

저분자 해양성 콜라겐과 γ -Aminobutyric Acid 생성 *Lactobacillus brevis* CFM20을 함유하는 이중코팅캡슐의 제조 및 특성

김선영 · 오도건 · 김광엽
충북대학교 식품생명 · 축산과학부

Preparation and Characterization of Double-Layered Coated Capsule Containing Low Molecular Marine Collagen and γ -Aminobutyric Acid Producing *Lactobacillus brevis* CFM20

Sun-Yeong Kim, Do-Geon Oh, and Kwang-Yup Kim

Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University

ABSTRACT This study was performed to encapsulate low molecular weight marine collagen and γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria to inhibit degradation and improve survival rate during exposure to adverse conditions of the gastro-intestinal tract. Calcium-alginate method was used for the manufacture of a double-layered coated capsule. The inner core material was composed of collagen and lactic acid bacteria, and the coating materials were alginate and chitosan. The sizes and shapes of the double-coated capsule were affected mainly by centrifuge speed and pH. Manufactured capsules were observed with a scanning electron microscope and by confocal laser scanning microscopy to confirm the micromorphological changes of capsules and bacterial cells. As a result, double-layered coated capsules were not degraded at pH 1.2, whereas degradation occurred at pH 7.4. In addition, GABA and collagen were maintained in stable state at pH 1.2. Therefore, double-layered coated capsules developed in this study would not be degraded in the stomach and could be stably delivered to the small intestine to benefit intestinal and dermatic health.

Key words: lactic acid bacteria, γ -aminobutyric acid (GABA), low molecule marine collagen, calcium-alginate capsulation

서 론

유산균은 자연계에 광범위하게 분포하며 전통적으로 다양한 발효식품에 이용됐고, 일반적으로 안전하다고 인식되는 미생물(generally recognized as safe: GRAS)로 여겨진다(1). 유산균은 숙주에 대하여 이로운 작용을 하는 프로바이오틱스(probiotics)로서 소화 흡수를 돕고 장내부패를 억제하며, 설사 변비의 치료 효과, 장내 유해균의 흡착 저해 및 성장 억제, 비타민의 생성, 혈중 콜레스테롤 저하능, 항암 효과, 인체의 면역 능력 증강, immunoglobulin의 생산 자극, 대식세포에 interferon 유도, 신체 부분적 산성화, hypocholesterolemic 효과, mutagenic 물질과의 반응, 항균물질인 박테리오신의 생성 등 다양한 기능성이 보고되고 있다(2-7).

γ -Aminobutyric acid(GABA)는 자연계에 널리 분포된

비단백질 아미노산의 일종으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질이다. GABA는 체내에서 신경전달물질의 하나인 acetylcholine을 증가시키고, 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사를 향상하는 역할을 한다(8). 또한, GABA는 혈압강하작용, 통증과 불안증세 완화, 당뇨병 예방, 불면, 우울증 완화 등과 같은 기능성을 보유하고 있다고 보고되었다(9-11). 국내 및 일본에서는 식품에서 분리한 유산균을 이용하여 GABA를 생성하는 균주에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(12-15).

콜라겐은 대부분 동물에서 발견되는 단백질로 특히 포유동물의 살과 결합조직을 구성하는 주요 단백질이다. 콜라겐의 섭취에서 가장 큰 핵심은 흡수율로서, 분자의 크기가 체내 흡수율에 영향을 준다. 동물성 콜라겐은 분자구조가 크기 때문에 흡수율이 낮지만, 해양성 콜라겐은 분자 크기가 작아 흡수율이 높다. 최근의 여러 논문을 통하여 단백질 가수분해물로부터 얻어진 펩타이드가 주름 개선, 보습 증진, 탄력 증가와 특정 피부효능을 나타낼 수 있는 잠재적인 소재로 활용되고 있다(16). 또한, 콜라겐의 경구 섭취가 머리카락 및 손톱, 발톱을 강화하고 윤택하게 만들어준다고도 알려져 있으며 관절이나 뼈에 미치는 작용에 대해 검증하는 연구들이

Received 18 April 2017; Accepted 23 June 2017

Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea
E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2568

수행되고 있다(17).

그러나 경구 투여 시 유산균과 해양성 콜라겐은 위장의 낮은 pH와 담즙산에 의해 사멸과 변성이 될 수 있으므로 낮은 pH에 대한 방어하는 방법이 필요하다(18-21). 이러한 필요성에 의해 최근에는 유산균 캡슐화 기술을 이용하여 장내까지 안전하게 운반하고 장내에서 유산균이 유리될 수 있도록 하는 연구가 진행되고 있다(22). 캡슐화란 고체, 액체, 또는 기체상의 물질이 특정 조건에서 외부로 유출될 수 있도록 작고 밀봉된 캡슐 내로 포장하는 기술이다(23). 캡슐화를 위한 조건으로는 먼저 외부 환경으로부터 내부 물질을 보호할 수 있을 만큼의 안정성 및 견고성을 지녀야 하며, 세포에 손상을 주지 않는 성분으로 미생물의 대사를 고려하여 수분, 영양분 등이 함께 캡슐화되어야 하며 영양물질이나 세포의 대사산물이 통과할 수 있도록 반투과성이어야 한다(23-26). 캡슐 재료 중 갈조류의 세포벽 점질 다당류인 alginate를 이용한 캡슐 제조 시, 열처리 과정 없이 수용액 상태에서 이루어지기 때문에 수분 손실에 따른 세포의 파괴를 줄일 수 있다(23,26). 그러나 alginate 캡슐은 산 및 열에 불안정한 특징을 지니며 인산염에서는 풀어지는 단점을 가져(27,28), 이를 보완하려는 방법으로 키토산을 이용하여 이중코팅캡슐을 제조하여 안정성을 높이는 연구가 보고되어 있다(29).

본 연구에서는 GABA 생성 유산균과 저분자 해양성 콜라겐 펩타이드를 섭취하였을 경우 체내 위장관의 불리한 조건에서 유산균이 쉽게 사멸하거나 저분자 해양성 콜라겐이 변성되는 문제를 해결하고자 캡슐화 방법을 적용하였고, 단일 코팅 하였을 경우 열과 산에 불안정하다는 점을 보완하고자 키토산을 이용하여 이중코팅캡슐을 제조하였으며, 체내에 캡슐이 유입되고 내부 물질이 방출되었을 때 유산균과 GABA, 콜라겐, 키토산들의 다양한 기능적 생리활성을 *in vitro* test 와 *in vivo* test로 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 캡슐 제조의 피복 물질로는 sodium alginate(DC Chemical Co., Ltd., Seoul, Korea), calcium chloride(Junsei, Tokyo, Japan), chitosan(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), acetic acid(Samchun, Pyeongtaek, Korea)가 이용되었으며, 캡슐 분해 시약으로는 sodium citrate(Shinyo Chemical Co., Hyogo, Japan)가 이용되었다. 본 실험에서 사용한 저분자 해양성 콜라겐 펩타이드는 (주)미드미(Chungju, Korea)에서 공급받아 사용하였으며, 제공받은 저분자 해양성 콜라겐 펩타이드의 영양성분 표는 Table 1과 같다.

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 청주 지역의 가정집에서 직접 담근 김치로부터 분리된 *Lactobacillus brevis*(*L. brevis*)

Table 1. General composition of collagen

Characteristics	Value
Calories	Approximately 3,643 kcal/100 g
Crude protein	101.0%
Carbohydrate	0.0%
Crude fat	0.0%
Ash	0.1%
Moisture	6.5%

CFM20을 사용하였다. 수거한 김치를 0.85%(w/v) NaCl (Junsei) 용액을 이용해 십진법으로 희석 후 유산균 증식용 배지로 이용되는 *Lactobacilli* MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)에 1.5% agar(Junsei)를 첨가한 평판배지에 0.1 mL씩 평판도말법으로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 미색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선별하였고, 이를 MRS 배지를 이용해 순수 분리하였다. 이들 균주는 50%(v/v)의 glycerol(Junsei)이 함유된 MRS 배지에 접종하여 -70°C의 deep freezer(Ultra-low temperature freezer, MDF-192, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 보관하여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화한 후 사용하였다.

저분자 해양성 콜라겐과 *L. brevis* CFM20의 캡슐화

본 연구에서 사용한 sodium alginate를 이용한 캡슐 제조 방법은 Lim과 Moss(25)가 제안한 방법으로 brown seaweeds로부터 추출한 alginate를 사용하여 생 세포에 손상을 주지 않고 droplet 표면에 semipermeable membrane인 alginate hydrogel이 형성되도록 하는 방법을 응용하여 캡슐을 제조하였다. 먼저 MRS broth에 *L. brevis* CFM20을 5%(v/v) 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리기(SUPRA 30K, Hanil, Kimpo, Korea)로 원심분리(4,000 rpm, 4°C, 10분) 하여 농축하였고 세포를 saline buffer(Sigma-Aldrich Co.)로 2회 세척하였다. 멸균시켜 용해된 5%(w/v) sodium alginate와 농축 세포, 저분자 해양성 콜라겐 용액을 2:1:1로 혼합하여 충분히 교반하였다. 이 혼합액을 peristaltic pump에 flexible tube를 연결하고 그 끝에 30 gauge needle를 연결하여 용액이 멸균된 15 g/L의 calcium chloride 용액에 적하되도록 제조 후 캡슐의 견고성을 위하여 30분가량 magnetic bar로 교반하여 alginate 캡슐을 제조하였고 캡슐을 멸균된 채로 회수한 후 멸균 생리식염수로 2회 세척하였다. 공초점 현미경(confocal laser scanning microscopy: CLSM)으로 확인한 결과 유백색의 불투명한 일정한 구형의 1~2 mm 크기의 캡슐이 형성된 것을 확인하였다.

Alginate를 이용한 캡슐이 산, 열, 인산염에 풀어지는 단점을 보완하기 위해 alginate와 다전해질(polyelectrolyte) 성 복합체를 형성하는 chitosan을 이용하여 이중코팅처리를 하였다. 1%(w/v) acetic acid에 chitosan 1%(w/v)를 첨가한 후 4°C에서 24시간 녹인 용액에 앞서 제조한 alginate

캡슐을 넣어 30분간 교반하여 코팅처리를 한 후 증류수로 2회 세척하였다(29). Chitosan 코팅 후 CLSM으로 다시 확인한 결과 캡슐의 크기가 약간 작아진 것을 확인하였다.

생육온도에 따른 *L. brevis* CFM20의 생육특성

본 연구에 사용한 균주 *L. brevis* CFM20의 온도에 따른 생육특성을 분석하기 위해 MRS broth에 5%(v/v)의 균주를 접종 후 온도조건을 달리한 25, 37, 45°C에서 48시간 동안 각각 배양하면서 생장곡선, pH 변화 및 GABA양을 측정하였다.

생장곡선은 spectrophotometer(Spectro Art 200, Wealtec Corp., Sparks, NV, USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, pH의 변화는 pH meter(720P, Istek, Seoul, Korea)로 측정함으로써 *L. brevis* CFM20이 생산하는 유기산의 양에 의한 pH를 측정하였다.

GABA양을 측정하기 위한 정량법은 Zhang과 Bown(30)의 enzymatic GABase assay를 이용하였다. 시료의 전처리에는 1.5 mL Eppendorf microcentrifuge tube(Hamburg, Germany)에 시료 100 µL와 메탄올 400 µL를 넣고 잘 섞은 다음 70°C로 예열된 항온수조(BW-20G, JEIO TECH, Daejeon, Korea)에서 30분 동안 완전 건조시킨 후 70 mM LaCl₃ 1 mL를 가하여 200 rpm, 25°C에서 교반시켜준 뒤 원심분리(10,000 rpm, 4°C, 5분) 하고 상등액 700 µL와 0.1 M KOH 160 µL를 1.5 mL Eppendorf tube에 취한 후 5~10분간 교반시켜준 뒤 이를 다시 원심분리(10,000 rpm, 4°C, 5분) 한 후 상등액 110 µL를 0.5 M K₄P₂O₇ 220 µL와 섞어 희석한 것을 사용하였다.

GABA 정량 및 표준곡선 작성은 1 mM GABA, 0.5 M K₄P₂O₇, 4 mM NADP, 2.0 units gabase/mL를 혼합하여 96-well plate에 넣어준 후 340 nm에서 흡광도를 측정(initial A)하고, α-ketoglutarate를 가하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정(final A)하여 그 차이(initial A-final A) 값을 이용해 GABA를 정량하고 표준곡선을 작성하였다.

저분자 해양성 콜라겐과 *L. brevis* CFM20의 혼합배양

MRS broth에 *L. brevis* CFM20과 농도별로 제조한 저분자 해양성 콜라겐 용액을 1:1로 혼합 접종한 후 최적온도로 설정한 37°C에서 48시간 배양하여 단독 접종 시의 배양과 비교하였다. *L. brevis* CFM20과 저분자 해양성 콜라겐의 혼합 배양한 것을 1 mL씩 취하여 saline buffer(Sigma-Aldrich Co.)로 단계 희석 후 MRS agar에 도말하여 생균수를 측정하였다.

캡슐 재료가 균체의 생존율에 미치는 영향

캡슐의 1차 외각을 이루는 물질인 sodium alginate는 항균성을 가지고 있다는 연구가 보고되어(31), 캡슐 제조 시 유산균에 미치는 영향을 분석하였다. 캡슐 제조 시 사용되는

농도인 5%의 alginate 용액을 상압 하에서 가열하여 제조한 후 원심분리(4,500 rpm, 4°C, 5분)를 통해 농축된 균체와 고르게 혼합하였다. 시간대별(0, 5, 10, 20, 30분)로 1 mL씩 취하여 saline buffer로 단계 희석 후 MRS agar에 평판 도말하여 생균수를 측정하였다.

Calcium chloride가 캡슐을 형성할 때 균체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *L. brevis* CFM20 1 mL를 원심분리하여 배양액을 제거한 후 캡슐 제조 시 사용하는 농도인 15 g/L calcium chloride 용액 1 mL와 섞은 뒤 방치하였다. 일정 시간 후 다시 원심분리 하여 calcium chloride와 균체를 분리한 뒤 분리된 균체를 단계 희석하여 MRS agar에 평판 도말하여 생균수를 측정하였다.

완성된 캡슐의 생균수 측정을 위하여 사용되는 0.1 M sodium citrate 용액이 균체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 원심분리 된 1 mL의 균체에 1 mL의 0.1 M sodium citrate 용액을 가한 뒤 시간대별로 방치한 후 다시 원심분리를 통하여 균체와 sodium citrate 용액을 분리하여 saline buffer로 단계 희석 후 MRS agar에 평판 도말하여 생균수를 측정하였다.

캡슐의 형태 및 세포 관찰

캡슐 내부의 *L. brevis* CFM20의 포집 상태를 보기 위하여 캡슐 제조 전에 균체를 0.1% pyronin Y(Sigma-Aldrich Co.)로 10분간 염색한 후 3번의 수세 과정을 거쳐 캡슐 제조를 하였으며 제조된 캡슐을 0.03% fluorescein isothiocyanate(FITC)(Sigma-Aldrich Co.)에 10~15분간 침지시킨 후 입체적 조직 영상을 얻을 수 있고 레이저 광 투과에 의해 표본 내부를 스캔할 수 있는 CLSM을 이용하여 광학적 절편(optical sectioning)으로 연속적 영상을 재구성하여 관찰하였다(31-33).

캡슐 외막을 관찰하기 위해 상온에서 24시간 건조한 캡슐을 고정된 후 critical point dryer에서 20분간 건조하고 -80°C에서 7분간 금속 코팅하여 다시 건조한 후 scanning electron microscopy(SEM)를 이용하여 관찰하였다(33).

pH에 따른 이중코팅캡슐의 형태를 관찰하기 위해 제조된 이중코팅캡슐을 pH 1.2와 pH 7.4의 PBS 용액에 0, 6, 12, 24시간 처리한 후 시간에 따른 캡슐의 형태 변화를 광학현미경(BX60F5 microscopy, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

체내 위와 장내 조건에서의 변화 관찰

L. brevis CFM20을 MRS broth에서 2회 계대배양 한 후, 1 mL를 취하여 4,500 rpm, 4°C, 10분간 원심분리기로 농축하여 배양액을 제거하고 체내 위와 장내 조건을 조성하기 위하여 PBS 용액으로 인공위액과 인공 장액을 pH 1.2, pH 7.4로 조절하였다. 농축된 균체를 pH 1.2의 PBS 용액 1 mL에서 0, 1, 2, 3시간 동안 처리한 후, pH 7.4 용액으로 옮겨주고 0, 1, 2, 3시간대별로 생균수를 측정하였다. 시간

대별로 방치한 후 원심분리 하여 PBS 용액을 제거하고 농축된 균을 saline buffer로 단계 희석 후 MRS agar에 평판 도말하여 생균수를 측정하였다(31).

이중코팅캡슐의 *L. brevis* CFM20의 생균수를 알아보기 위하여 상기와 같은 방법으로 수분을 제거한 캡슐 1 g을 취해 pH 1.2로 보정해 놓은 PBS 용액 1 mL에 넣고 시간대별로 0, 1, 2, 3시간 동안 방치한 후 캡슐을 pH 7.4의 PBS 용액 1 mL에 옮겨준 후 시간대별로 0, 1, 2, 3시간 동안 생균수를 측정하였다. 생균수를 측정하기 위해 PBS 용액을 제거하고 캡슐을 분해할 수 있는 용액을 1 mL 넣은 후 상온에서 vortexing을 통해 완전히 녹을 때까지 10~15분간 교반 분해하였다. 시료 용액 1 mL를 취해 saline buffer로 단계 희석 후 MRS agar에 평판 도말하여 생균수를 측정하였다. 캡슐 물질의 분해는 0.1 M sodium citrate(pH 8.0) 용액을 사용하였으며 0시간대의 총 유산균 수는 pH를 조절하지 않은 시료에 분해 용액을 처리하여 같은 방법으로 측정된 생균수로 하였다.

이중코팅 캡슐화된 *L. brevis* CFM20의 GABA가 방출되는 양상과 안정성을 알아보기 위하여 캡슐을 침지시킨 후 시간대별로 용액 중의 GABA 함량을 측정하였다. 수분을 제거한 캡슐 1 g을 취해 pH 1.2의 PBS 용액 1 mL에서 0, 1, 2, 3시간 동안 처리한 후, pH 7.4 용액으로 옮겨주고 0, 1, 2, 3시간대별로 용액 중의 GABA 함량을 측정하였다.

이중코팅캡슐의 저분자 해양성 콜라겐이 pH와 시간에 따라 방출되는 양상을 관찰하기 위하여 콜라겐의 특징적인 아미노산인 hydroxyproline 함량을 측정하였다(16). 수분을 제거한 캡슐 1 g을 취해 pH 1.2와 pH 7.4로 보정해 놓은 PBS 용액 1 mL에 넣고 시간대별로 0, 1, 2, 3시간 동안 방치한 후 PBS 용액을 취하여 hydroxyproline 함량을 측정하였다. 표준물질과 샘플을 100 μ L 취한 후 12 M HCl을 100 μ L 첨가하고 120°C에서 3시간 동안 가수분해 한 다음 활성탄을 넣고 섞어준 후 원심분리(13,000 \times g, 2분) 하였다. 96-well plate에 상등액 10~50 μ L를 옮겨준 후 60°C에서 건조한 뒤 chloramine T/oxidation buffer 혼합물을 100 μ L씩 첨가하였다. 혼합 용액을 상온에서 5분간 방치하고 희석된 dimethylamine borane 시액을 100 μ L씩 첨가하여 60°C에서 90분간 방치한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하였다(34).

동물실험

(주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양받은 체중 60~100 g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 항온 항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내온도 24 \pm 2°C, 습도 55 \pm 5%, 12시간 dark/light)에 일주일 이상 적응시킨 후 4주 동안 실험을 진행하였고 각 군당 8마리씩 하여 실험군은 총 3군으로 Control군(일반식이), Sample 1군(일반식이+ 저분자 해양성 콜라겐 캡슐), Sample 2군(일반식이+ 저분자 해양성 콜라겐과 GABA 생성 유산균을 함유한 이중코팅캡슐)으로 나누어

일반사료에 각각 혼합물을 혼합한 고형 배합 사료를 일일 섭취량을 고려하여 사육하였다. 군 분리 시행 후 일주일 동안 번씩 각 군의 평균체중에 대한 군 간 차이를 분석하였다.

혈액 내 hydroxyproline 함량과 혈청 중의 지질 농도 분석을 위하여 4주간 사육한 흰쥐를 실험종료일로부터 12시간 절식시키고 ethyl ether로 마취하여 개복한 후 복대동맥에서 혈액을 채취하여 군별로 total cholesterol, total, tri-glyceride, low density lipoprotein(LDL)-cholesterol, high density lipoprotein(HDL)-cholesterol의 수치를 분석하였다. 피부의 조직학적 형태 비교를 위해 실험 종료 후 등 쪽 피부조직을 1 cm \times 1 cm로 채취하였다. 이 피부조직은 10% 중성포르말린 용액에서 충분히 고정되었고, 통상적인 조직 처리 과정을 거친 다음에 파라핀에 포매하였다. 병리 조직학적인 관찰을 위하여 마이크로톰(microtome)을 이용하여 3 mm의 절편을 만들어 슬라이드를 제작한 후 haematoxylin과 eosin으로 염색하고 광학현미경상에서 관찰하였다. 실험 방법은 충북대학교에 설치된 동물실험윤리위원회의 승인을 득하였으며, 모든 실험 과정은 제시된 원칙에 따라 수행되었다(CBNUR-559-13).

통계처리

통계처리는 SPSS/Windows 18.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였고, 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하여 Duncan's multiple range test로 신뢰 수준 $P<0.05$ 에서 평균값들에 대한 그룹 간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

생육온도에 따른 *L. brevis* CFM20의 생육특성

L. brevis CFM20의 최적 생육온도를 알아보기 위하여 배양온도를 25°C, 37°C, 45°C로 조절하여 균의 증식에 미치는 온도의 영향을 성장곡선을 통하여 나타내었다(Fig. 1). 그 결과 25°C와 37°C의 경우에는 12시간 이후부터 급격한 증식을 보였으며, 45°C의 경우에는 증식이 더디게 진행되다

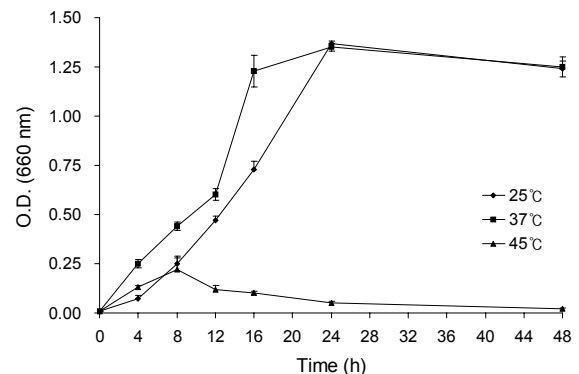


Fig. 1. Growth curve of *Lactobacillus brevis* CFM20.

가 더 생육하지 못하는 것을 확인하였다. 따라서 25°C와 37°C 증식이 가장 양호하였으며 37°C가 생육속도가 가장 빠른 것으로 확인되었다.

25°C, 37°C, 45°C에서 48시간 동안 배양하면서 pH를 측정한 결과 25°C와 37°C는 12시간까지는 일정한 pH를 유지하다가 12시간 이후부터는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2). 45°C의 경우에는 시간이 지남에 따라 pH 변화가 거의 없었다. 따라서 37°C에서의 균이 가장 많은 유기산을 생성한 것으로 확인하였고 배양시간과 생산되는 유기산의 양을 고려하였을 때 캡슐화하기에는 37°C가 유리한 것으로 판단된다.

생육온도에 따른 GABA 생성량을 알아보기 위하여 온도별 생장곡선에서 최대 균 농도를 보인 24시간대의 온도별 배양액에서의 GABA 생성량은 각각 305.545 µg/mL, 400.000 µg/mL, 60.606 µg/mL로 37°C에서 가장 많은 GABA가 생성되었다(Fig. 3). 생육온도에 따른 생장곡선과 pH 변화, GABA 생성량의 결과로 미루어 보아 최적 배양온도를 37°C로 설정하였다.

저분자 해양성 콜라겐과 *L. brevis* CFM20의 혼합배양

균을 단독배양과 콜라겐을 혼합하여 배양한 경우 균의 생

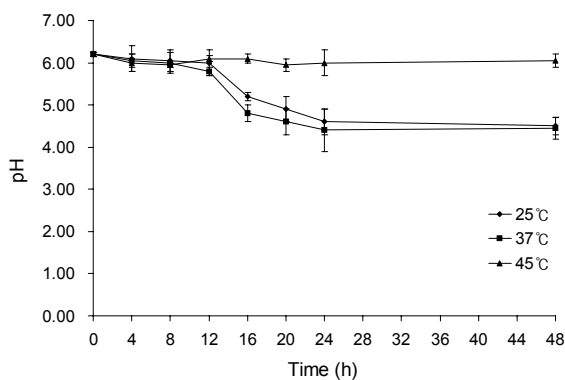


Fig. 2. pH changes of *Lactobacillus brevis* CFM20.

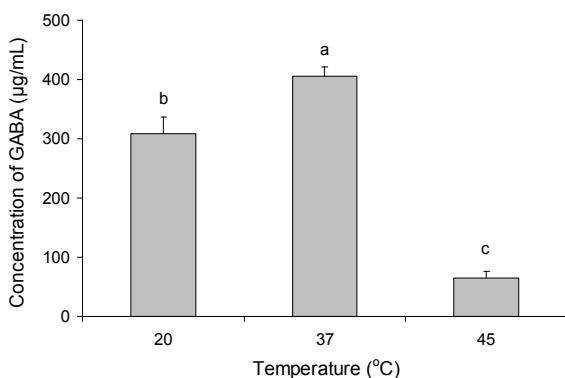


Fig. 3. γ -Aminobutyric acids (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CFM20 at different incubation temperature. Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Bars with different letters (a-c) are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

존율에 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 실험을 진행한 결과 전체적으로 생균수의 큰 차이는 보이지 않았지만, 단독으로 배양한 것보다 콜라겐을 혼합하여 배양한 것이 약간 높은 수치를 나타낸 농도를 확인하였다(Fig. 4). 그중 단독으로 배양한 경우의 8.1×10^8 CFU/mL의 생균수에 비하여 20%의 콜라겐 용액을 혼합하여 배양한 경우에는 9.4×10^8 CFU/mL로 가장 많은 생균수를 확인하였으며, 캡슐 제조 시 이용될 콜라겐 용액의 농도를 20%로 설정하였다.

캡슐 재료가 균체의 생존율에 미치는 영향

Alginate로 유산균을 캡슐화한 경우에 발효가 진행됨에 따라 점차 캡슐 내 미생물 수는 증가한다고 보고되었으며, calcium alginate를 이용하여 캡슐화한 경우에는 bacteriophage로부터 보호되는 현상이 나타났고 이는 alginate gel이 bacteriophage로부터 물리적으로 세포를 보호한다고 하였다(30). Alginate가 균체에 미치는 영향을 알아보기 위해 캡슐 제조 시 사용되는 5% sodium alginate에 유산균을 첨가한 후 시간대별로 생균수를 조사한 결과, 초기에 측정된 균수가 시간에 따라 감소하는 양상을 나타내었으며 60분이 지난 후의 최종 측정치는 초기 균수에 약 45% 정도의 균수가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이 결과는 alginate의 성질 중 병원성 균에 대한 항균성이 보고된 결과와 일치하며(29), 캡슐 제조 시 alginate와 균체의 접촉 시간을 되도록 단축하는 것이 캡슐화된 균의 활성에 유리할 것으로 생각한다.

Sodium alginate를 이용한 캡슐 제조 시 alginate는 화학적으로 2개의 나트륨이온을 갖고 있어 calcium chloride의 1개 칼슘과 치환되고 양이온 교환에 의해 가교 결합을 하며, 수용성 겔 또는 구형을 형성하는 특징을 가지고 있어 인체에 유용한 미생물을 쉽게 넣을 수 있다(18). 캡슐 제조 조건과 같은 조건을 형성한 후 시간대별로 생균수를 측정하여 그 영향을 살펴본 결과, 초기 균수에 반해 10분 후의 균수는 약 31% 감소하였고, 60분 후의 최종 생균수 측정 결과 약

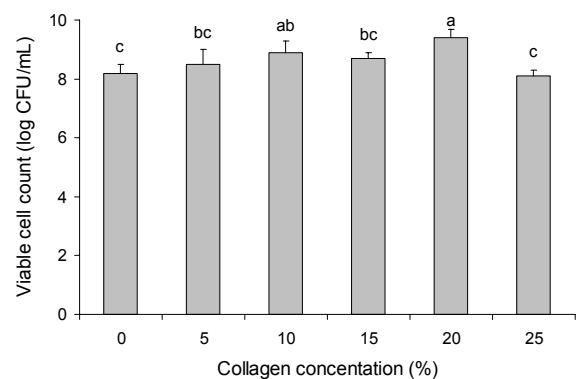


Fig. 4. Cultivation of *Lactobacillus brevis* CFM20 with collagen. Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Bars with different letters (a-c) are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

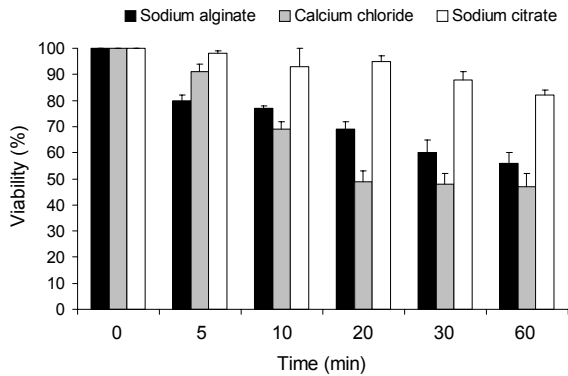


Fig. 5. Effects of capsule materials on *Lactobacillus brevis* CFM20.

50%의 균이 사멸한 것으로 측정되었다(Fig. 5). 이 결과로 미루어 보아 calcium chloride는 균체의 활성에 상당한 영향을 주기 때문에 되도록 균체와 calcium chloride가 접촉하는 시간을 단축하는 것이 유산균을 캡슐화하는 데 유리하다고 생각한다.

Sodium alginate를 이용하여 유산균 캡슐을 제조한 후 생존수의 측정을 위해서는 캡슐을 용해해야 한다. 본 실험에서는 0.1 M sodium citrate를 캡슐 분해 시약으로 사용하였으며, 60분 동안 sodium citrate와 농축된 균체를 방치한 후 생존수를 조사해 본 결과 초기 균수에서 20분 경과시간 동안 균수는 초기 균수의 90% 이상을 유지했으며, 최종 생존수는 초기보다 20% 정도 감소한 것으로 나타났다(Fig. 5). 위의 결과로 미루어보아 0.1 M sodium citrate 용액은 균체에 별다른 영향을 미치지 않는다고 판단된다.

캡슐의 형태 및 세포 관찰

이중코팅캡슐의 형태 및 내부의 세포를 관찰하기 위하여 confocal laser scanning microscopy를 이용하였다. 캡슐 제조 시 pyronin Y로 균체를 염색한 후 여러 번의 수세 과정

을 거친 후에 캡슐화된 *L. brevis* CFM20의 형태를 관찰하였다. 제조된 이중코팅캡슐을 FITC로 염색하여 위에서 광학 절편으로 관찰하였다(Fig. 6). 왼쪽에서 오른쪽으로 갈수록 내부에서 외부로의 광학적 절편을 나타내며, alginate 캡슐은 FITC로 염색 시 내부까지 침투하지 못하고 겉 부분만 염색이 되어 내부의 세포 포집 상태는 볼 수 없어 캡슐의 형태를 400배로 하고 optical sectioning 하여 montage로 관찰하였다. 캡슐 내부의 고정화된 *L. brevis* CFM20은 실사 형태가 아닌 단일 간균 형태로 보였으며 균이 내부에 포집되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 7). 형광을 달리하여 관찰한 캡슐을 나타낸 결과로 FITC 형광을 나타내는 (A), pyronin Y 형광을 나타내는 (B), (A)와 (B)를 겹쳐놓은 것이 (C)이다(Fig. 8). 캡슐의 단면을 관찰한 결과, (A)는 FITC로 염색된 캡슐의 외막을, (B)는 pyronin Y로 염색된 캡슐 내부의 균체를 나타내고 있으며 (A)와 (B)를 겹친 (C)는 캡슐 내부에 균체가 포집되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 9).

단일 코팅한 alginate 캡슐과 chitosan을 처리한 이중코팅캡슐의 캡슐 표면을 SEM을 이용하여 관찰하였다(Fig. 10). Alginate 캡슐의 표면은 비교적 엉성한 polymatrix를 형성하여 많은 얇은 격막으로 이루어져 있으며, 여러 군데 공동을 형성하여 염산에 의한 침투 및 수분의 손실을 받을 가능성이 있고 세포가 외부로 유출될 수 있다. 이를 30분간 chitosan으로 처리한 캡슐이 alginate와 chitosan의 가교 결합에 의해 좀 더 촘촘한 구조를 통하여 비교적 안정한 막을 형성하였다. 연구에 따르면 chitosan 처리 후 캡슐 크기가 약 6~16% 정도 감소를 했다고 보고되었는데(31), 이는 alginate 캡슐 내부로 chitosan의 침투에 의한 확산 및 막 내부로의 cross-linkage와 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서도 역시 30분간의 교반 후 캡슐 크기가 줄어들었으며 외형적으로도 더 단단해진 것을 확인하였다.

pH와 시간 변화에 따른 이중코팅캡슐의 형태 변화를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다(Table 2). 그 결과 pH 1.2

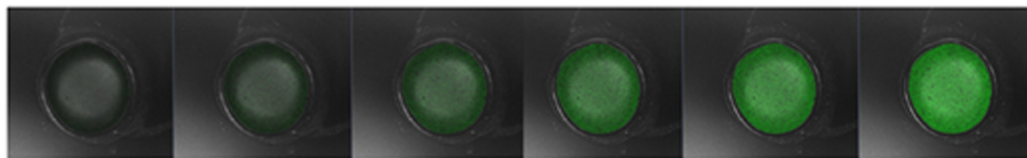


Fig. 6. Optical sections of confocal laser scanning microscopy for double-layer coated capsule.

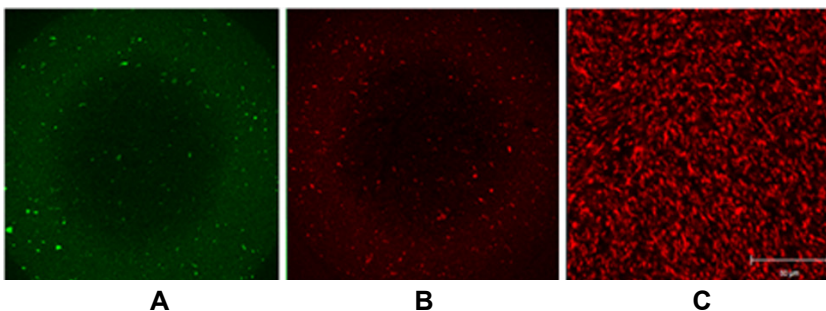


Fig. 7. Multi-color images of confocal laser scanning microscopy for double-layer coated capsule for sodium alginate and *Lactobacillus brevis* CFM20. (A) Capsule shell dyed with FITC. (B) Capsule shell dyed with pyronin Y. (C) *Lactobacillus brevis* CFM20 inside the capsule dyed with pyronin Y.

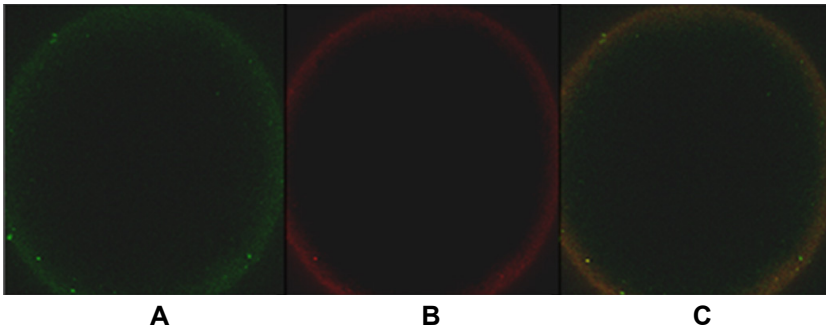


Fig. 8. Image of capsules containing *Lactobacillus brevis* CFM20 using confocal laser scanning microscopy. (A) sodium alginate, (B) *Lactobacillus brevis* CFM20, and (C) merged image of (A) and (B).

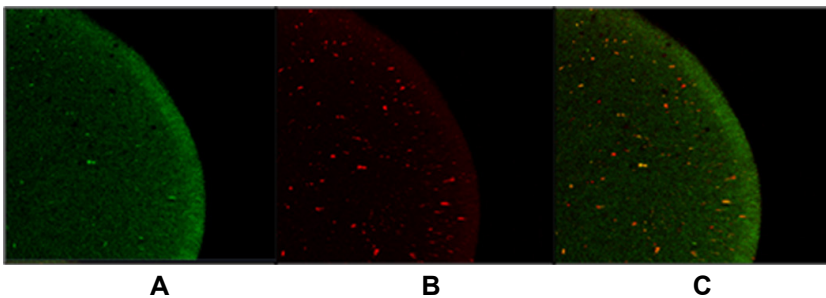


Fig. 9. Images of optical sections for capsules containing *Lactobacillus brevis* CFM20 using confocal laser scanning microscopy. (A) sodium alginate, (B) *Lactobacillus brevis* CFM20, and (C) merged image of (A) and (B).

의 경우 시간이 지남에 따라 이중코팅캡슐의 형태는 유지하면서 약간 부풀어 오르는 상태를 나타내었지만 비교적 안정한 구형의 형태를 나타내었다. 그러나 pH 7.4의 경우에는 시간이 지남에 따라 붕해가 일어나면서 24시간 때에는 완전히 분해된 것을 확인하였다.

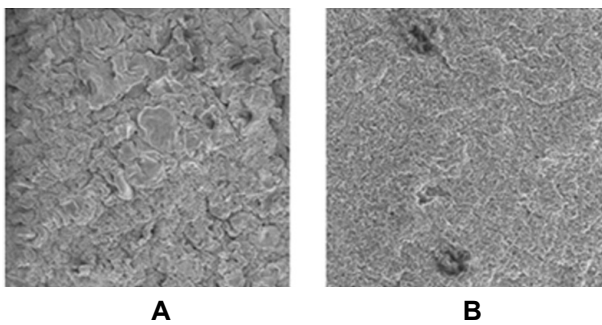


Fig. 10. Scanning electron microscope images of the outer surface of (A) alginate capsule and (B) alginate capsule treated with 1% chitosan.

Table 2. Comparison of double-layer capsule shape at 0, 6, 12, 24 h in pH 1.2 and pH 7.4

pH	Time (h)			
	0	6	12	24
1.2				
7.4				

체내 위와 장내 조건에서의 변화 관찰

이중코팅 캡슐화된 *L. brevis* CFM20을 인공위액의 조건인 pH 1.2에 노출한 후 연속으로 인공장액의 조건인 pH 7.4에 노출해 시간 변화에 따른 균의 생존율을 측정하였다 (Fig. 11). 인공위액의 조건인 pH 1.2에 처리한 결과, *L. brevis* CFM20은 초기 8.43 log CFU/mL였던 균수가 배양 시간이 지남에 따라 3시간 이후에는 4.28 log CFU/mL로 균수가 약 50% 감소하였다. 그러나 캡슐화한 *L. brevis* CFM20의 경우 초기 7.27 log CFU/mL였던 균이 3시간 이후 5.91 log CFU/mL로 균수가 약 18% 감소하여 균수의 감소폭이 적은 것을 확인하였다. 인공위액조건에 노출시킨 후 연속으로 인공장액의 조건인 pH 7.4에 처리한 결과, *L. brevis* CFM20은 배양 시간이 지남에 따라 균수가 초기

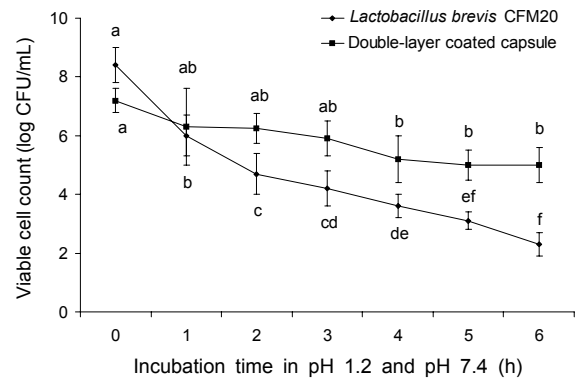


Fig. 11. Survival of *Lactobacillus brevis* CFM20 in gastric and intestinal condition, pH 1.2 and pH 7.4. Values are the mean± standard deviation of triplicate experiments. Different letters (a-f) above the line are significantly different $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

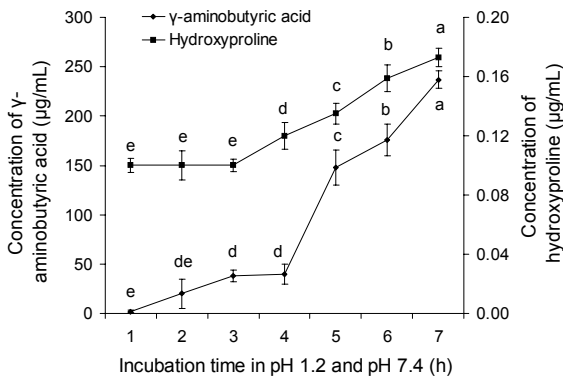


Fig. 12. Release of γ -aminobutyric acids and hydroxyproline from double-layer coated capsule in gastric and intestinal condition, pH 1.2 and pH 7.4. Values are the mean \pm standard deviation of triplicate experiments. Different letters (a-e) above the line that do not share for concentration of γ -aminobutyric acid and hydroxyproline are significantly different $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4.28 log CFU/mL에서 3시간이 지난 후 2.32 log CFU/mL의 생균수를 나타내어 45% 이하로 감소하였지만, 이중코팅 캡슐의 *L. brevis* CFM20은 초기 균수가 5.91 log CFU/mL였고 3시간 후에도 5.07 log CFU/mL 정도를 유지하여 14% 이하로 감소한 것으로 보아 이중코팅캡슐의 *L. brevis* CFM20이 생존율이 더 높은 것을 확인하였다.

이중코팅 캡슐화된 *L. brevis* CFM20이 pH와 시간에 따라 GABA와 hydroxyproline이 방출되는 양상과 안정성을 알아보고자 인공위액과 인공장액의 조건에서의 시간 변화에 따른 GABA 함량과 hydroxyproline 함량을 측정하였다 (Fig. 12). GABA 함량은 pH 1.2에 처리하였을 경우에는 3시간이 지난 때까지 50 μ g/mL 이하의 낮은 수치를 나타내었으나, pH 7.4에 처리한 후에는 시간이 지남에 따라 GABA 양이 급격히 증가하는 것을 확인하였다. Hydroxyproline 함량은 pH 1.2에서 약 0.09 μ g/mL의 수치로 시간에 따른 유의적 차이를 보이지 않았으나, pH 7.4의 경우 0.11947 μ g/mL, 0.13870 μ g/mL, 0.15633 μ g/mL, 0.17235 μ g/mL로 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 나타내었다.

동물실험

Control군(일반식이), Sample 1군(일반식이+ 저분자 해양성 콜라겐 캡슐), Sample 2군(일반식이+ 저분자 해양성 콜라겐과 GABA 생성 유산균을 함유한 이중코팅캡슐)으로 나누어 일반사료에 각각을 혼합한 고형 배합사료를 섭취하도록 사육하였다. 4주간 군별로 급여한 결과, 실험동물의 체중증가량은 콜라겐을 혼합한 Sample 1, 2군이 Control군보다 무게가 덜 증가한 것으로 확인되었다(Table 3). Sample 1, 2군의 사료에 혼합된 콜라겐으로 인하여 콜라겐을 섭취한 군이 혼합하지 않은 사료를 섭취한 Control군에 비해 체중 증가가 적게 나타난 것으로 생각된다.

혈청 지질의 농도는 각 그룹의 수치를 비교한 결과 total

Table 3. Comparison of weight gains of rats

Group ¹⁾	Weight gains (g)		
	Initial	Final	Gain
Control	150.63 \pm 9.08 ^{a2)3)}	341.25 \pm 11.25 ^a	190.63 \pm 15.98 ^a
Sample 1	149.53 \pm 7.35 ^a	323.75 \pm 10.56 ^{ab}	174.23 \pm 13.28 ^b
Sample 2	146.44 \pm 8.57 ^a	317.44 \pm 10.31 ^b	171.00 \pm 12.86 ^b

¹⁾Control group, normal diet; Sample 1 group, normal diet+collagen capsule; Sample 2 group, normal diet+double-layer capsule.
²⁾Values are the mean \pm standard deviation of triplicate experiments.
³⁾Different letters within a column are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

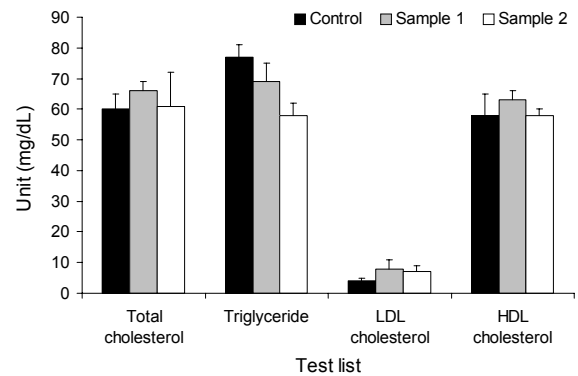


Fig. 13. Cholesterol contents in rat serum. Groups are the same as Table 3.

cholesterol과 triglyceride는 Control군과 Sample 1군에 비해 이중코팅캡슐을 혼합한 사료를 섭취하였던 Sample 2군의 수치가 낮았고, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol은 Control군과 비슷한 결과를 보여주었다(Fig. 13).

흰쥐의 혈액을 채취하여 분리한 혈청으로 혈액 내 hydroxyproline의 함량으로 콜라겐의 영향을 분석한 결과, Control군의 평균 hydroxyproline 함량인 0.05114 μ g/mL에 비해 Sample 1, 2군이 0.06216 μ g/mL와 0.06170 μ g/mL로 더 높은 수치를 나타낸 것을 확인하였다(Table 4). 콜라겐의 섭취로 인하여 hydroxyproline 함량이 증가한 것으로 판단된다.

흰쥐의 등 쪽 피부 주혈을 채취하여 광학현미경으로 관찰 결과를 그룹별로 나타낸 결과는 Fig. 14와 같다. 실험 결과 사진을 살펴보면, 진피조직의 구성 및 색상을 비교해볼 때 Control군은 Sample 1군과 Sample 2군에 비해 진피의 피

Table 4. Hydroxyproline contents in rat serum

Group ¹⁾	Hydroxyproline (μ g/mL)
Control	0.05114 \pm 0.01004 ^{b2)3)}
Sample 1	0.06216 \pm 0.00908 ^a
Sample 2	0.06170 \pm 0.00737 ^a

¹⁾Group are the same as Table 3.
²⁾Values are the mean \pm standard deviation of triplicate experiments.
³⁾Different letters (a,b) are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

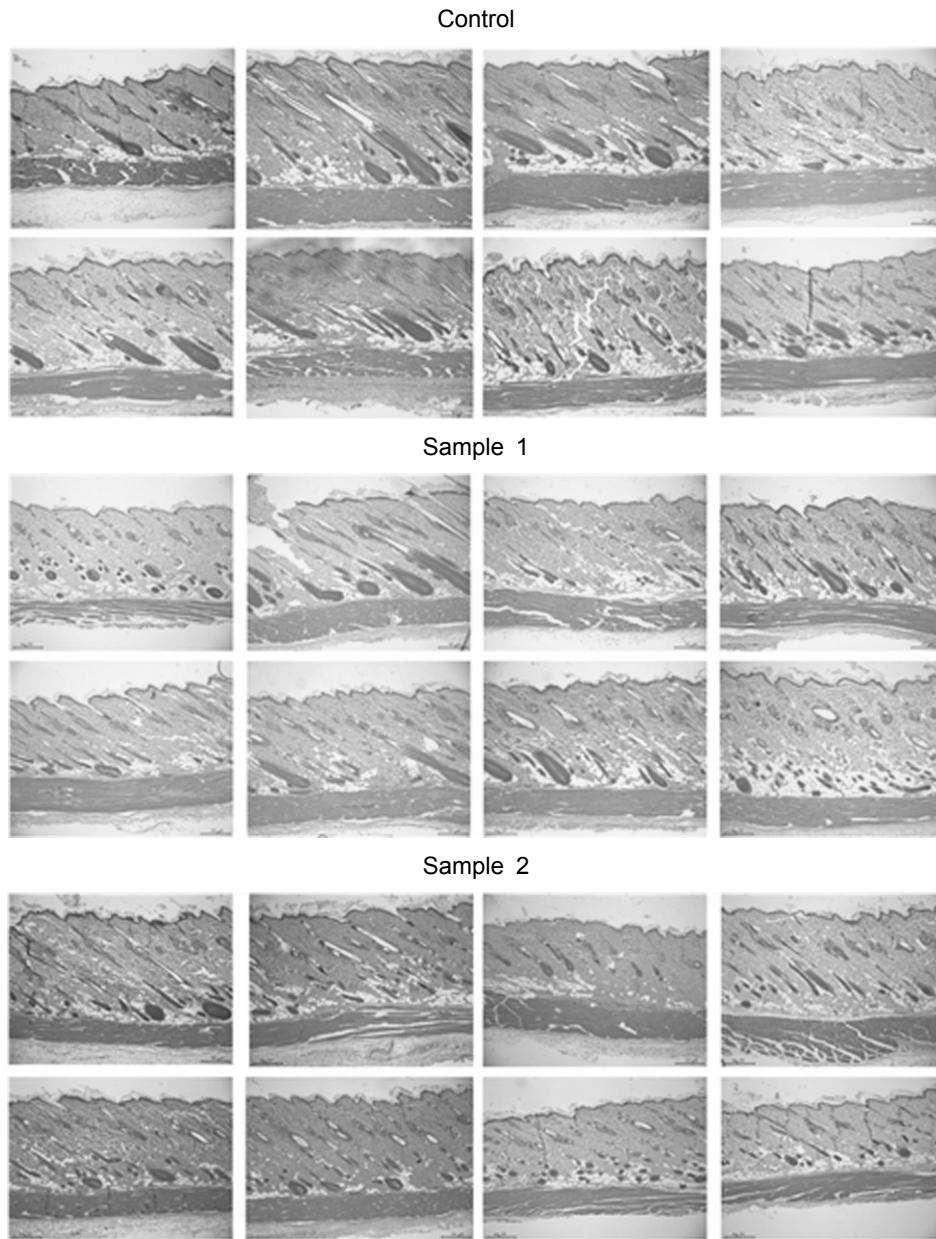


Fig. 14. Dorsal skin sections of each group. Groups are the same as Table 3.

부조직 밀도가 낮은 것으로 판단되며, Control군, Sample 1군, Sample 2군의 세 실험군 중 Sample 2군의 진피의 피부조직 밀도가 가장 높은 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 저분자 해양성 콜라겐과 GABA 생성 *L. brevis* CFM20의 섭취 시 다양한 인체 장내 조건에 의한 유산균의 사멸과 콜라겐의 분해를 최소화하고자 진행되었다. 유산균과 저분자 해양성 콜라겐의 안정성을 향상하기 위하여 alginate와 chitosan을 이용하여 이중코팅캡슐을 제조하였다. *L. brevis* CFM20의 온도별 생육특성을 분석하여 캡슐화에

유리한 배양온도를 조사한 결과 37°C에서 배양한 균의 대수기가 가장 빠르고 GABA양 또한 400 µg/mL로 가장 높은 수치를 나타내어 생육속도에서 가장 유리한 것으로 나타났다. Calcium-alginate bead 법으로 캡슐을 제조한 결과 1~2 mm 사이의 일정한 구형의 캡슐을 제조하였으며, chitosan을 이용하여 이중코팅캡슐을 제조한 결과 캡슐의 크기가 감소하였고 외형적으로도 더욱 단단해짐을 확인하였다. 제조된 이중코팅캡슐을 CLSM과 SEM을 이용하여 관찰한 결과, chitosan 코팅을 한 이중코팅캡슐의 표면이 alginate와의 가교결합에 의해 더욱 치밀해짐을 확인하였다. 체내 위와 장내 조건에서 시간에 따른 이중코팅캡슐의 *L. brevis* CFM20 생존수를 분석한 결과 캡슐화한 경우 균의 감소가 더디

어 더 안정하다고 판단하였다. 이중코팅캡슐을 체내 위와 장내 조건에서 시간에 따른 GABA와 hydroxyproline의 용출량을 분석한 결과 두 경우 모두 위 조건에서는 낮은 수치를 나타내었고 장내 조건에서는 시간이 지남에 따라 급격하게 증가한 것을 확인하였다. 동물실험 결과 콜라겐 섭취군이 비섭취군에 비해 체중증가량, 혈청 지질 농도 등이 적은 것을 확인하였고, 혈액 내 hydroxyproline 함량, 진피의 피부 조직 밀도가 더 높은 것으로 관찰되었다. 본 연구에서 개발된 이중코팅캡슐을 섭취하는 경우 위에서는 안정한 상태였다가 장에 도달한 후 붕해됨으로 인하여, 유산균, GABA, 콜라겐 및 키토산의 작용으로 인체에 유익한 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 충북대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Sannine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 1972. Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J Milk Food Technol* 35: 691-702.
- Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7: 175-188.
- Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. 1995. Improved immunogenicity of oral D × RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13: 310-312.
- Kitazawa H, Matsumura K, Itoh T, Yamaguchi T. 1992. Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. *Immunol* 36: 311-315.
- Zheng HY, Alcorn TM, Cohen MS. 1994. Effect of H₂O₂-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J Infect Dis* 170: 1209-1215.
- Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Lett* 46: 343-356.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 39-85.
- Chang JS, Lee BS, Kim YG. 1992. Changes in γ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J Food Sci Technol* 24: 315-319.
- Wang HF, Tsai YS, Lin ML, Ou AS. 2006. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food Chem* 96: 648-653.
- Bai Q, Chai M, Gu Z, Cao X, Li Y, Liu K. 2009. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination. *Food Chem* 116: 152-157.
- Zhang H, Yao HY, Chen F. 2006. Accumulation of γ -aminobutyric acid in rice germ using protease. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1160-1165.
- Cross ML. 2004. Immune-signaling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. *Int J Immunopathol Pharmacol* 17: 127-134.
- Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa K. 2002. Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J Biosci Bioeng* 93: 95-97.
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. 2005. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol* 22: 497-504.
- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J Microbiol Biotechnol* 17: 104-109.
- Lee JH, Seo JH, Park YH, Kim WG, Lim KM, Lee SJ. 2008. The effect of hydroxyproline and Pro-Hyp dipeptide on UV-damaged skin of hairless mice. *Korean J Food Sci Technol* 40: 436-442.
- Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Kim JC, Kwak HG, Hwang BY, Lee HY. 2008. Enhancement of skin immune activation effect of collagen peptides isolated from *Asterias amurensis*. *Korean J Food Sci Technol* 40: 522-527.
- Maffei HV, Nóbrega FJ. 1975. Gastric pH and microflora of normal and diarrhaeic infants. *Gut* 16: 719-726.
- Lorca GL, Raya RR, Taranto MP, de Valdez GF. 1998. Adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol Lett* 20: 239-241.
- Morichi T. 1974. Preservation of lactic acid bacteria by freeze-drying. *Jpn Agric Res Quart* 8: 171-176.
- Park BG, Lee JH, Shin HK, Lee JH, Chang PS. 2006. Optimization of conditions for the double layer microencapsulation of lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 38: 767-772.
- Deeth HC. 1984. Yoghurt and cultured products. *Aust J Dairy Technol* 39: 111-113.
- Dziejak JD. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol* 42(4): 136-151.
- O'Sullivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, Collins JK. 1992. Probiotic bacteria: myth of reality?. *Trends Food Sci Technol* 3: 309-314.
- Lim F, Moss RD. 1981. Microencapsulation of living cells and tissues. *J Pharm Sci* 70: 351-354.
- Champagne CP, Gaudy C, Poncelet D, Neufeld RJ. 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Appl Environ Microbiol* 58: 1429-1434.
- Yoo IK, Seong GH, Chang HN, Park JK. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme Microbiol Technol* 19: 428-433.
- Chang HN, Seong GH, Yoo IK, Park JK, Seo JH. 1996. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnol Bioeng* 51: 157-162.
- Bartkowiak A, Hunkeler D. 2000. Alginate-oligochitosan microcapsules. II. Control of mechanical resistance and permeability of the membrane. *Chem Mater* 12: 206-212.
- Zhang G, Bown AW. 1997. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochem* 44: 1007-1009.
- Choi CY, Kang SK, Park SK, Jang MK, Nah JW. 2007. Preparation and characterization of lactic acid bacteria encapsulated with alginate microsphere. *J Life Sci* 17: 1754-1759.

32. Hassan AN, Frank JF, Farmer MA, Schmidt KA, Shalabi SI. 1995. Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal scanning laser microscopy. *J Dairy Sci* 78: 2624-2628.
33. Kim K, Jang KI, Kim CH, Kim KY. 2002. Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 34: 255-262.
34. Reddy GK, Enwemeka CS. 1996. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 29: 225-229.