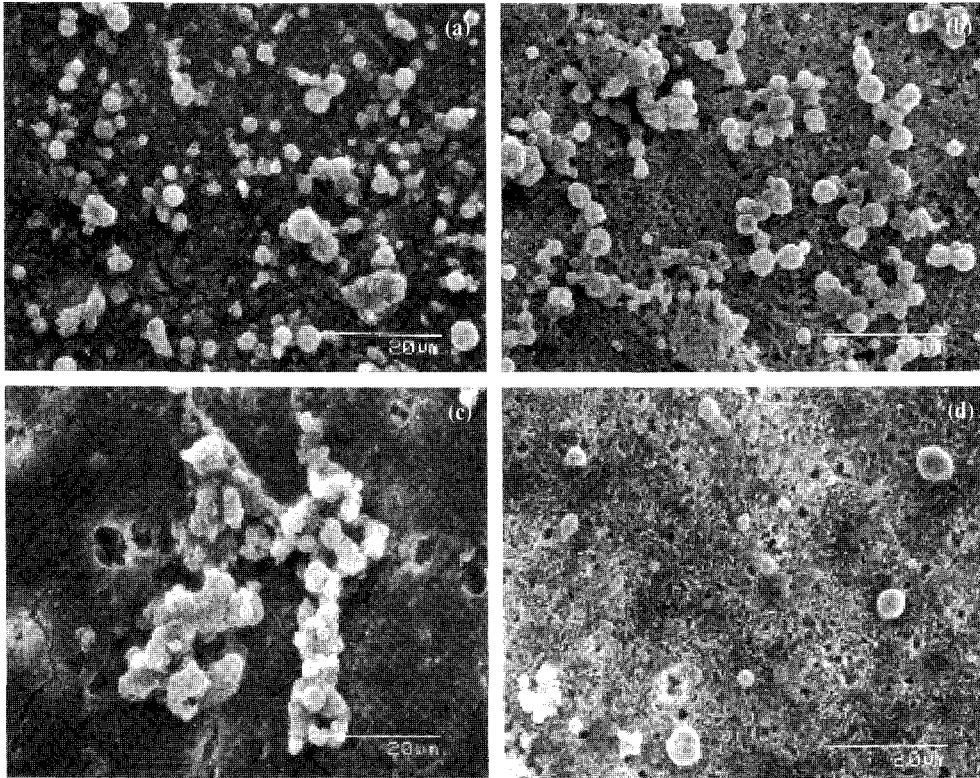


Fig. 1. Scanning electron micrographs of alginate microparticles prepared from reverse micelle system using sodium alginate and CaCl_2 .

(a) $Wo=5$, (b) $Wo=10$, (c) $Wo=15$, (d) $Wo=10$, the reverse micelle was formed at 100 mM AOT instead of 500 mM AOT. The images were observed after filtration of microparticles through 0.2 μm membrane.

Wo 기준으로는 10에 해당하는 양이다. 한편 알긴산나트륨 함량이 0.1% 이상인 수용액을 주입하는 경우에는 투명하고 안정한 역미셀이 형성되지 않았으므로 알긴산나트륨의 농도 증가는 고려하지 않았다. 동일한 방법으로 1% 염화칼슘 수용액을 AOT/hexane 용액에 첨가한 경우 안정한 염화칼슘 역미셀을 형성할 수 있었다.

한편, 알긴산나트륨 수용액(0.1%)과 염화칼슘 수용액(1%)을 서로 혼합한 경우 알긴산 겔의 형성이 가능하였으므로, 역미셀계의 water pool 내에서도 두 성분의 접촉이 이루어진다면 알긴산 미세입자 형성이 가능하리라 예측할 수 있다. 이와 같은 가설을 증명하기 위하여 제조한 두 역미셀 용액을 동량으로 섞어 주면서 교반한 후 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 Fig. 1과 같은 미세입자의 형성이 확인되었다. 이 결과는 각각의 역미셀을 혼합 시 알긴산나트륨 함유 water pool과 염화칼슘 함유 water pool이 상호 접촉이 가능함을 나타내며, 실제적으로 역미셀 내에서의 water pool들은 각기 독립적으로 고정되어 있는 것이 아니라 역동적으로 충돌, 융합 및 재분산의 과정을 통하여 내부 물질이 교환되고 이로 인한 물질간의 이동이 가능한 것으로 보고되어 있다⁽²²⁾. 따라서 두 역미셀 용액의 혼합 시 알긴산 함유 water pool과 염화칼슘 함유 water pool이 서로 융합하면서 두 성분이 반응하여 알긴산 겔이 형성된 것으로 판단된다. 두 역미셀 용액의 혼합이 종료된 후에도 역미셀은 투명하고 안정되게 유지되었으며 이 같은 결과는 형성된 미세입자의 크기가 안정된 역미셀에서의 water pool 크기 수준임을 의미한다.

안정한 역미셀에서 water pool의 구조와 크기를 결정하는 가장 중요한 인자는 유화제에 대한 물의 몰농도 비율, 즉 Wo 값이다^(12,13). Wo 값이 0인 경우는 물이 없이 유화제만이 존재하는 aggregate의 형태이나 물의 양이 점점 증가하면 유화제 aggregate의 극성 부위에 water pool을 형성하게 되고 물의 함량이 증가할수록 그 크기도 점차 증가한다. 그러므로 Wo 값의 조절을 통해 미세입자의 크기 조절이 가능할 수 있다. 이를 검증하기 위하여 Wo 값이 5, 10, 15 수준이 되도록 알긴산나트륨과 염화칼슘 역미셀을 제조한 후 이를 혼합하여 미세입자를 제조하였다.

Fig. 1의 (a)와 (b)에서 관찰된 바와 같이 $Wo=5$ 및 10에서 뚜렷한 입자의 형태가 관찰되었으며 Wo 값이 증가함에 따라 미세입자의 크기는 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 일정한 유화제 존재 하에서 물의 투여량이 증가함에 따라 유화제가 형성하는 water pool의 크기가 증가하기 때문에⁽²⁵⁾ 미세입자의 크기도 증가하는 것으로 생각된다. 그러나 Wo 값이 15인 경우에는 입자들의 응집으로 덩어리를 형성하는 것으로 나타났으며(Fig. 1(c)) 이와 같은 현상은 각 역미셀은 안정되지만 혼합 시 거대한 겔 덩어리의 형성으로 용매 내 고루 분산되어 재편성되지 못하고 뭉치게 되는 것으로 판단된다⁽¹³⁾. 한편, Wo 값이 20 이상인 경우에는 유화제에 의한 안정화 범위를 넘게 되어 물과 용매 층이 분리되었으며 미세입자의 제조가 불가능하였다. 그러므로 높은 Wo 에서 제조된 미세입자의 경우 유용물질의 포집량의 측면에서는 장점을 가질 수 있으나 형성된 미세입자들의 분리 및 안

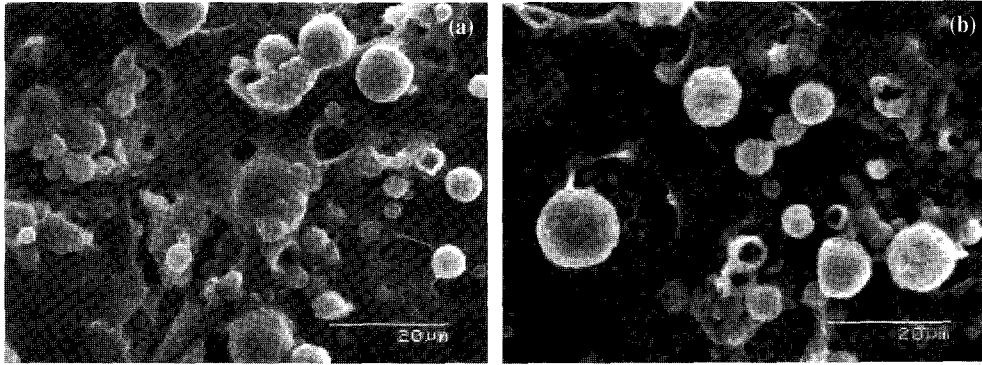


Fig. 2. Scanning electron micrographs of alginate microparticles prepared from reverse micelle system using various surfactants at $Wo=10$.

(a) CDAB, (b) DTAB

정적 회수와 미세한 입자를 형성하기 위해서는 낮은 Wo 에서 제조한 미세입자가 보다 큰 효율성을 가질 수 있는 것으로 판단된다. 이 결과는 한정된 범위 내에서 Wo 값을 조절함으로써 알긴산 미세입자의 크기를 조절할 수 있음을 의미한다. 한편, 동일한 Wo 의 조건($Wo=10$)에서 유화제의 농도를 100 mM로 감소시켜 미세입자를 형성시키게 되면 500 mM에 비해 미세입자의 수가 줄어드는 것으로 나타났으며(Fig. 1(d)) 이는 낮은 유화제 농도에서는 첨가되는 알긴산나트륨 용액의 양이 감소하기 때문으로 판단된다. 그러므로 미세입자 수를 측면에서는 유화제 농도가 높은 것이 바람직하였다.

역미셀 제조 시 역미셀 형성 및 모양, 크기, 안정성 등에 영향을 줄 수 있는 요인으로서 Wo 이외에 유화제의 종류를 고려할 수 있다. 즉, 유화제는 종류에 따라 극성부위의 전하 종류 및 크기, 비극성 부위의 크기 및 모양 등이 다르기 때문에 생성되는 역미셀의 성상에 차이를 나타낸다⁽²¹⁻²⁵⁾. 이에 본 연구에서는 음이온 유화제인 AOT이외에 양이온 유화제인 CDAB, DTAB를 이용하여 알긴산 미세입자를 제조하고 입자의 특성을 AOT의 경우와 비교하였다. 이 둘 유화제는 hexane에 대한 용해도가 낮았으므로 hexane과 n-butanol을 1:1(v/v)로 혼합한 용매를 사용하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 CDAB, DTAB를 유화제로 사용한 경우 AOT에 비해 큰 입자가 형성되어 보다 크기가 작은 미세입자를 형성하기 위해서는 AOT를 사용하는 것이 보다 효과적인 것으로 생각된다. 이들 양이온 유화제의 사용 시 알긴산 입자의 크기가 증가하는 이유에 대해서는 현재로서는 정확히 설명하기 어려우나 유화제의 특성 및 사용한 용매의 차이에 기인한 것으로 판단된다.

미세입자의 입도분포 특성

AOT를 유화제로 이용하여 제조한 미세입자 중 Wo 값이 5와 10인 경우는 주사전자현미경 관찰 결과 크기에서 차이를 보였는데 이러한 차이의 유의성을 조사하기 위하여 computerized image analysis system을 이용하여 입도분석을 실시하였다(Table 1). 각 입자의 면적을 나타내는 area는 $Wo=5$ 인 경우에 비해 $Wo=10$ 에서 약 60% 이상 증가하였으며 입자의 중심을 지나는 선분의 최장직경(max diameter), 최단직경(min diameter), 평균직경(mean diameter) 또한 각각 29%,

Table 1. Characteristics of micron-sized alginate microparticles prepared from reverse micelle system

Characteristics	$Wo=5$	$Wo=10$
Area (μm^2) ¹⁾	4.18 ± 1.77	6.76 ± 2.76
Aspect	1.21 ± 0.08	1.23 ± 0.07
Maximum diameter (μm) ¹⁾	2.33 ± 0.49	3.01 ± 0.59
Minimum diameter (μm) ¹⁾	1.83 ± 0.38	2.33 ± 0.45
Mean diameter (μm) ¹⁾	2.08 ± 0.42	2.66 ± 0.88
Perimeter (μm) ¹⁾	6.80 ± 1.45	8.68 ± 0.88
Roundness	1.12 ± 0.08	1.12 ± 0.04
Size (length) (μm) ¹⁾	2.33 ± 0.44	3.00 ± 0.59
Size (width) (μm) ¹⁾	1.96 ± 0.40	2.51 ± 0.52

¹⁾p<0.05, the values indicates mean ± standard deviation.

27%, 28% 증가하였다. 그리고 각 입자의 둘레 길이를 나타내는 perimeter도 약 27% 증가하였다. 입자를 타원으로 간주했을 때 타원의 장축과 단축의 비율로서 표시되는 aspect와 원주²/ $(4\pi \times \text{면적})$ 의 공식에 의해 산출한 입자의 구형도는 모든 처리구간에 차이를 보이지 않았다. 따라서 안정한 역미셀을 형성하는 Wo 값의 영역에서는 Wo 값이 역미셀에 의해 형성되는 입자의 모양에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었으며 그 수치가 1에 가까워 거의 구형임이 확인되었다. 한편, 입자의 최장축이나 최단축을 이용하여 측정된 입자의 크기에서는 입자 직경과 동일하게 유의적인 차이를 보였다. 각 Wo 값에서 형성된 입자의 평균직경의 분포도를 보면 $Wo=5$ 인 경우 약 84%에 해당하는 입자가 3.5 μm 이하의 크기를 나타낸 반면 $Wo=10$ 인 경우 65% 만이 동일한 영역에 존재하였으며 3.5 μm 이상의 직경을 가진 입자는 $Wo=5$ 인 경우에 비하여 2배 이상 증가하였다(Fig. 3).

결론적으로 역미셀을 이용하여 약 2-2.5 μm 정도의 미세입자를 제조할 수 있었는데 이는 기존의 알긴산 제조법을 통해 Wan 등⁽⁴⁾이 제조한 약 150 μm , Lee와 Heo⁽⁵⁾의 0.7~2 mm 입자에 비해 약 70~1000배 가량 작은 크기의 초미세입자 수준으로 나타났다. 더욱이 본 연구에서는 미세입자 수집 및 분석을 위해 0.2 μm membrane에 부착된 입자만의 크기를 관찰하였는데 역미셀의 water pool 크기가 nm 수준임을 감안한다면 더 작은 크기의 입자들도 생성되었으리라 추정

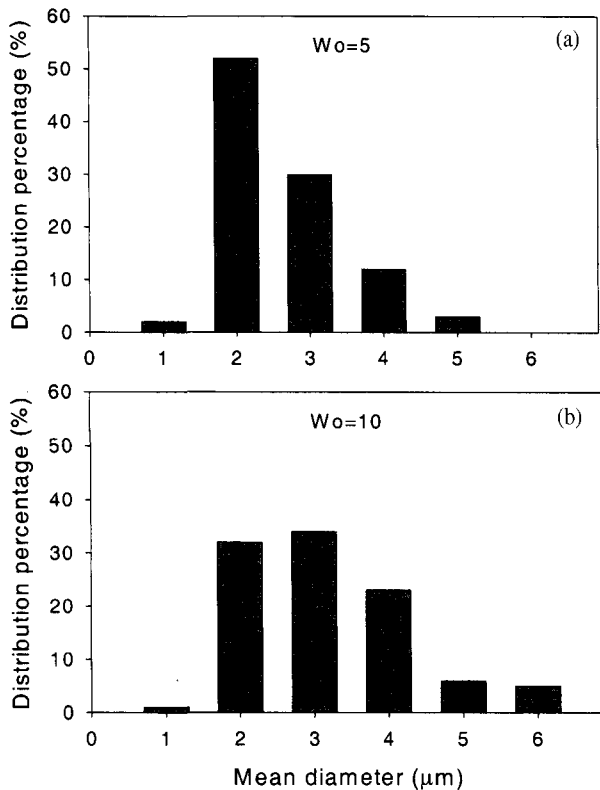


Fig. 3. Size distribution of alginate microparticles prepared from reverse micelle system at $Wo=5$ (a) and $Wo=10$ (b).

된다. 이와 같은 초미세입자는 기존 미세입자를 대체하여 색소 및 안정성이 낮은 기능성 소재나 약리성분의 피복, 음료 등의 제품에 침전방지, 방출조절 등에 활용될 수 있을 것이다. 그러나 향후, 역미셀에 의해 제조된 미세입자의 산업적 이용을 위해서는 다양한 용매, 유화제를 활용한 연구 및 수율 향상, 회수 등에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

요 약

Hexane/aerosol OT(AOT)/물로 구성된 역미셀의 water pool 내에서 알긴산나트륨과 염화칼슘의 반응을 이용하여 알긴산 초미세입자의 제조를 시도하였다. 주사전자현미경(SEM) 관측결과 미세한 입자들이 형성됨을 확인하였으며 이는 알긴산나트륨 함유 water pool과 염화칼슘 함유 water pool이 상호 접촉에 의해 내부물질의 교환이 가능함을 의미한다. 역미셀의 water pool 크기에 영향을 주는 유화제(AOT)에 대한 물의 몰농도 비율인 Wo 값을 5에서 10으로 증가함에 따라 미세입자의 크기가 유의적으로 증가하였으며 제조된 미세입자간의 입도특성을 비교한 결과, 각 입자의 표면적, 최장직경(max diameter), 최단직경(min diameter), 평균직경(mean diameter), 그리고 각 입자의 둘레 길이는 Wo 값이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). Wo 값이 15 이상에서는 입자간 응집이 발생하였으며 Wo 값이 20인 경우에는 안정한 역미셀의 형성이 불가능하였다. 제조된 입자의 평균직경은 $Wo = 5$ 에서 $2.08 \mu\text{m}$ 이었으며 10인 경우 $2.66 \mu\text{m}$ 으로 나타났다. 이는 기존에 보고된 알긴산 입자의 크기에 비하

여 약 70~1000배 가량 작은 수준이었다. 한편, 입자의 구형도는 분석된 Wo 구간에서 유의적인 차이를 보이지 않음으로써 역미셀에 의해 형성되는 입자의 외부형태는 안정한 역미셀을 형성하는 Wo 구간에서는 크게 변화하지 않는 것으로 판단된다.

문 헌

- Sanders, L.M., McRae, G.I., Vitale, K.M. and Kell, B.A. Controlled delivery of an LHRH analogue from biodegradable injectable microspheres. *J. Control Rel.* 2: 187-195 (1985)
- Lee, K.C., Lee, Y.J., Kim, W.B. and Cha, C.Y. Monoclonal antibody-based targeting of methotrexate-loaded microspheres. *Int. J. Pharmacol.* 59: 27-33 (1990)
- Lim, F. *Biomedical Applications of Microencapsulation*, pp. 137-154. CRC press, Boca Raton, FL, USA (1984)
- Wan, J., Gordon, J.B., Muirhead, K., Hickey, M.W. and Coventry, M.J. Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 153-158 (1997)
- Lee, K.Y. and Heo, T.R. Particle size effects in buffer system using calcium carbonate bead immobilized with alginate for the cultivation of *Bifidobacterium*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 425-433 (1998)
- Saito, K., Murat, T. and Mori, T. Encapsulation of carthamin and safflor yellow B in calcium alginate beads-technical stabilization of the color. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29: 715-719 (1995)
- Laca, A., Garcia, L.A., Argueso, F. and Diaz, M. Protein diffusion in alginate beads monitored by confocal microscopy. The application of wavelets for data reconstruction and analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 155-165 (1999)
- Amsden, B. and Turner, N. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 605-610 (1999)
- Jen, A.C., Wake, M.C. and Milcos, A.G. Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 357-364 (1996)
- Li, R.H., Altreuter, D.H. and Gentile, F.T. Transport characterization of hydrogel matrices for cell encapsulation. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 365-373 (1996)
- Pileni, M.P. *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1989)
- Walde, P., Giuliani, A.M., Boicelli, C.A. and Luisi, P.L. Phospholipid-based reverse micelles. *Chem. Phys. Lipids* 53: 265-288 (1994)
- Battistel, E. and Luisi, P.L. Kinetics of water pool formation in AOT/hydrocarbon reverse micelles. *J. Colloid Interface Sci.* 128: 7-14 (1989)
- Martinek, K., Klyachko, N.L., Khmelnskiy, Y.L. and Levashov, A.V. Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochim. Biophys. Acta* 981: 161-172 (1989)
- Andrade, S., Kamenskaya, E.O., Levashov, A.V., Moura, J.J.G. Encapsulation of flavodoxin in reverse micelles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 234: 651-654 (1997)
- Marcozzi, G., Correa, N., Luixi, P.L. and Caselli, M. Protein extraction by reverse micelles-a study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1239-1246 (1991)
- Gupta, R.B., Han, C.H. and Johnston, K.P. Recovery of proteins and amino acids from reverse micelles by dehydration with molecular sieves. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 830-836 (1994)
- Chang, Q., Liu, H. and Chen, J. Extraction of lysozyme, α -chymotrypsin, and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane, and water. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 970-973 (1994)
- Jarudilokkul, S., Poppenborg, L.H. and Stuckey, D.C. Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 593-601 (1999)
- Walde, P., Han, D. and Luisi, P.L. Spectroscopic and kinetic stud-

- ies of lipases solubilized in reversed micelles. *Biochemistry* 32: 4029-4034 (1993)
21. Silber, J.J., Biasutti, A., Abuin, E. and Lissi, E. Interaction of small molecules with reverse micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 82: 189-252 (1999)
 22. Adair, J.H., Li, T., Kido, T., Havey, K., Moon, J., Mecholsky, J., Morrone, A., Talham, D.R., Ludwig, M.H. and Wang, L. Recent developments in the preparation and properties of nanometer-size spherical and platelet-shaped particles and composite particles. *Material Sci. Eng. R23*: 139-242 (1998)
 23. Han, D., Yi, O.S. and Shin, H.K. Antioxidative effect of ascorbic acid solubilized in oils via reversed micelles. *J. Food Sci.* 55: 247-249 (1990)
 24. Scartazzini, R. and Luisi, P.L. Organogels from lecithins. *J. Phys. Chem.* 92: 829-833 (1988)
 25. Kan-No, K., Asano, H. and Kitahara, A. Study on the size of reversed micelles of anionic and cationic surfactants. *Prog. Colloid Polym.* 68: 20-24 (1983)
 26. Sunamoto, J., Hamada, T., Seto, T. and Yamamoto, S. Microscopic evaluation of surfactant-water interaction in apolar media. *Bull. Chem. Soc. Japan* 53: 583-589 (1980)

(2003년 9월 5일 접수; 2003년 9월 24일 채택)