(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년10월20일
(11) 등록번호 10-0864399
(24) 등록일자 2008년10월14일

(51) Int. Cl.
A01N 25/04 (2006.01) *A01N 25/00* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0060354
(22) 출원일자 2007년06월20일
심사청구일자 2007년06월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020030025023 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
윤성철
경남 진주시 주약동 현대성우트리팰리스 A동 305호
이미희
경남 진주시 상대2동 한주맨션 나동 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김정민

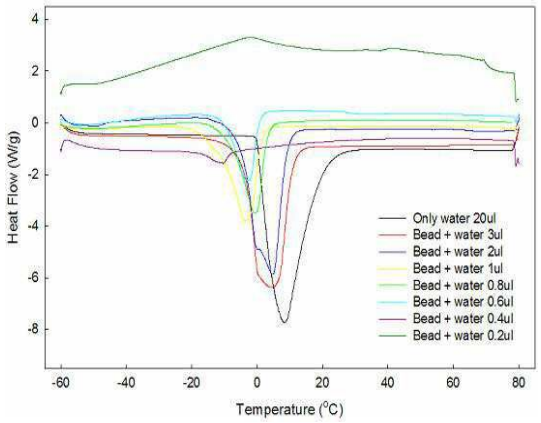
(54) 유용 농업미생물의 내한발성 생존력을 개선시키는 알지네이트 쉘 비드를 이용한 농업용 유용 미생물의 캡슐화 방법

(57) 요 약

본 발명은 유용 농업미생물의 내한발성 생존력을 개선시키는 알지네이트 쉘 비드를 이용한 농업용 유용 미생물의 코팅화 방법에 관한 것으로, 농업용 유용세균 *Serratia plymuthica* A21-4와 *Pseudomonas fluorescens* B16의 캡슐화를 위해 알지네이트-Ca^{2+}가교/다중 양이온(polycation) 층 형성/실리카 코팅 공정으로 속이 빈 알지네이트 쉘(shell) 비드를 제공하여 농업용 유용미생물을 코팅화할 수 있다.

본 발명에 따르면, 알지네이트 겔 안정화를 위해 현재 사용되고 있는 폴리-L-리신을 값이 싸고(16,000배) 환경친화적인 키토산으로 대체할 수 있을 뿐 아니라, *S. plymuthica* A21-4 세균에 대한 탁월한 담지능력, 실온에서 3달 후에도 세균이 아주 높은 생존률을 나타내었다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자
최문환
경남 진주시 신안동 426-4
이소영
경남 창원시 소답동 151-1 리즈트빌라 301호

(56) 선행기술조사문헌
US 05175093 B
US 06261811 B
JP 61181375 A
US0738181 B
KR19950025097 A
KR20030025023 A
KR20070024792 A
Journal of Sol-gel Science and Technology 26(1), pp1151-1157, (2003)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 202147-03-CG000
부처명 농림부
연구사업명 농림기술개발사업
연구과제명 작물생장촉진 및 병 발생억제를 위한 Hydrogel 상토생산기술 개발
주관기관 경상대학교
연구기간 2002년 10월 15일 - 2005년 10월 14일

특허청구의 범위

청구항 1

알지네이트 쉘 비드를 이용하여 농업용 유용 미생물을 캡슐화하는 방법에 있어서,

NaOH 용액에 알긴산을 용해시키고 pH 7.0-7.5로 맞추어 알지네이트 용액을 제조하는 단계;

상기 알지네이트 용액에 농업용 유용 미생물로서 *Serratia plymuthica* A21-4 또는 *Psudomonas fluorescens* B16의 고추 역병 방제균을 부유시키는 단계;

부유시킨 알지네이트 용액을 LC 저압펌프로 $CaCl_2$ 용액 0.1 M에 1 시간 동안 천천히 떨어뜨려 구형 비드를 형성하는 단계;

얻어진 구형 비드를 교반 및 수세하는 단계;

수세된 비드에 키토산을 넣고 교반하여 1차 코팅하는 단계;

코팅된 비드를 실리카 용액으로 교반시켜 2차 코팅하는 단계; 및

얻어진 코팅물을 수세하여 3 ~ 5 ㎜ 직경의 알지네이트/키토산 기반 수화젤을 수득하는 단계; 를 포함하여 이루어지고,

상기 전체 공정은 4℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 유용 농업미생물의 내한발성 생존력을 개선시키는 알지네이트 쉘 비드를 이용한 농업용 유용 미생물의 캡슐화방법

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *Serratia plymuthica* A21-4는 NR 배지에서 콜로니 수가 3×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 *Psudomonas fluorescens* B16는 NR 배지에서 콜로니 수가 2×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 얻어진 수화젤은 동결건조하거나 또는 건조시켜 겔 내의 미생물의 생존력을 증진시키

는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

알지네이트 쉘 비드를 이용하여 농업용 유용 미생물을 캡슐화하는 방법에 있어서,

상기 농업용 유용 미생물로서 *Serratia plymuthica* A21-4 또는 *Psudomonas fluorescens* B16의 고추 역병 방제균을 염화바륨 용액에 섞은 후 알지네이트를 용해시킨 용액에 공기중 분사장치를 이용하여 실린지 펌프 속도 18 ~ 18.6 ml/h 및 4.5 ~ 5.5 LPM AIR의 조건하에 분사하는 단계;

얻어진 수백 마이크론 사이즈 캡슐을 $CaCl_2$ 용액 0.1 M에 1 시간 동안 천천히 떨어뜨려 구형 비드를 형성하는 단계;

얻어진 비드를 교반 및 수세하는 단계:

수세된 비드에 키토산을 넣고 교반하여 1차 코팅시키는 단계;

코팅된 비드를 실리카 용액으로 교반시켜 2차 코팅하는 단계; 및

얻어진 비드를 수세하여 400 ㎛ ~ 1 ㎜ 직경의 알지네이트/키토산 기반 수화젤을 수득하는 단계;를 포함하여 이루어지고,

상기 전체 공정은 4℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 유용 농업미생물의 내한발성 생존력을 개선시키는 알지네이트 쉘 비드를 이용한 농업용 유용 미생물의 캡슐화 방법

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 *Serratia plymuthica* A21-4는 NR 배지에서 콜로니 수가 3×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 *Psudomonas fluorescens* B16는 NR 배지에서 콜로니 수가 2×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 16

제13항에 있어서, 얻어진 수화젤은 동결건조하거나 또는 건조시켜 겔 내의 미생물의 생존력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 유용 농업미생물의 내한발성 생존력을 개선시키는 알지네이트 쉘 비드를 이용한 농업용 유용 미생물의 캡슐화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알지네이트 겔 안정화를 위해 사용되던 폴리-L-리신을 값이 싸고 환경친화적인 키토산으로 대체하였을 뿐 아니라 유용 농업미생물의 내한발성 또한 개선시킨 수화젤의 제공에 관한 것이다.

<10>

<11> 미생물을 제형화할 때 보존기간이 짧아서 상품화하지 못하는 경우 중 대부분은 수분공급을 할 수 없기 때문이다. 이러한 약점을 보완하는데 가장 적합한 재료가 수화젤 (hydrogel)이다.

<12> 특히 생물농약으로 이용하고자 하는 미생물은 식물체 표면에서 상당기간 생존하면서 밀도를 유지해야 하는데 이같은 미생물의 생존에 절대적인 조건은 수분이다. 미생물이 활동할 수 있는 활동도의 물을 지닌 수화젤 네트워크에 미생물을 포함시키고 필요에 따라 유출될 수 있도록 하여 식물의 근권 등에 유지시켜 줄 수 있다면 유용미생물의 활용은 극대화할 수 있다.

<13> 한편, 상기 캡슐화(encapsulation) 기술은 고체입자나 액체 등을 고분자 물질의 막으로 둘러싸거나 코팅하여 특정한 조건하에서 통제된 속도로 방출할 수 있도록 봉인하는 것이다. 미생물을 캡슐화하기 위한 수화젤에 이용될 수 있는 친수성 고분자는 매우 많은 화학적 형태의 것들이 개발되어 있다. 특히, 수용성 고분자(주로 다당류 및 일부 다중전해질 등)의 개발은 거의 무한하다고 생각된다.

<14> 그 중, 지금까지 캡슐화를 위해 가장 많이 사용되고 연구된 소재는 천연고분자 물질인 알지네이트 (alginate)이다. 알지네이트는 β-D-만누론산(mannuronic acid)과 α-L-글루론산 (guluronic acid)의 중합체로 주로 해조류나 박테리아에 의해 생산된다.

<15> 알지네이트를 구성하는 우론산 (uronic acid)들은 말단에 카복실기를 가지므로 음전하를 띤다. 따라서 Mg^{2+},Ca^{2+},Sr^{2+},Ba^{2+}와 같은 2가의 양이온들을 첨가하면 물리적 가교(physical crosslinking)가 형성되므로 도 1에 도시한 바와 같이 수화젤을 만들 수 있다.

<16> 특히, Ca^{2+}양이온에 의한 가교가 가장 잘 형성되므로 Ca^{2+}/알지네이트 겔에 의한 효소 및 세균의 마이크로캡슐화에 관한 연구결과들이 가장 많이 보고되었다.

<17> 이같은 Ca^{2+}/알지네이트 겔이 물리적 가교에 의해 형성되는 만큼 겔을 안정화시키는 것이 매우 중요하다. 이를 위해 다중 양이온성 폴리-L-리신 등 다양한 다중 양이온을 이용한 겔의 안정화가 시도되었다.

<18> 또한 Ca^{2+}/알지네이트 겔과 다중 양이온의 복합체를 한 단계 더 강화시키기 위해 1970년대 말부터 사용되었던 졸겔법을 이용한 실리카 코팅에 관한 연구결과도 많이 발표되었다. 이같은 실리카의 존재는 알지네이트 캡슐의 안정성을 강화시키고 세균 고정에도 크게 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.

<19> 생물학적 환경 정화 (Bioremediation)와 같은 자연환경에서의 생물공정에 캡슐화된 유용미생물들의 이용은 free cell suspension에 비해 많은 장점들을 가지는 것으로 보고되었다. 특히 수화젤 속으로 세균의 캡슐화는 위험한 화합물들의 해로운 효과로부터 세균를 보호하며 생존률과 대사능을 증가시키는 등의 다수의 장점을 제공하므로써, 생물적, 비생물적 스트레스들을 감소시킬 수 있을 것이다.

<20> 그러나 Ca^{2+}/알지네이트 겔에 유용미생물들을 적재 한 후 다중 양이온 및 실리카 처리에 의해 비드 캡슐을 만들어 젖은 상태로 실온에 보관하면 대부분 쉽게 구조가 무너지거나, 유용미생물들이 장기간 생존하지 못한다. 의약품, 미생물, 그리고 많은 식품 및 생물학적 생산물들을 안정화시키기 위해 일반적으로 동결건조 방법을 광범위하게 사용하고 있다. 동결건조된 시료들은 장기간 실온에서 보관하는 분해반응을 최소화할 수 있고 알맞은 물리, 화학, 생물학적 안정성을 지속시킬 수 있는 특징이 있다.

<21> 유용미생물이 캡슐화된 수화젤을 동결건조시킨 후 장기간 보관동안 미생물이 생존하는지 여부는 수화젤 내 물의 상태 및 구조적 속성에 따라 결정된다. 일반적으로 이러한 내재적 물 구조의 특성을 조사하는데는 시차주사 열분석(differential scanning calorimetry, DSC)을 이용한다. DSC는 시료와 불활성 기준물질에 동일한 시간당 열을 가함으로써 시료로부터 발생되는 열의 흐름 차이를 측정하는 것으로, 상변화시(얼음→물) 발생되는 열용량 (heat capacity) 변화를 측정함으로써 물의 상태 및 구조적 속성을 알 수 있다.

<22> 수화젤의 응용은 지금까지 주로 의약학 분야에 응용되어 왔다. 또한 수화젤(주로 유기고분자 형태로서)의 대량 응용은 콘크리트의 구조를 강화하기 위한 보조제로서의 사용이나, 식품의 점성 및 가공식품의 형태보존을 위한 식품에의 첨가 등을 들 수 있다. 또한 최근에는 다당류 수화젤의 박테리아 또는 활성화 슬러지 등의 고

정화를 통한 기름의 분해 및 소재 생산에의 활용을 들 수 있다.

<23> 그러나 농업에의 응용은 국내외를 막론하고 거의 응용 예가 상대적으로 작으나 환경오염 방지, 수자원 보호, 작물의 생산성 향상, 작물의 한발에 의한 피해의 최소화 등의 관점에서 앞으로는 많은 응용이 예상된다.

<24> 한편, 음전하의 알지네이트 비드의 구조적 안정성을 높이기 위하여 현재로서는 양이온성 폴리-L-리신을 이용하고 있으나, 상기 폴리-L-리신이 너무 고가이기 때문에 폴리-L-리신을 대체할 값싸고 성능이 우수한 다른 다중 양이온을 개발하는 데 또한 촛점이 모아지고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<25> 이에 본 발명의 일 목적은 화학적 가교를 하지 않고 천연고분자의 구조적 특성의 물리화학적 성질을 이용하여 친환경적으로 비드를 제공하려는데 있다.

<26> 본 발명의 다른 목적은 얻어진 비드를 이용하여 농업용 유용미생물의 캡슐화 방법을 제공하려는데 있다.

<27> 본 발명의 또 다른 목적은 농작물의 생산성을 높이는 실용적 유용미생물 담지 수화젤 소재를 제공하려는데 있다. 다른 목적은 농작물의 생산성을 높이는 실용적 유용미생물 담지 수화젤 소재를 제공하려는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<28> 본 발명의 제1 견지에 의하면,

<29> 농업용 유용 미생물을 알지네이트에 부유시키는 단계;

<30> 부유시킨 알지네이트를 Ca^{2+}와 물리적 가교하고 구형 비드를 형성하는 단계;

<31> 상기 구형 비드를 키토산으로 1차 코팅하는 단계; 및

<32> 실리카로 2차 코팅하는 단계;를 포함하여 이루어지는 알지네이트 쉘 비드를 이용하여 농업용 유용 미생물을 캡슐화하는 방법이 제공된다.

<33> 본 발명의 제2 견지에 의하면,

<34> 상기 제1 견지에 의해 얻어진 3 ~ 5 ㎜ 직경의 내한발성이 개선된 알지네이트/키토산 기반 수화젤이 제공된다.

<35> 본 발명의 제3 견지에 의하면,

<36> 상기 제1 견지에 의해 얻어진 400 ㎛ ~ 1 ㎜ 직경의 내한발성이 개선된 알지네이트/키토산 기반 수화젤이 제공된다.

<37> 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

<38> 본 발명에서는 천연고분자 다당류를 이용해 고추병 방역에 유용한 농업용 유용 미생물 *Serratia plymuthica* A21-4와 *Psudomonas fluorescence* B16의 캡슐화를 시도하고 농작물의 생산성을 높이는 실용적 유용미생물 담지 수화젤 소재를 제공한다.

<39> 이를 위해 천연고분자를 알지네이트로 선발하고 Ca^{2+}와의 물리적 가교, 다층 프로세스, 그리고 실리카 코팅에 의하여 알지네이트 쉘 비드를 제조한다.

<40> 이들 쉘 비드 제조방법에 대하여 보다 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

<41> 우선, 농업용 유용 세균을 알지네이트에 부유시킨다. 이때 농업용 유용 세균은 이에 한정하는 것은 아니나, *Serratia plymuthica* A21-4 또는 *Psudomonas fluorescens* B16로 이루어지는 고추 역병 방제균을 사용하는 것이 바람직하다.

<42> 이때 *Serratia plymuthica* A21-4는 NR 배지(Nutrient rich medium)(1% 효모 추출물, 1.5% 뉴트리언트 브로쓰 및 0.2% 황산 암모늄 함유)에서 콜로니 수가 3×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것이 보다 바람직하며, *Psudomonas fluorescens* B16는 NR 배지에서 콜로니 수가 2×10^9 CFU/ml 되도록 배양하여 사용하는 것

이 보다 바람직하다.

<43> 부유시킨 알지네이트를 Ca^{2+}와 물리적 가교하고 구형 비드를 형성하게 된다. 구체적으로는 NaOH 용액에 알긴산을 용해시키고 pH 7.0-7.5로 맞추어 알지네이트 용액을 제조한 다음 상기 알지네이트 용액을 LC 저압펌프로 $CaCl_2$ 용액에 천천히 떨어뜨려 구형 비드를 형성하게 된다.

<44> 얻어진 구형 비드를 교반 및 수세하고, 다중 양이온 코팅 물질로서 키토산을 넣고 교반하여 1차 코팅한다. 이어서 코팅된 비드를 실리카와 반응시켜 2차 코팅하고 수세한다. 이때 형성되는 알지네이트 겔은 제조 온도에 따라 수분함량에 있어 특별한 차이를 보이지는 않으나 4℃에서 제조된 알지네이트 겔이 기계적으로 더 안정하므로 알지네이트 겔을 만드는 전체 반응 온도는 4℃의 온도 범위내에서 수행하는 것이 바람직하다.

<45>

<46> 이같이 하여 3 ~ 5 ㎜ 직경의 알지네이트/키토산 기반 수화젤을 제조할 수 있다. 제조된 수화젤은 동결 건조하거나 또는 건조시켜 겔 내의 미생물의 생존력을 증진시키는 것이 바람직하다.

<47> 이같이 제조한 비드의 직경 크기가 약 3 ~ 5 ㎜로서 pot에 사용하는 수화젤 제형에서는 문제가 없으나 엽면 살포 등과 같은 포장용으로는 크기가 너무 커서 식물체에 점착이 어려울 수 있다. 이에 비드 크기를 수십 ~ 수백 마이크론 수준으로 작게 만들 필요성이 있으며, 이같은 소직경의 수화젤을 제조하기 위한 방법은 다음과 같다.

<48> 즉, 상술한 유용 미생물을 염화바륨 용액에 섞은 후 공기 중 분사장치(air driven spray system)를 이용하여 알지네이트를 용해시킨 용액에 분사함으로써 구형 비드를 만든다. 공기 중 분사장치의 실린지 펌프 속도는 18 ~ 18.6 ml/h 되도록 하고 기압은 4.5 ~ 5.5 LPM AIR 되도록 한다. 이때 속도가 작고 기압이 높을수록 분사되는 방울의 크기가 작아지나, 상기 펌프 속도보다 작아지면 부유되는 유용 미생물이 감소하고 형태가 균일하지 못한 캡슐이 만들어 질 수 있다.

<49> 이같이 하여 얻어진 수백 마이크론 사이즈 캡슐을 $CaCl_2$ 용액에 천천히 떨어뜨려 구형 비드를 형성하고, 교반 및 수세한 다음 키토산을 넣고 교반하여 1차 코팅시킨다.

<50> 코팅된 비드를 실리카와 반응시켜 2차 코팅하고, 수세하여 400 ㎛ ~ 1 ㎜ 직경의 알지네이트/키토산 기반 수화젤을 제조할 수 있다.

<51> 이때 전체 반응 온도는 상기 3 ~ 5 ㎜ 직경의 알지네이트/키토산 기반 수화젤을 제조할 때와 같은 이유로 4℃의 온도 범위내에서 수행하는 것이 바람직하다.

<52> 또한, 얻어진 수화젤은 동결 건조하거나 또는 건조시켜 겔 내의 미생물의 생존력을 증진시키는 것이 바람직하다.

<53> 한편, 후술하는 실시예를 통해 상기와 같은 공정에 대한 모델링 및 최적화 실험을 수행하였으며, 알지네이트 비드의 세균의 생존력과 관계된 생물물리화적 특성을 수분함량, 전자 현미경, DSC 분석 등을 통해 규명하였다. 그 결과 다음과 같은 사항들을 확인할 수 있었다:

<54> 첫째, 농업용 유용 미생물 *Serratia plymuthica* A21-4와 *Pseudomonas fluorescens* B16의 캡슐화를 위해 알지네이트-Ca^{2+}가교/다중 양이온 층 형성/실리카 코팅 공정으로 속이 빈 3 ~ 5 ㎜ 알지네이트 쉘 비드를 만들었다. 특히 문헌상의 알지네이트 겔 안정화를 위해 현재 사용되고 있는 폴리-L-리신을 값이 싸고(16,000배) 환경친화적인 키토산으로 대체시키는 공정을 성공적으로 개발하였다.

<55> 둘째, *S. plymuthica* A21-4 캡슐화된 3~ 5 ㎜ 알지네이트 비드는 대체로 둥근 형태이며 내부는 상당히 다공성이며 또한 대부분의 공간이 서로 연결되어 있었다. 알지네이트 비드의 *S. plymuthica* A21-4 세균에 대한 탁월한 담지능력도 이러한 비드 내의 층상구조와 연관된 것으로 추정된다(도 4 및 6 참조).

<56> 셋째, 제조된 키토산기반 *S. plymuthica* A21-4 알지네이트 겔 비드를 동결건조 후, 실온에서 3 달 후에도 세균이 아주 높은 생존률을 나타내는 것으로 보아 알지네이트 겔 매트릭스가 *Serratia* 세균의 좋은 보호막을 제공한다는 것을 입증해준다(도 7 내지 9 참조).

<57>

<58> 넷째, 동결건조한 알지네이트 겔 비드의 내재적 물의 상태 및 구조적 속성을 분석하기 위한 DSC 실험결

과, 비드의 약 1.5배 정도가 결합수 "bound water"인 것을 확인하였다. 이들 결합수는 알지네이트 겔의 존재로 인해 생긴 것이기 때문에 동결과정 중의 *S. plymuthica* A21-4의 생존에 매우 중요한 역할을 하였다고 생각된다(도 7 내지 9).

<59> <실시예>

<60> 이하, 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 구체적으로 기술하였다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하고자 하는 것으로 본 발명을 이에 한정하려는 것은 아니다.

<61> **<키토산-코팅 기반 마이크로캡슐화를 위한 3 ~ 5 ㎜ 알지네이트 쉘 비드 만들기를 위한 모델링 및 최적화 실험>**

<62> **비교예**

<63> 도 2에 도시한 바와 같이, Coradin et al., (Chem. Commun., 2001, 2496-2497)에 의한 알긴산의 Ca^{2+} 가교/폴리-L-리신 층 형성/실리카 코팅/시트레이트 유도 알지네이트 제거에 의한 속이 빈 캡슐 형성 방법으로 세균의 캡슐화를 시도하였었다.

<64> 그러나 해당 공정으로는 동결건조 등과 같은 후속 공정에서 안정성이 떨어졌다.

<65> 이에 Coradin의 원래 공정중 시트레이트 공정을 빼고, 층 형성 물질을 값이 싼 키토산으로 대체시키는데 착안하여 하기 실시예를 진행하였다.

<66> **실시예 1-제조**

<67> 알지네이트 용액을 0.06 M NaOH 용액에 알긴산 (Sigma)를 1.5 wt/v% 농도로 녹인 뒤 pH 7.5로 맞추어 제조하였다. 얻어진 알지네이트 용액 10 ㎖을 200 ㎕ 황색 팁을 이용하여 LC 저압펌프(Gilson M312)로 0.1 M $CaCl_2$ 용액 100 ㎖에 천천히 떨어뜨리면 구형 비드가 형성되었다. 이것을 1 시간동안 4℃에서 교반한 다음 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 2회 세척하였다.

<68>

<69> 그런 다음 도 3에 도시한 바와 같이, 다중 양이온 코팅 물질로서 0.01 wt/v% 폴리-L-리신 또는 0.1 wt/v% 폴리에틸렌아민(PEI) 또는 0.01 wt/v% 키토산을 각각 넣어 30 분동안 교반하여 비드를 일차적으로 코팅시켰다.

<70> 얻어진 알지네이트/다중 양이온 캡슐의 기계적 물성을 향상시키기 위해서 0.01 M 소디움 실리케이트 용액에 2 시간동안 반응시켜 캡슐을 재차 코팅한 뒤 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 2회 수세하였다.

<71> **<실시예 2-$CaCl_2$ 농도별 및 반응시간별 알지네이트 비드 중의 수분량 측정>**

<72> **1) Ca^{2+} 농도 및 Ca^{2+} 의 반응 시간에 따른 캡슐의 수분함량%**

<73> 알지네이트 겔에서 Ca^{2+}는 물리적 가교제(physical crosslinks)로 역할하기 때문에 그 상대적인 농도의 변화는 가교 밀도를 조절할 것으로 기대되는 바, 본 실시예에서는 Ca^{2+} 농도에 따라 만들어진 캡슐의 수분을 측정하여 가교 밀도를 조절하는지 여부를 확인하였다.

<74> 실시예 1에서 제조된 캡슐의 수분량을 측정하기 위해, 적정크기로 자른 여과지(Advantec)를 진공 오븐에 24 시간 동안 넣어 건조한 후 무게를 재고, 4℃에서 만든 캡슐을 여과지 위에 얹어 무게를 재어 건조하기 전의 캡슐의 무게(Wt(wet))를 측정하였다. 다시 진공 오븐에서 24 시간 동안 캡슐을 얹은 여과지를 완전히 건조시킨 후, 건조한 뒤의 캡슐의 무게(Wt(dry))를 잰 다음 하기 수학식 1에서와 같이, 건조 전 캡슐의 무게에서 건조 뒤 캡슐 무게를 빼주어 캡슐의 수분량을 측정하였다.

수학식 1

<75> $[\{Wt(wet) - Wt(dry)\}/Wt(wet)] \times 100$ = 캡슐의 수분량 %

<76> Ca^{2+} 농도 및 캡슐 제조온도별 얻어진 캡슐의 수분함량(%) 결과를 하기표 1에 함께 정리하였다.

표 1a

<77> 실온(25℃)

	1차	2차
0.05 M $CaCl_2$	94.9 %	96.3 %
0.1 M $CaCl_2$	98.9 %	97.3 %
0.15 M $CaCl_2$	96.0 %	98.3 %
0.2 M $CaCl_2$	97.2 %	97.3 %
	1차	2차
0.1 M $CaCl_2$	97.2 %	98.6 %
0.2 M $CaCl_2$	98.7 %	97.6 %

표 1b

<78> 4℃

	1차	2차
0.1 M $CaCl_2$	97.2 %	98.6 %
0.2 M $CaCl_2$	98.7 %	97.6 %

<79> 상기표 1a 및 1b에서 보듯이, 알지네이트 겔은 오차범위내에서 Ca^{2+} 농도 및 캡슐 제조온도에 따라 특별한 차이를 보이지 않았다. 그러나 4℃에서 제조된 겔보다 실온에서 제조된 겔은 건들기만 하더라도 쉽게 구조가 무너지므로, 4℃에서 제조된 알지네이트 겔이 기계적으로 더 안정된 것으로 판단되었기 때문에 4℃에서의 칼슘 농도 및 반응 시간에 따른 수분함량(%) 실험을 수행하고, 그 결과를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2a

<80> 4℃

	1hr
0.1 M $CaCl_2$	92.0 %
0.2 M $CaCl_2$	98.2 %
0.4 M $CaCl_2$	95.9 %

표 2b

<81> 4℃

	0.1 M $CaCl_2$
1hr	94.4%
2hr	92.0 %
3hr	93.2 %
4hr	96.2%

<82> 상기표 2에서 보듯이, 알지네이트 겔은 오차 범위내에서 Ca^{2+} 농도 및 반응시간에 따라 특별한 차이를 보이지 않았으며, Ca^{2+} 농도 및 시간에 따른 최적화에서 기계적 강도 등에도 큰 차이를 보이지 않았으므로, 0.1 M $CaCl_2$, 1 시간을 최적 반응조건으로 결정하였다.

<83> **<실시예 3- 유용세균의 캡슐화 및 세균의 개체수 측정>**

<84> 유용세균으로는 고추역병 방제균으로 다음 두 균주를 선정하였다.

<85> 1) 균주 : *Serratia plymuthica* A21-4

<86> 영양분이 풍부한 NR 배지에서 세균을 30℃, 12시간 배양한 뒤, 원심분리(8,700g, 30min)하여 회수한 세균(3×10^9 CFU/ml)를 알지네이트 용액에 부유시켜 비드를 만듦으로써 세균을 캡슐에 적재하였다.

<87> 2) 균주 : *Pseudomonas fluorescens* B16

<88> 영양분이 풍부한 NR 배지에서 세균을 30℃, 12시간 배양한 뒤, 원심분리(8,700g, 30min)하여 회수한 세균(2×10^9 CFU/ml)를 캡슐에 적재하는데 사용하였다. 단, 세균외의 EPS와 같은 물질이 포함되어 있어 PBS buffer로 두 번 수세하여 세균만을 순수하게 분리한 뒤 사용하였다.

<89> 3) *S. plymuthica* 세균의 여러 가지 물리적 인자에 의한 생존률 조사

<90> 상기 *Serratia plymuthica* A21-4 세균을 알지네이트 수화젤 비드에 적재, 동결건조하기 전에 해당 세균의 관련 물리화학적 스트레스 인자에 생존률이 어떻게 변하는지를 먼저 조사하였다.

<91>

<92> 즉, 알지네이트 자체의 적재 농도에서의 생존율에의 영향 및 배양 세균 자체가 동결건조 조건하에서 얼마나 살아 남을 수 있는지를 조사하였다.

<93> ① *S. plymuthica* 와 알지네이트 용액(pH 7.5)을 1:1로 부유시켰을때 생존하는 개체수 (대조군, 알지네이트 고분자 자체에 의한 영향)

<94> *S. plymuthica* NR 배양액 400 ㎕를 수확하여 알지네이트 용액(pH 7.5) 400㎕에 실온에서 1 시간 부유시킨후 spreading하여 군체 수를 측정하였다. 얻어진 콜로니 수는 3.0×10^8 ~ 8.0×10^9 CFU/ml로서 예상대로 큰 영향이 없었다.

<95> ② *S. plymuthica* 배양액 자체를 동결건조시 생존하는 개체수(대조 개체수)

<96> *S. plymuthica*를 NR배지에서 12 시간 배양한 뒤, 회수한 배양액을 일반냉동고(-20℃)에서 약 5 시간 1차 얼린후 Deep Freezer (-70℃)에서 24 시간 얼렸다. 얼린 시료를 Eyla 동결 건조기 (FD-1000, GCD-051X pump)에서 동결건조 (Eyla freeze drier, 24 h to 48 h) 하였다. 참고로, 이후의 동결건조 실험은 모두 동일한 조건에서 수행하였다.

<97> 동결건조한 세균을 PBS buffer에 24 시간 동안 넣어둔 뒤 spreading하여 군체 수를 측정하였다. 동결건조된 *S. plymuthica*의 생존하는 개체수는 1×10^2 ~ 1×10^3 CFU/ml로서 세균이 심한 동해손상을 입어 대부분 죽는 것으로 판명되었다.

<98> 4) *S. plymuthica* 적재을 위한 다중 양이온들에 대한 pH 최적화

<99> 알지네이트 중합체는 측쇄에 카복실기를 가지고 있어 녹인 수용액의 pH는 약 4 정도이다. 그러나 *Serratia plymuthica* A21-4의 최적 성장 pH는 7이었다. 이에 pH에 따른 알지네이트 겔 제조의 최적화를 실시하였다.

<100> 이때 기존의 동물세균의 캡슐화에서 주로 사용하던 알지네이트 겔 안정화제인 폴리-L-리신은 너무 고가여서 농업소재로 사용하는 것은 불가능하다고 판단하였고, 폴리-L-리신의 대체 양이온성 폴리머로서 폴리에틸렌이민 (3000 배 저렴함)과 키토산 (16,000 배 저렴함)을 1차로 선발하였다.

<101> 상술한 세 종류의 다중 양이온을 이용하여 *S. plymuthica* 적재된 알지네이트를 제조하고 여러 가지 특성을 비교하였다.

<102> 우선, *S. plymuthica* NR 배양액 400 ㎕를 수확하여 pH 4.0 알지네이트 용액과 pH 7.5 알지네이트 용액 (10 N NaOH로 pH 조절) 400 ㎕ 각각에 부유시켰다. 이것을 200 ㎕ 황색 팁을 이용한 LC 저압펌프(Gilson M312)에 의해 0.1 M $CaCl_2$용액 4 ml에 떨어뜨려 1 시간동안 교반한 다음 0.05 M Tris-HCl buffer(pH7.2)로 수세하고, 0.01 % 폴리-L-리신 또는 0.1 wt/v% 폴리에틸렌이민 또는 0.01 wt/v% 키토산 2 ml를 각각 넣어 30 분 반응

시켰다.

<103> Tris-HCl buffer(pH7.2)로 두 번 수세하고 0.01 M 소디움 실리케이트 용액 2 ㎖넣어 2 시간동안 반응시키고, Tris-HCl buffer(pH7.2)로 두 번 수세하였다.

<104> 이렇게 완성된 비드를 동결건조하여 실온에서 방치한 시간(0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h)에 따른 세균의 생존율을 측정하기 위해 비드를 기계적으로 파쇄, spreading하여 군체 수를 측정하고 pH와 다중 양이온 종류에 따른 알지네이트 캡슐내의 *S. plymuthica* cell의 생존력 결과를 하기표 3에 나타내었다.

표 3a

<105> 알지네이트/폴리-L-리신/실리케이트

	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
pH 4	1.47×10^7 CFU/㎖	5.49×10^7 CFU/㎖	2.01×10^7 CFU/㎖	1.54×10^7 CFU/㎖	2.37×10^7 CFU/㎖	3.24×10^7 CFU/㎖
pH 7.5	7.98×10^8 CFU/㎖	1.84×10^8 CFU/㎖	4.52×10^8 CFU/㎖	2.69×10^8 CFU/㎖	3.71×10^8 CFU/㎖	1.38×10^8 CFU/㎖

표 3b

<106> 알지네이트/폴리에틸렌이민/실리케이트

	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
pH 4	2.53×10^7 CFU/㎖	4.3×10^7 CFU/㎖	1.18×10^7 CFU/㎖	2.11×10^7 CFU/㎖	1.07×10^7 CFU/㎖	1.53×10^7 CFU/㎖
pH 7.5	2.53×10^8 CFU/㎖	1.75×10^8 CFU/㎖	3.24×10^8 CFU/㎖	2.07×10^8 CFU/㎖	2.82×10^8 CFU/㎖	1.09×10^8 CFU/㎖

표 3c

<107> 알지네이트/키토산/실리케이트

	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
pH 4	1.82×10^7 CFU/㎖	5.46×10^7 CFU/㎖	1.79×10^7 CFU/㎖	1.2×10^7 CFU/㎖	2.3×10^7 CFU/㎖	1.60×10^7 CFU/㎖
pH 7.5	3.68×10^8 CFU/㎖	$1.3\ 2\times 10^8$ CFU/㎖	1.83×10^8 CFU/㎖	3.25×10^8 CFU/㎖	1.09×10^8 CFU/㎖	1.67×10^8 CFU/㎖

<108> 상기표에서 보듯이, 3가지 다중 양이온 모두에 대해서 pH 7에서 *S. plymuthica* 균체의 생존율이 가장 높았다. 또한 값이 가장 싼 키토산이 다른 두 다중 양이온에 비해 생존율 및 구조적 안정성에서 좋은 결과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 특히 폴리에틸렌이민 합성물질은 난분해성이기 때문에 생분해성인 키토산이 알지네이트 겔의 안정화제로서는 경제적이고 환경친화적이라고 결론지었다.

<109> 5) *S. plymuthica* cell의 알지네이트 비드에서의 담지능 조사

<110> 상기 4) 단락에서 제조된 키토산기반 *S. plymuthica* 알지네이트-겔 비드를 Tris-HCl buffer(pH7.2)로 두 번 수세한 후, 신선한 Tris-HCl buffer(pH7.2)에 2 일 간 담궈놓은 (체적 비= 습한 겔 30 : buffer 70) 후 spreading하여 겔 비드가 buffer에서 담가있는 상태에서 담지하고 있는 균체 수를 측정하였다.

<111> buffer층과 비드내 각각의 생존 개체수를 알지네이트 비드가 Tris-HCl buffer(pH7.2)에 48 h 담궈져 있을때 비드의 *S. plymuthica* cell에 대한 담지능력으로 측정하고, 하기표 4에 정리하였다.

표 4

<112>

	S. plymuthica
Buffer 층	5.00×10^5 ~ 2.38×10^6
비드 내	4.14×10^8

<113> 상기표 4에서 보듯이, 습한 겔을 buffer에 이틀간 담가 두어도 알지네이트 비드 내 세균의 개체수는 48 시간내에는 크게 변화하지 않는 것을 알 수 있다. 이로부터 알지네이트 겔의 *S. plymuthica* 세균에 대한 담지능력이 탁월함을 알 수 있다. 또한, 알지네이트 비드로부터의 세균의 방출은 매우 천천히 일어남을 유추해볼 수 있다.

<114> 한편, 그람음성 *S. plymuthica* 역시 본 연구에서 만든 비드내의 층상구조인 알지네이트 내부 층면에 점착되어 있을 것으로 추정되며, 도 6에서도 확인할 수 있었다.

<115>

<116> 6) *S. plymuthica*와 *P. fluorescens* 의 상대적 캡슐화 및 생존율 비교

<117> 본 실시예에서는 유용세균으로서 *S. plymuthica* A21-4와 *P. fluorescens* B16을 각각 선택하였다.

<118> 즉, 상술한 바와 같이, 2가지 세균을 상술한 3가지 종류의 다중 양이온을 이용하여 알지네이트 비드를 만들고, 실온에서 공기중에 방치한 다음, 방치 시간(0 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 120 hr)에 따른 생존율을 측정하기 위해 캡슐을 멸균증류수에 24시간 동안 넣어둔 뒤, 파쇄 후 spreading하여 군체 수를 측정하였으며, 다중 양이온 종류에 따른 *S. plymuthica*와 *P. fluorescens*의 상대적 캡슐화 및 생존율 비교 결과를 하기 표 5에 정리하였다.

표 5a

<119> 알지네이트/폴리-L-리신/실리케이트

경과시간	0.1 M $CaCl_2$	
	S. plymythica	*P. fluorescens*
0 hr	7.98×10^8 CFU/mℓ	4.56×10^6 CFU/mℓ
24 hr	2.84×10^8 CFU/mℓ	2.04×10^6 CFU/mℓ
48 hr	4.52×10^8 CFU/mℓ	6.29×10^6 CFU/mℓ
72 hr	2.69×10^8 CFU/mℓ	-
96 hr	3.71×10^8 CFU/mℓ	-
120 hr	1.38×10^8 CFU/mℓ	-

표 5b

<120> 알지네이트/폴리에틸렌이민/실리케이트

경과시간	0.1 M $CaCl_2$	
	S. plymythica	*P. fluorescens*
0 hr	2.53×10^8 CFU/mℓ	3.42×10^6 CFU/mℓ
24 hr	1.75×10^8 CFU/mℓ	1.03×10^6 CFU/mℓ
48 hr	3.24×10^8 CFU/mℓ	2.78×10^6 CFU/mℓ

72 hr	2.07 × 10^8 CFU/mℓ	-
96 hr	2.82 × 10^8 CFU/mℓ	-
120 hr	1.09 × 10^8 CFU/mℓ	-

표 5c

<121> 알지네이트/키토산/실리케이트

경과시간	0.1 M $CaCl_2$	
	S. plymythica	*P. fluorescens*
0 hr	3.68 × 10^8 CFU/mℓ	2.07 × 10^6 CFU/mℓ
24 hr	1.32 × 10^8 CFU/mℓ	1.28 × 10^6 CFU/mℓ
48 hr	1.83 × 10^8 CFU/mℓ	2.62 × 10^6 CFU/mℓ
72 hr	3.25 × 10^8 CFU/mℓ	-
96 hr	1.09 × 10^8 CFU/mℓ	-
120 hr	1.67 × 10^8 CFU/mℓ	-

<122> 상기표 5에서 보듯이, 두 그람음성 세균사이에 적재율 및 생존시간이 매우 차이가 남을 알 수 있다. 즉, *S. plymuthica*는 120 시간내에는 생존율에 큰 변화가 없는 반면, *P. fluorescens*는 72 시간 후에는 생존하지 못함을 보여준다. 이로부터 2가지 세균 중 *P. fluorescens*가 내한발성이 더욱 약함을 확인할 수 있었다.

<123> 따라서 본 발명의 동결건조를 통한 캡슐화된 알지네이트 겔의 제조 및 농작물 묘목 및 field 연구에는 *S. plymuthica* A21-4에 한정하였다.

<124> 7) 캡슐화한지 3 달 후 생존하는 *S. plymuthica* A21-4 개체수

<125> 상기 실험 6)에서 제조된 키토산기반 *S. plymuthica* 알지네이트 겔 비드를 동결건조후 Falcon 튜브에 3 개월간 보관 후 생균수를 측정하기 위해 캡슐을 멸균증류수에 24 시간 동안 넣어둔 뒤, 파쇄 후 spreading하여 군체 수를 측정하였다.

<126> 그 결과, 1.0 × 10^5 ~ 1.1 ×10^7 CFU/ml인 것으로, 초기 ~10^8에 비해 약간 떨어지긴 하지만 3 달 후에도 세균이 비교적 아주 높은 생존률을 나타내는 것으로 보아 알지네이트 겔 매트릭스가 *Serratia* 세균의 좋은 보호막 (protection during storage)을 제공한다는 것을 입증하였다.

<127> 8) *S. plymuthica* A21-4 encapsulated 3 ~ 5 ㎜ 알지네이트 비드의 구조적 속성

<128> 200 ㎕ 황색 팁을 이용한 LC 저압펌프 사출법으로 만든 겔 비드를 동결건조한 후 금 코팅시켜 전자현미경으로 morphology를 관찰하였다. 단면 사진촬영을 위해서는 동결건조시료를 액체질소로 다시 응고시킨 후 나이프로 자른 후 SEM 관측을 수행하고 도 4에 나타내었다.

<129> 도 4에서 보듯이, 알지네이트 비드의 구조적 특성은 대체로 둥근형태(~0.5 ㎜ 직경)이며, 내부는 상당히 다공성이며 또한 대부분의 공간이 서로 연결되어있는 것으로 보인다. 전체적 구형구조는 사용한 다중 양이온별로 큰 차이가 없었으나, 내부 공간 구조는 사용한 다중 양이온의 유형 및 세균의 적재 여부에 따라 매우 다름을 확인할 수 있었다.

<130> 그중에서도 세균이 적재된 키토산 다중 양이온을 사용한 경우가 구조적 치밀성이 가장 떨어진 편이었다. 이는 세균을 알지네이트 중합체 1.5 wt/v% 용액에 부유시켜 비드 형성시 어느정도의 응집이 일어나고 이것이 동결건조과정에서 많은 공극을 유도했을 것으로 여겨진다.

<131> **<실시예 4-키토산-코팅 기반 마이크로캡슐화에 의한 수백 ㎛ ~ 1 ㎜ 알지네이트 쉘 마이크로비드 제조 (압축 공기를 동력으로 하는 분사 시스템 이용)>**

<132> 상술한 200 ㎕ 황색 팁/저압펌프 방법으로 만든 비드는 크기가 약 3 ~ 5 ㎜로서 pot에 사용하는 수화

겔 제형에서는 문제가 없으나 엽면 살포 등과 같은 포장용으로는 크기가 너무 커서 식물체에 점착이 어려울 수 있다.

<133> 이에 비드 크기를 수십 ~ 수백 마이크론 수준으로 작게 만들 필요성이 있어, 압축공기를 이용한 알지네이트 용액의 공기중 분사장치를 이용하여 비교적 크기가 수백마이크론까지 작아진 알지네이트 비드를 만드는 방법에 대하여 후술한다.

<134> 1) 수백마이크론 *Serratia* 적재된 알지네이트 비드의 제조 및 특성

<135> 도 8에 도시한 바와 같이, PVA 9 g과 바륨 클로라이드 1.5 g 을 DW 100 ㎖에 녹여 멸균한 것을 PBS buffer와 *S. plymuthica*를 2:1:1로 섞은 4 ㎖을 알긴산 5.5 g를 DW 1 ℓ에 녹인 용액 150㎖에 실린지 펌프 속도 18 ~ 18.6 ml/h로 흘려보내주고, 4.5 ~ 5.5 LPM AIR(flow 속도가 작고 기압이 높을수록 떨어지는 방울의 크기가 작아짐) 기압으로 떨어뜨려 구형 비드를 만들어주었다.

<136> 그러나, 이 캡슐은 바로 소디움 클로라이드(9%) 용액으로 수세하여야만 응집되지 않을 뿐 아니라 얻어진 세균 적재된 비드는 부피를 줄이기 위한 동결건조 과정에서 비드 사이에 서로 엉키고, 또한 세균가 대부분 죽는 것으로 판명되었다.

<137> 이에 상기 마이크론 비드의 구조적 안정화 및 세균의 생존율을 높이기 위하여 $CaCl_2$/키토산/실리케이트 방법을 추가로 공정에 첨가함으로써 알지네이트 비드의 안정화를 시도하였다.

<138> 즉, 도 8에서 얻어진 수백 마이크론 사이즈 캡슐을 0.1 M $CaCl_2$ 용액 100 ㎖에 천천히 떨어뜨려 구형 비드가 형성되었다. 이것을 1시간동안 4℃에서 교반한 뒤 0.05 M Tris-HCl buffer(pH7.2)로 두 번 수세하였다.

<139> 그런 다음 0.01 wt/v% 키토산을 각각 넣어 30 분동안 교반하여 비드를 키토산 코팅시켰다.

<140> 앞서와 마찬가지로 알지네이트/키토산 캡슐의 기계적 물성을 향상시키기 위해서 0.01 M 소디움 실리케이트 용액에 2 시간동안 반응시켜 이 캡슐을 한번 더 실리케이트 코팅한 뒤 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 두 번 수세하였다.

<141> 마이크론 알지네이트 비드의 특성

<142> 생균수를 측정하기 위해 공기 분사 시스템/추가 표면처리 공정으로 만든 캡슐을 멸균 증류수에 24 시간 동안 넣어둔 뒤, 파쇄 후 spreading하여 군체 수를 측정하였다.

<143> ① 생존하는 개체수 : 2.75×10^8 CFU/ml

<144> ② 비드의 크기 : 400 ㎛ ~ 1 ㎜

<145> ③ 공기 분사 시스템으로 만든 캡슐율 원래 방법대로 다시 코팅한 비드를 쿠마시 블루 염색 후 현미경으로 관찰하고 그 결과를 도 6a에 도시하였다.

<146> 상기 현미경 관찰에서 보듯이, 팽윤 상태에서 구조가 구형이고 크기는 약 400 ㎛ 임을 알 수 있다. 그러나 해당 알지네이트 비드를 동결건조한 후의 전자현미경 사진에 해당하는 도 6b를 보면 ~500 ㎛ 직경의 작은 잎사귀 타입인 것을 알 수 있다.

<147> 특이한 것은 팽윤 상태에서의 구형지름 역시 ~ 500 ㎛인데 팽윤이 일어나는 형태가 특정 방향으로만 일어난다는 것을 알 수 있는데 그 정확한 구조적 속성을 차기에 조사할 필요가 있다고 판단된다.

<148> 그러나 200 ㎕ 황색 팁을 이용한 LC 저압펌프 사출법으로 만든 겔 비드의 전자현미경 단면은 내부가 여러 층으로 구성되어있으나, 공기 분사 시스템으로 만든 겔 비드의 구조는 마치 unoccupied 쉘 타입 비드일 것으로 추정된다. 또한 공기 분사 시스템으로 만든 비드가 추가 안정화 공정이 필요했던 것도 쉘-타입의 구조를 반영하는지도 모른다.

<149> **<실시예 5-알지네이트 겔s 내의 물의 구조적 특성에 관한 물리화학적 연구>**

<150> 한편, 도 6은 알지네이트 겔 내의 물의 구조적 특성에 관한 물리화학적 연구 (Differential Scanning Calorimetry 연구)에 관한 것이다. 즉, 세균는 약 60~70wt%의 물로 이루어져 있다. 또한 여기에서 세균의 캡슐화 매트릭스로 사용하는 소재 또한 Ca^{2+} 교차결합된 알지네이트 수화젤로써 수분함량이 95 ~ 99%에 이른다. 따라서 물의 상태 및 구조적 속성에 따라 bacterial 세균의 삶과 죽음이 결정된다고 할 수 있다.

<151> 따라서 내재적 물 구조의 세균의 생존력에 대한 영향을 시차 주사 열분석 열전이 측정 (얼음의 녹는점) 기술을 이용하여 조사하였다.

<152> 1) 동결건조된 *S. plymuthica* 적재된 캡슐의 수분함량 wt%

<153> 앞에서의 조건으로 동결건조한 약 10 mg 캡슐을 e-tube에 넣고 진공 오븐에 넣어 50℃에서 24 및 48 hr 동안 건조한 후 무게를 재어, 동결건조 캡슐이 포함하고 있는 수분 wt% 함량을 하기 수학식 2에 근거하여 측정하였다.

수학식 2

<154> [{Wt(동결 건조)-Wt(진공 건조)}/Wt(동결 건조)] X 100 = 캡슐 중의 수분 함량 wt%

<155> 얻어진 결과를 하기표 6에 정리하였다.

표 6

<156> 동결건조 알지네이트 비드 중의 잔여 수분함량 wt%

	24 h	48 h
알지네이트 비드 중의 수분 함량	10wt%	10wt%

<157> 2) 동결건조된 *S. plymuthica* 적재된 키토산기반 비드의 Differential Scanning Calorimetry (DSC) 연구

<158> 동결건조한 0.2 ~ 0.3 mg *S. plymuthica* 적재된 비드를 DSC 샘플 팬에 넣은 후, 증류수 0.2㎕, 0.4㎕, 0.6㎕, 0.8㎕, 1㎕, 2㎕, 3㎕를 각 팬에 넣고 바로 밀봉한 다음 24 hr 실온에서 정치 후 실험에 사용하였다.

<159> 이때 0.2 ~ 0.3 mg 정도로 비교적 일정한 무게의 비드만을 골라서 실험하였다.

<160> DSC (모델 DSC Q10)기기의 참조 셀에는 밀봉된 빈 팬을 넣고, 시료 팬은 샘플 cell에 올려놓고, 온도 -60℃에서 정치한 후 10℃/min의 scan 속도로 실험하였다. 얼음이 녹기 시작하는 onset T 및 Tm (피크 온도)는 기기의 standard software를 이용하여 구하였다.

<161> 0.2 mg 비드에 물을 0.2 ㎕로 팽윤시키면 얼음에 의한 용융 흡열온도이 나타나지 않았다. 그러나 물의 양을 0.4 ㎕로 늘리면 -10℃근처에서 용융 흡열온도이 보이기 시작한다. 즉 비드의 무게 약 0.2 mg을 감안하면 무게비로 비드의 약 1.5배 정도가 용융 흡열온도을 보이지 않는 물, 다시 말해 결합수(bound water)라 할 수 있다(도 7 참조).

<162> 위 동결건조 비드의 50℃ 진공건조에서 구한 감량수 10%는 따라서 모두 결합수임을 알 수 있다.

<163> 만약에 동결건조 겔 중의 10%의 물이 모든 결합수(bound water)라면, 동결건조 과정중 마지막 건조과정 중 비드 무게의 1.5배에 해당되는 "결합수" 역시 제거됨을 알 수 있다. 이 결합수는 알지네이트 겔의 존재로 인해 생긴 것이기 때문에 이 결합수가 동결과정 중의 *S. plymuthica*의 생존에 매우 중요한 역할을 하였다고 생각된다.

<164> 참고로, 도 8은 동결건조한 *S. plymuthica* 적재된 키토산기반 비드의 수분함량에 따른 DSC 용융 흡열온도으로부터 구한 얼음의 그람당 용융 엔탈피를 도시한 그래프로서, Y축의 g당 엔탈피는 비드의 무게 0.2 mg이 포함된 것이다. X축과 만나는 점이 *S. plymuthica* 적재된 키토산기반 비드가 용융을 나타지 않는 결합수의 양은 0.34 g이었다.

<165> 또한, 도 9는 동결건조한 *S. plymuthica* 적재된 키토산기반 비드의 수분함량에 따른 DSC 용융 흡열온도으로부터 구한 얼음의 그람당 용융 enthalpy를 도시한 그래프로서, 여기서 Y축 g 당 엔탈피는 도 8의 엔탈피 값에서 비드의 무게를 제외하고 다시 계산된 엔탈피로서 포물곡선형태를 나타내지만 X축과의 외삽은 도 8에서와 거의 같은 0.33 g를 확인할 수 있었다.

발명의 효과

<166> 본 발명에 따르면, 알지네이트 겔 안정화를 위해 현재 사용되고 있는 폴리-L-리신을 값이 싸고(16,000

배) 환경친화적인 키토산으로 대체할 수 있을 뿐 아니라, *S. plymuthica* A21-4 세균에 대한 탁월한 담지능력, 실온에서 3 달 후에도 세균이 아주 높은 생존률을 나타내었다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 다층 프로세스에 의한 알지네이트 비드의 제조 모식도이고,

<2> 도 2는 알지네이트 쉘 비드의 제조 공정을 도시한 도면이고,

<3> 도 3은 다중 양이온 종류별 알지네이트 비드의 안정화 공정을 도시한 도면이고,

<4> 도 4는 알지네이트 비드의 전자현미경적 단면구조를 도시한 도면으로서, 좌측(폴리-L-리신)과 중간(polyethyleneimine) 부분은 세균이 적재되지 않은 알지네이트 비드 구조이고, 우측(키토산 사용) 부분은 *S. plymuthica* A21-4이 적재된 경우이고,

<5> 도 5은 수백 μM ~ 1 ㎜ 알지네이트 쉘 마이크로비드 제조장치로서, 압축 공기를 동력으로 하는 분사 시스템 구조이고,

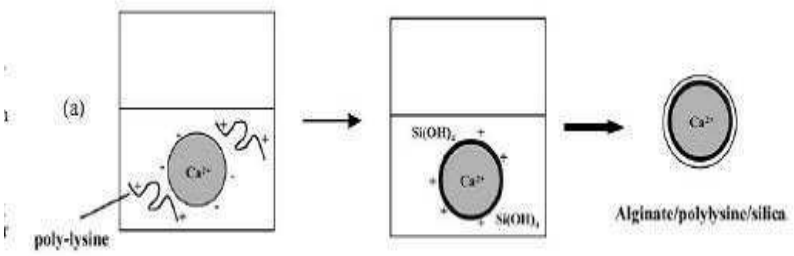
<6> 도 6은 압축공기 분사 시스템으로 제조된 캡슐을 $CaCl_2$/키토산/실리케이트 처리방법으로 재차 처리하여 만든 알지네이트 비드의 (A) 팽윤 상태에서 쿠마시 블루 염색처리한 현미경 구조, 및 (B) 동결건조 후 SEM 사진(500 ㎛)이고,

<7> 도 7은 동결건조한 *S. plymuthica* 적재된 키토산 기반 비드의 수분함량에 따른 시차 주사 열분석 traces을 도시한 도면이고,

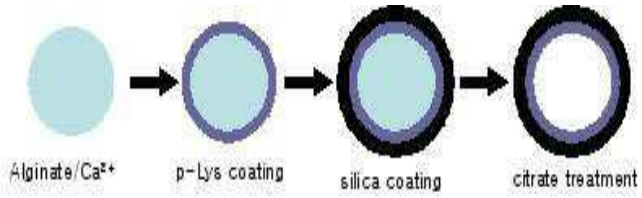
<8> 도 8 및 9는 동결건조한 *S. plymuthica* 적재된 키토산 기반 비드의 수분함량에 따른 DSC 용융 흡열온도(용융 흡열온도)로부터 구한 얼음의 그램당 용융 엔탈피를 도시한 그래프이다.

도면

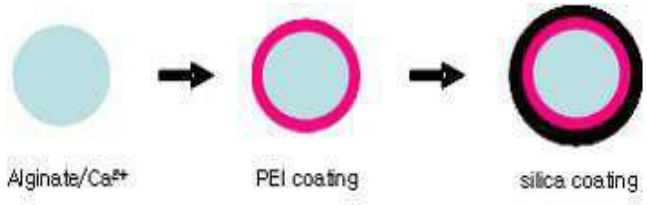
도면1



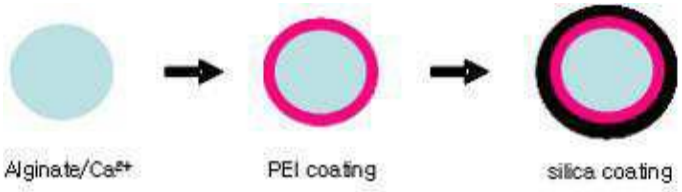
도면2



도면3a



도면3b



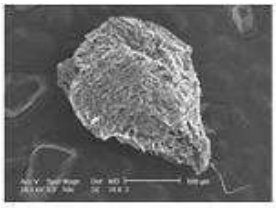
도면3c



도면4



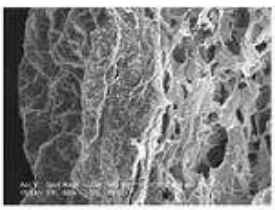
전체모양 50x



전체모양 50x



단면 50x

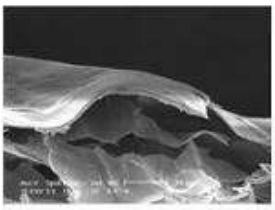


단면 확대 400 x

Alginate (in 0.06 M NaOH)
→ 0.1 M $CaCl_2$
→ 0.01% poly-L-lysine
→ 10 mM Sodium silicate
)까지 반응 시킨 bead

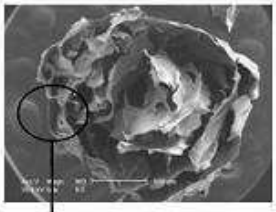


단면 40x



단면 확대 1000 x

Alginate (in 0.06 M NaOH)
→ 0.1 M CaCl2
→ 0.1% polyethylenimine
→ 10 mM Sodium silicate
)까지 반응 시킨 bead



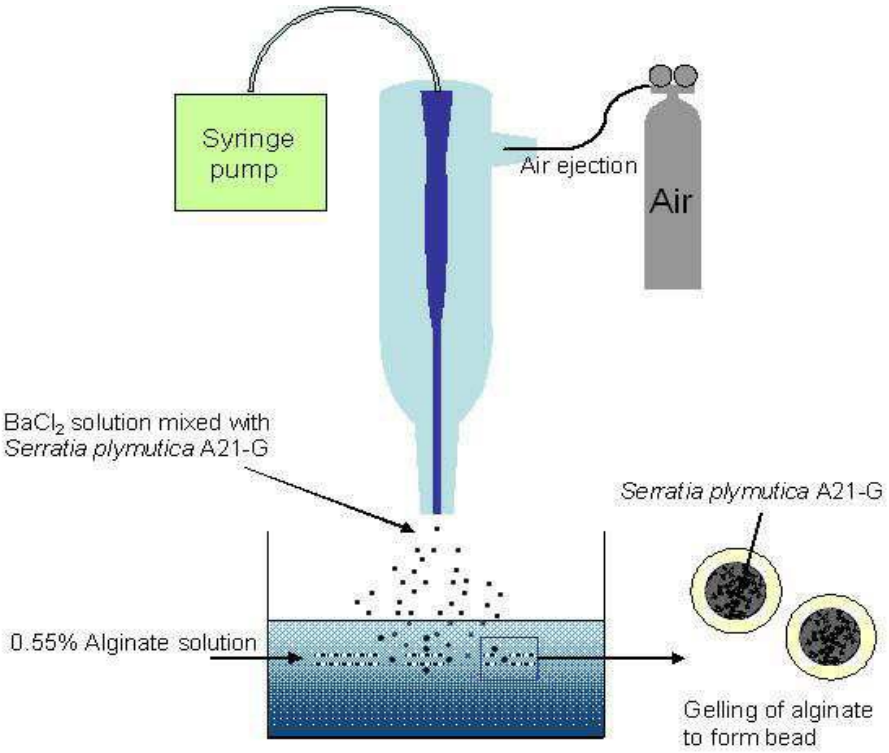
단면 50x



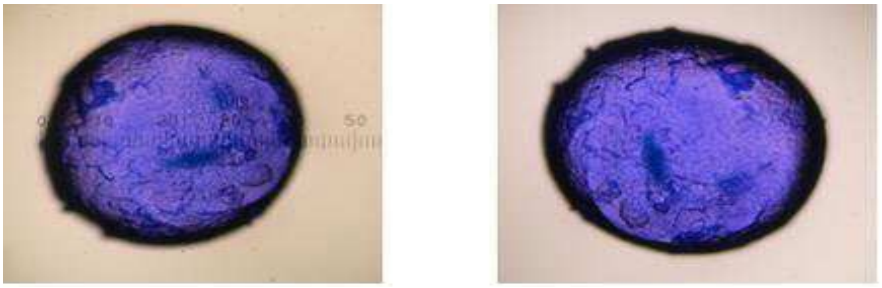
단면 확대 1000 x

Alginate (in 0.06 M NaOH)
→ 0.1 M $CaCl_2$
→ 0.01% chitosan
→ 10 mM Sodium silicate
)까지 반응 시킨 bead

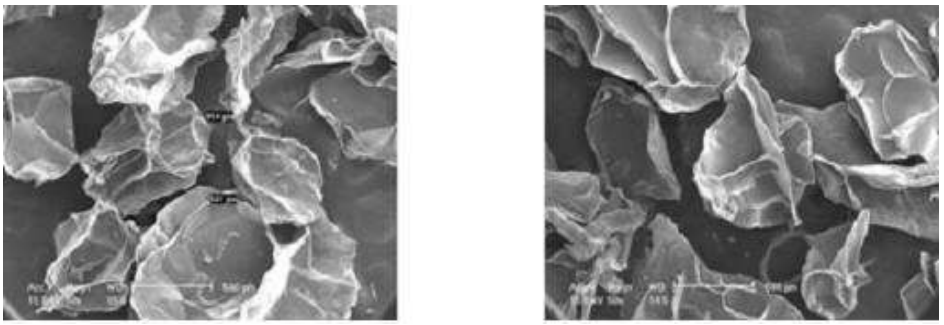
도면5



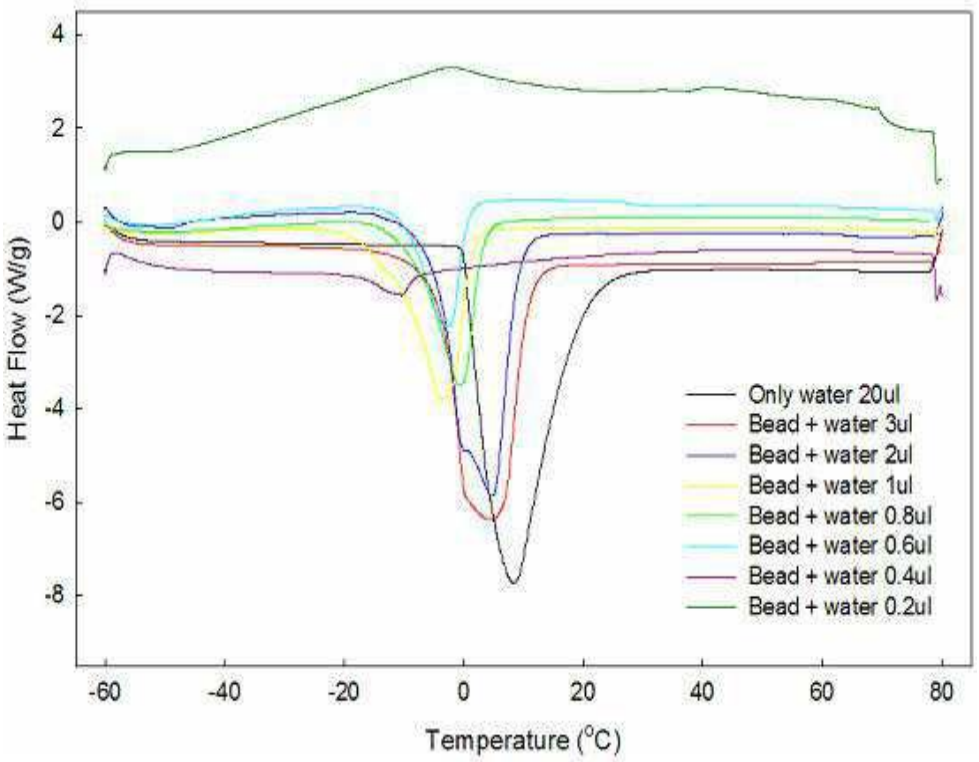
도면6a



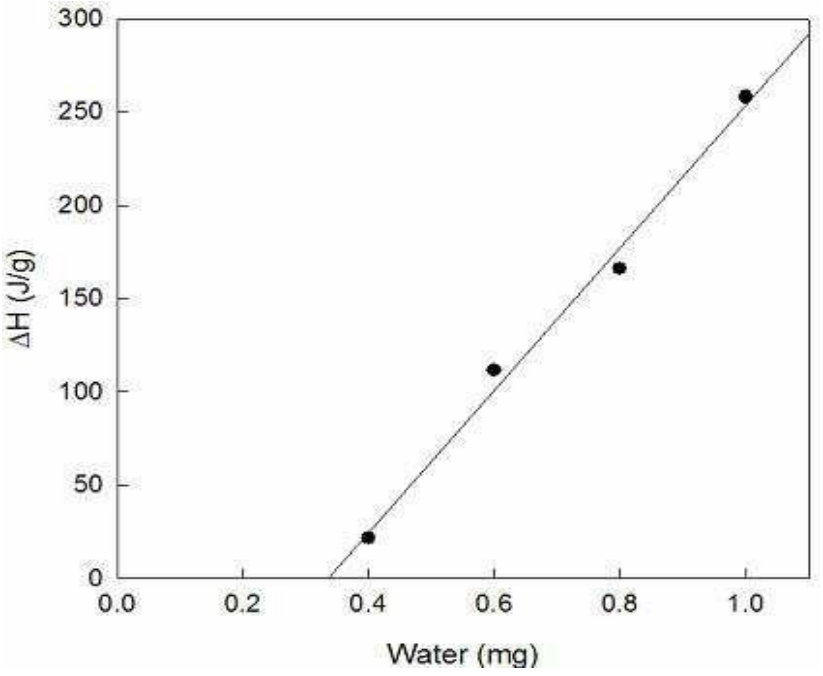
도면6b



도면7


Heat Flow (W/g)
Temperature (°C)
Only water 20ul
Bead + water 3ul
Bead + water 2ul
Bead + water 1ul
Bead + water 0.8ul
Bead + water 0.6ul
Bead + water 0.4ul
Bead + water 0.2ul

도면8


ΔH (J/g)
Water (mg)

도면9

