

다시마 추출 Alginate를 이용한 미생물 캡슐화제의 겔 형성능 및 생균력 비교

최소영¹ · 윤민호² · 황경숙^{1,*}

¹목원대학교 생명산업학부, 미생물생태자원연구소, ²(주)아미텍

Comparison of the Gel Formation Ability and Stability of Encapsulated Microbial Inoculant Using Extractable Alginate from Sea Tangle

So-Young Choi¹, Min-Ho Yoon² and Kyung-Sook Whang^{1,*}

¹Department of Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea
Institute of Microbial Ecology and Resources Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea

²Ami-Tech Company Limited, Geumsan 314-943, Korea

Received May 3, 2006; Accepted August 31, 2006

For the purpose of developing a high quality agricultural microbial inoculant, methods and materials for improving encapsulation were investigated. Preparation of capsule was conducted by improving extrusion system with micro-nozzle and peristaltic pump. The sodium alginate was selected because of its cheapness, stability of cells, and gel formation ability. The yields, physical properties and gel formation abilities of extractable alginate from sea tangle were investigated by hot water extractable and alkali soluble methods. The extraction yields of hot water extractable alginate (HWEA) and alkali soluble alginate (ASA) from sea tangle were 8 and 20%, respectively. The HWEA was almost not viscous even in 1.5% of the sample solution, whereas the ASA was very highly viscous in above 3% sample solution. The gel formation ability of each samples varied from 1.5% to 5% and the ASA showed a good gel formation ability at 3% solution as commercial alginate (CA). The soil microbial inoculant, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* and *Geotrichum candidum* encapsulated sodium alginate with starch and zeolite for stabilizer. The survivability of encapsulated soil microbial inoculant using alginate without stabilizer appeared to be 66, 52, 70 and 50%, respectively. Inclusion of starch and zeolite with alginate bead increased viabilities in *Bacillus* sp. and *Geotrichum candidum* by 81-83% and 89%, respectively.

Key words: alkali soluble alginate, encapsulation, hot water extractable alginate, microbial inoculant, stabilizer

서 론

친환경 농업의 일환으로 개발되고 있는 토양미생물제는 유기물 분해촉진, 작물생육촉진, 토양개량 및 길항작용 등 다양한 종류의 제품이 생산·유통되고 있으며 미생물제의 형태도 수용제, 수화제 및 입제 등 다양하고 사용량도 증가하고 있는 실정이다^{1,2}. 토양미생물제의 경우 유통과정이나 보관기간 중 단위 증량당 생균수가 매우 중요하므로 보증 미생물 수를 유지하기 위하여 지오라이트와 질석 같은 무기재료, 다당류 및 울리고당 등의 담체에 배양하여 미생물을 증식시키거나 직접 미생물을 담체에 흡착시키는 방식으로 제품이 개발되어 왔다.

식품이나 의약품의 경우 미생물 생균수 유지를 위한 전문적인 고정화 기술이 개발되면서 현재 단백질이나 다당류 등 고분자물질의 담체를 이용한 생균제의 미세캡슐화 기술로 invertase 활성을 지닌 효모의 미세캡슐화 기술³, 요구르트 유산균의 미세캡슐화 기술⁴ 및 미세 캡슐화된 hybridoma cell을 이용한 면역학 연구⁵ 등 많은 연구가 이루어져 이미 제품화 되고 있다^{6,7}. 그러나 농업용 미생물제의 경우 전문적인 미생물제 고정화 기술은 확립되어 있지 않고 특히, 캡슐 형태의 토양미생물제의 경우는 일부 초기 수준의 연구만 보고되어 있어 미생물제의 효과를 보다 안정하게 유지시킬 수 있는 토양미생물제 개발을 위한 전문적인 고정화 기술의 개발이 필요한 실정이다. 선행연구에서 캡슐형 토양미생물제 제조를 위한 캡슐화 소재로 겔 형성능이 우수하고 가격이 저렴한 Na-alginate가 가장 적합한 소재임을 밝혔으나⁸, 현재 시판되고 있는 Na-alginate의 경우 상온에서 용해시키는데 시간이 오래 걸리고 부가가치가 낮은 농업용

*Corresponding author

Phone: 82-42-829-7598; Fax: 82-42-829-7599

E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

미생물제의 캡슐소재로 사용하기에는 가격이 비싸 실용화가 어려운 실정이다⁹⁻¹⁰⁾.

본 연구에서는 농업용 미생물 캡슐화제 제조에 가장 적합한 소재로 확인된 Na-alginate를 국내산 다시마로부터 직접 추출하여 물리적 특성 및 겔 형성능 그리고 캡슐화 후의 미생물 생균력 등을 시판용 alginate와 비교하여 캡슐화 소재로서의 사용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

캡슐화에 사용된 균주. 토양 미생물제 개발을 위하여 선행연구에서 국내토양 및 부숙 퇴비로부터 분리된 우수균주 *Bacillus thuringiensis* KS1A-9, *Bacillus subtilis* CK-27, *Lactobacillus plantarum* SH-1 그리고 *Geotrichum candidum* GA-1을 캡슐화 미생물제 균주로 사용하였다⁸⁾.

배지. 세균배양에는 육즙영양배지(peptone 10 g, NaCl 5 g, beef extract 10 g, D.W 1,000 ml, pH 7.0)를 사용하였고, *Lactobacillus*의 경우 유산균 선택배지로 이용되고 있는 MRS broth (MRS, Difco Laboratories, USA)를 사용하였다. 방선균은 전용배지인 SCA(Starch Casein Agar, starch 10 g, casein 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.02 g, K₂HPO₄ 0.5 g D.W 1,000 ml, pH 7.5~7.0) 배지를 사용하였으며, *Geotrichum candidum* GA-1의 배양을 위해 PDA(Potato Dextrose Agar; Difco) 배지를 사용하였다.

생균수 측정. 미세캡슐을 제조한 후 캡슐 내 생존하는 생균수 측정은 Sultana 등의¹¹⁾ 방법에 따라 phosphate buffer(pH 7.0)에 캡슐제를 4°C에서 24시간 동안 침지하고 용해시킨 다음, 상기의 평판배지에 도말하여 28°C에서 1주일간 배양한 후 형성된 집락수를 측정하였다. 생균수는 상용대수치(log cfu/g)로 나타내었다.

Alginate 추출. 천연 다시마로부터 alginate의 추출은 Nishide 등이¹²⁾ 제시한 방법을 변형하여 열수추출 알긴산(hot-water extractable alginate; HWEA)법과 알칼리 가용성 알긴산(alkali soluble alginate; ASA) 추출법을 사용하였다. HWEA법은 건조 다시마(*Laminaria japonica*) 분말을 3.7% formaldehyde가 함유된 증류수에 첨가하여 100°C에서 4시간 열수 추출한 여과액을 80% ethanol로 침전시킨 후, 동일 유기용매를 이용하여 농도 별 분별침전법에 의해 침전물로부터 알긴산을 분리하였다. 또한 ASA법은 건조 다시마(*Laminaria japonica*) 분말을 0.9% Na₂CO₃ 용액에 첨가하여 75°C에서 4시간 알칼리 추출한 여과액을 10% HCl로 산성화(pH 2.0)하여 침전을 형성시킨 후, 침전물을 50% methanol과 10% NaOH로 중화, 정제하여 알긴산을 회수하였다¹³⁻¹⁴⁾. 대조 alginate는 바다말(*Marocystis pyrifera*)에서 추출한 sodium alginate를 Sigma사(Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO63103 USA)로부터 구입하여 사용하였다.

캡슐화 제조. 캡슐화 재료는 시판품 Na-alginate(Sigma)와 상기 방법에서 얻어진 다시마 추출 alginate을 사용하였다. 미생물 캡슐화제의 제조는 선행연구에서 제시한 Extrusion⁴⁾에 주로 사용하는 고속의 자동분사방식(air atomizing device) 대신에 저속의 연동펌프를 이용한 micro-nozzle 방식의 캡슐화 장치를 설

계, 제작하여 본 실험에서 사용하였으며, bead 형성을 위한 경화제로는 1.5% CaCl₂ 용액을 이용하였다^{8,15)}.

캡슐의 물리적 성질 및 형태 관찰. 다양한 농도의 alginate를 첨가하여 형성된 bead의 강도는 Fudoh Rheometer(RT-30100, Fudoh kogyo Co., Ltd., Japan)을 사용하여 plate type 판을 5 cm/min의 속도로 시료 두께가 50%까지 압축하여 측정하였다¹⁶⁾. Alginate 추출물의 녹는점은 1% 수용액을 이용해 5°C에서 40°C까지 1°C 간격으로 온도를 올리면서 각 추출물의 녹는 온도를 측정하였다. 또한, 형태관찰을 위해 공시균주 배양액에 다양한 농도의 alginate를 첨가하여 형성된 bead를 약 24시간 자연 건조하여 캡슐을 고정한 후 해부현미경(Leica zoom 2000)과 위상차 현미경(Leica IV/97, Wetzlar Germany)을 사용하여 형태를 관찰 하였다.

결과 및 고찰

다시마 추출 alginate의 특성 비교. 선행연구에서 농업 미생물제의 캡슐화 소재는 겔 형성능이 우수하고 가격이 저렴한 Na-alginate가 가장 적합한 소재로 선발되었으나 현재 시판되고 있는 Na-alginate의 경우 상온에서 용해시키는데 시간이 오래 걸리고 농업용 미생물 캡슐제에 사용하기에는 가격이 비싸 실용화가 어려운 실정이다⁸⁾. 본 실험에서는 Na-alginate 캡슐소재의 경제적 측면과 효율성을 고려하여 국내산 다시마(*Laminaria japonica*)로부터 고온의 열수를 이용하여 가용성 물질들을 분리시키는 열수추출법(hot-water extract; HWE)과 Na₂CO₃를 사용하여 다시마를 가수분해하여 분리하는 알칼리추출법(alkali soluble; AS)을 이용하여 추출된 Na-alginate의 특성을 비교, 검토하였다.

ASA(alkali soluble alginate)와 HWEA(hot-water extract alginate)의 추출수율을 비교한 결과 ASA의 경우 추출 수율이 약 20%로 HWEA보다 2배 이상 높은 수율을 나타내었다. 또한 가격을 비교한 결과 시판용 Na-alginate의 경우 460원/g인 반면, 다시마(*Laminaria japonica*) 가격과 시약의 가격을 고려하여 시판용 Na-alginate 11배 이상 저렴한 것으로 평가되었다(Table 1). 따라서 부가가치가 낮은 농업미생물제의 경제적 측면을 고려한다면 알칼리 추출법에 의해 다시마(*Laminaria japonica*)로부터 Na-alginate를 추출한 ASA를 농업 미생물 캡슐화 소재로 이용하는 것이 매우 경제적이라고 판단되었다.

캡슐의 겔 형성에 필요한 ASA와 HWEA의 최적 농도를 비교하였다. ASA와 HWEA를 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 및 5.0%의 농도로 각각 첨가하여 겔 형성능을 검토한 결과 HWEA의 경우 1.5% 미만의 농도에서는 겔이 형성되지 않았고, 3.0% 이상의 농도에서 겔이 형성되기 시작하였으나 겔 강도가 미약하게 나타났다. 5% 고농도에서는 821.7±0.2 g/cm²의 견고한 겔 형성이 성공적으로 이루어졌다. ASA는 3.0% 농도에서 992.1±0.2 g/cm²의 강한 겔이 형성되는 특성을 보여 시판되고 있는 Na-alginate(commercial alginate; CA) 1.5% 농도의 겔과 유사한 겔 형성능을 나타내었다(Table 1).

HWEA와 ASA의 물리·화학적 특성에 관한 연구보고에 의하면 1.5% 농도의 HWEA 점도는 250 centipoise인 반면

Table 1. Comparison of the gel strengths and yield of hot water extractable alginate (HWEA) and alkali soluble alginate (ASA) from sea tangle

| Characteristics | Na-alginate | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | HWEA | ASA | CA |
| Concentration of Na-alginate (%) | | | |
| 0.5 | ND | ND | 1.83 ± 0.1 |
| 1.0 | ND | 77.4 ± 0.1* | 596.7 ± 0.1 |
| 1.5 | ND | 209.8 ± 0.1 | 1,053 ± 0.2 |
| 3.0 | 52.3 ± 0.2 | 972.4 ± 0.1 | NT |
| 5.0 | 821.7 ± 0.2 | 1324.0 ± 0.1 | NT |
| Melting point (°C) | 31.0 ± 1.1** | 15.1 ± 2.4 | 12.3 ± 0.1 |
| Yield (%) | 7.98 ± 0.07 | 20.01 ± 0.14 | NT |
| Price (won/g) | 70*** | 40 | 460 |

HWEA; hot-water extractable Na-alginate, ASA; alkali soluble Na-alginate, CA; commercial Na-alginate (Sigma Co. USA), ND; Not detected. NT; No tested

*gel strength of Na-alginate(g/cm²), **melting point of 1% solution. The results indicate the mean ± SD (n = 3), ***The price was calculated in density of 5% for HWEA, 3% for ASA and 1.5% for CA, respectively. The results indicate the mean ± SD (n = 3)

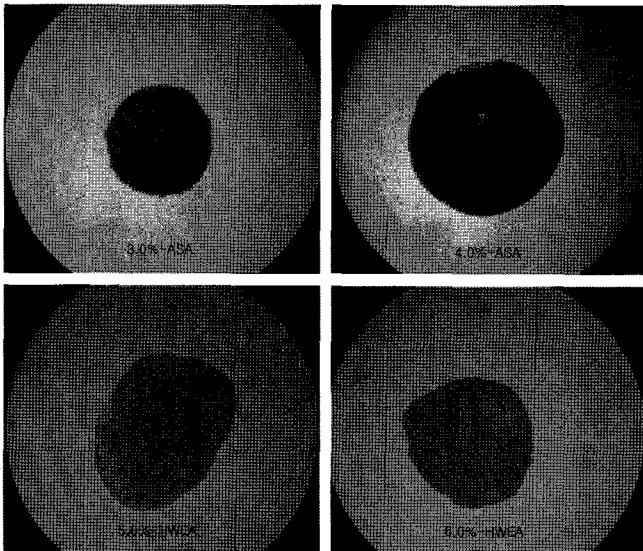


Fig. 1. Comparison of the gel forms using different concentration of alkali soluble alginate (ASA) and hot water extractable alginate (HWEA).

1.5%의 ASA 점도는 38,250 centipoise로 약 150배 이상 높은 점도를 나타내었다^{12,14,16}. ASA의 녹는점은 15.1°C로서 HWEA의 31°C보다 훨씬 낮은 온도로 실온에서 가용화가 용이하였다.

상기의 특성에 따라 음료수 제조 등 식품산업에 사용되는 Na-alginate는 점성이 낮은 HWEA의 효용가치가 높는데 반하여¹⁶, 농용 미생물 캡슐제의 경우 강한 점성을 나타내고 겔 형성이 용이하며 낮은 온도에서도 쉽게 용해되는 ASA가 캡슐소재로 사용하는 것이 적절할 것으로 평가되었다.

ASA와 HWEA로 조제된 캡슐의 형태 비교. 공시균주 배양액에 ASA와 HWEA를 다양한 농도로 첨가하여 캡슐화한 미생물체의 형태학적 특징을 해부현미경(Leica zoom 2000, ×35) 하에서 관찰하였다. ASA의 경우 3.0%와 4.0% 농도에서 비교적 단단하고 규칙적인 겔 형태를 나타내었다. 특히 4.0% 농도의 ASA로 조제된 캡슐의 경우 매우 견고하고 매끈한 특징을 나타내었다. HWEA의 경우 5% 농도에서 캡슐이 형성되기 시

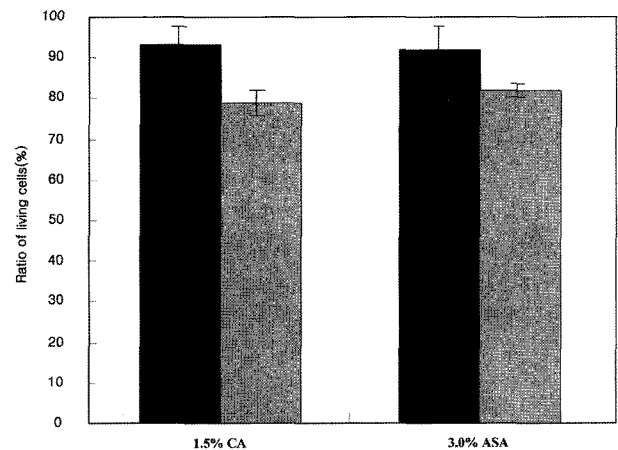


Fig. 2. Comparison of the stability of microencapsule cell prepared using CA or ASA. CA; commercial Na-alginate (Sigma chemical Co. product), ASA; alkali soluble Na-alginate. ■; 0 day, ▨; 30 days after encapsulation.

작하였으며, 6.0% 농도에서 캡슐 모양이 비교적 단단하고 규칙적인 형태를 나타내었다(Fig. 1). 바닷말 추출 시판용 Na-alginate(CA, Sigma)와 유사한 겔 형성능을 보이는 농도로 ASA가 CA보다 2배 이상 높은 이유는 앞으로 추가적인 연구를 통해 규명해야 하지만, 아마도 추출 원재료인 바닷말 알긴산과 다시마 알긴산의 구성성분과 물리적 성질이 전혀 다른데 기인하는 것으로 생각되며 이와 관련된 겔 강도 차에 관한 유사한 결과보고 되었다¹⁴.

이상 겔 형성능과 형태 비교를 통해 3% 농도의 ASA를 캡슐화 소재로 이용할 경우 견고한 겔 형성이 이루어짐이 확인되어 고농도의 HWEA를 사용하는 것보다 효율적으로 캡슐화가 가능하다고 판단되었다.

ASA와 CA 캡슐제의 생균력 비교. ASA 캡슐화제의 생균력을 검토하기 위하여 ASA 3.0% 농도와 유사한 겔 형성능을 나타낸 시판용 alginate(CA)로 조제된 캡슐제와 생균력을 비교하였다. *Bacillus thuringiensis*를 사용하여 캡슐화 직후 생균수를 측정하고 실온에서 보존하며 30일 경과한 후 각 캡슐제의 생

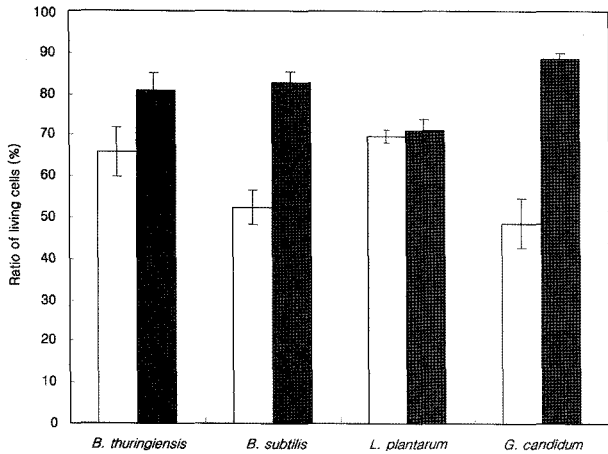


Fig. 3. Comparison of the survivability of encapsulated soil microbial inoculant using alginate and stabilizer with alginate. □: 3% ASA, ■: 3% ASA with 1% of starch and zeolite.

균수를 측정 한 결과 1.5%-CA 캡슐제 내 초기 생균수는 7.2×10^8 cfu/g로 30일이 지난 후는 약 79%의 생균력을 유지하였다. 3.0%-ASA 캡슐제 내 초기 생균수는 5.8×10^8 cfu/g로 30일이 지난 후 CA보다 2%가 높은 81% 생균력을 나타내었다 (Fig. 2). 이는 농용 미생물 캡슐제로 고가의 CA 대신 ASA를 사용하여도 겔 형성능이나 미생물 안정성 유지 측면에서 충분히 가능성이 입증하였다.

캡슐화 보조제의 생균력 증진 효과. 다양한 종류의 소재를 조합하여 캡슐화 할 경우 단일 소재를 사용한 것보다 생균수가 증가하는 효과를 얻을 수 있다¹⁴⁾. 식품용 미생물 캡슐제의 경우 미세 캡슐 내 미생물 생존력을 유지하는 캡슐막의 효과를 나타낼 수 있는 보조제로 키토산 및 starch와 같은 고가의 보조제를 사용하고 있다^{11,17)}. 본 실험에서는 농용 미생물제의 생균력을 높일 수 있는 보조제로서 저렴한 가격으로 구입이 용이한 starch와 농용 미생물 흡착제로 광범위하게 사용되는 zeolite를 보조제로 사용한 캡슐제와 ASA 단일소재로 제조된 캡슐의 생균수를 비교, 검토하였다¹⁸⁾.

상기의 겔 형성능 검토 결과 최적 조건으로 선발된 3%의 ASA 단일소재로 제조된 미생물 캡슐화제와 3%의 ASA에 1.0% 농도의 starch 및 zeolite를 보조제로 혼합하여 제조한 캡슐제의 생균력을 비교하였다. ASA 단일소재의 경우 세균(*B. thuringiensis*, *B. subtilis*)은 66% 및 55%의 생균력을 나타내었고, 유산균(*L. plantarum*)은 70%, 효모(*G. candidum*)는 50%의 생균력을 나타낸 반면 보조제를 사용한 캡슐제의 생균력 조사 결과 세균은 81-83%의 생균력을 나타내었고 효모는 약 90%의 매우 높은 생균력을 나타내었다(Fig. 3).

복합 미생물 캡슐제의 생균력. 유기물 분해 우수 미생물로 선발된⁸⁾ 공시균주인 세균 *Bacillus thuringiensis* KSIA-9, *Bacillus subtilis* CK-27, 유산균 *Lactobacillus plantarum* SH-1 그리고 효모 *Geotrichum candidum* GA-1의 배양 농축액과 캡슐화 최적 조건인 3%의 ASA와 1%의 starch 그리고 zeolite를 혼합하여 복합미생물 캡슐화제를 제조하여 120일 후 생균력을 측정하였다. 캡슐화한 직후 NB배지를 이용하여 세균수를 측정

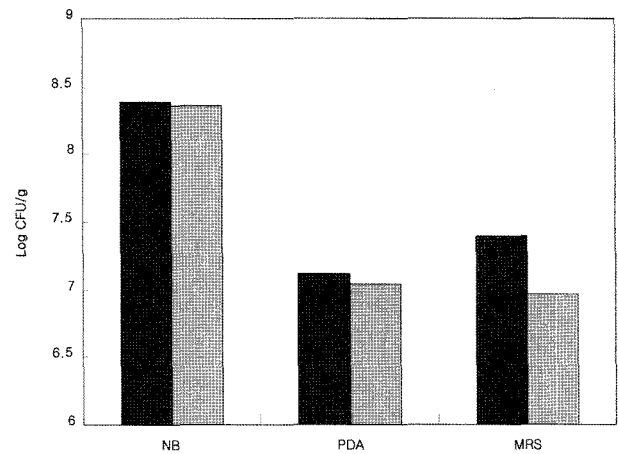


Fig. 4. Comparison of the survivability of encapsulated cells using ASA with stabilizers. ■: 0 day, ▨: 120 days after encapsulation. NB: nutrient broth medium for bacterial enumeration, PDA: potato dextrose agar medium for yeast enumeration, and MRS: MRS broth medium for *Lactobacillus* enumeration.

한 결과 8.2×10^7 cfu/g로 초기의 생균수에 비하여 약 93%의 생균력을 나타내었고, 효모의 경우 9.8×10^6 cfu/g의 생균수를 나타내어 77%의 생균력을 나타내었다. 유산균 최적배지인 MRS 배지를 이용하여 유산균수를 측정 한 결과 2×10^5 cfu/g의 생균수를 나타내어 71%의 생균력을 나타내어 세균에 비해 생균수의 안정성이 다소 낮았다(Fig. 4).

이상의 결과로부터 농용미생물의 생균력 증진을 위해 최적의 소재로 개발된 다시마 추출 alginate와 starch 및 zeolite를 복합 소재로 하여 농용 미생물제를 캡슐화할 경우, 보다 안정한 미생물제 공급과 규격화된 품질보증 그리고 미생물제 생산성 확대가 가능할 것으로 기대된다.

초 록

생균력 안정성이 보장되고 품질이 규격화된 농용 미생물제 공급을 위하여 캡슐형 미생물제의 캡슐화 소재로 열수 추출법과 알칼리 추출법을 이용하여 다시마로부터 Na-alginate를 직접 추출하여 겔 형성능과 생균력을 검토하였다. 열수추출 alginate(HWEA)의 경우 5%의 고농도에서 겔 형성이 성공적으로 이루어진데 반해 알칼리추출 alginate(ASA)는 3% 농도에서 992.1 ± 0.2 g/cm²의 강한 겔이 형성되는 특성을 보여 시판되고 있는 alginate(CA) 1.5% 농도의 겔과 유사한 겔 형성능을 나타내었다. 또한 ASA의 경우 추출 수율이 20%로 HWEA 보다 2배 이상 높게 나타났으며 현재 시판되고 있는 Na-alginate(CA)에 비해 비용이 11배 이상 저렴한 것으로 산출되었다. 이상의 결과로부터 ASA를 사용할 경우 값싼 비용으로 추출이 용이하며 저농도에서 겔형성능이 우수하여 최적의 농용 미생물 캡슐 소재로 평가되었다. ASA 캡슐제의 생균력을 조사한 결과 81%의 생균력을 나타내어 고가의 CA 캡슐제와 동일한 생균력을 보장 할 수 있음이 입증되었다.

미세 캡슐 내 미생물 생존력을 보다 안정적으로 유지하기 위해 캡슐막의 효과를 나타낼 수 있는 보조제로 starch와 zeolite

를 이용하여 생균력 증진효과를 검토한 결과 단일소재 ASA만으로 제조된 캡슐제보다 보조제를 혼합한 캡슐제 경우 세균과 효모는 생균수가 크게 증가되는 효과를 볼 수 있었다.

미생물 혼합 배양액과 상기의 최적 복합 캡슐소재를 혼합하여 캡슐화한 미생물제의 생균력을 측정된 결과 세균은 93%의 높은 생균력을 나타내었고 유산균과 효모의 경우 70% 이상의 생균력을 나타내어 본 연구를 통해 다시마로부터 직접 추출한 ASA가 고가의 시판품 alginate를 대체할 수 있는 농용 미생물 캡슐화 소재로 이용가능할 것으로 판단되었다.

Key words: alkali soluble alginate, encapsulation, hot water extractable alginate, microbial inoculant, stabilizer

감사의 글

본 연구는 산업자원부 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성 사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yun, S. Y. and Shin, J. D. (2001) Effect of TLB microbial fertilizer application on soil chemical properties microbial flora and growth of chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis* MAKINO). *Korean J. Soil Sci.* **43**, 8-16.
2. Gadagi, R. Park, M. S., Lee, H. S., Seshadri, S., Chung, J. B. and Sa, D. M. (2003) Beneficial roles of *Azospirillum* as potential bioinoculant for eco-friendly agriculture. *Korean J. Soil Sci.* **36**, 290-303.
3. Chang, H. N. (1996) In-situ Immobilization of Whole Cell Enzymes in Microcapsules. *International Symposium on Environmental Biotechnology*, USA. July 14-18.
4. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* **13**, 3-13.
5. Okada, N., H. Miyamoto, Y. Ohsugi and A. Katsume. (1997) Immunological studies of SK2 hybridoma cells microencapsulated with alginate-poly(L)lysine-alginate (APA) membrane following allogeneic transplantation. *Bioche. Biophys. Res. Com.* **230**, 524-527.
6. Dave, R. I., and Shah, N. P. (1997) Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **7**, 31-41.
7. Sheu, T. Y. and Marshall, R. T. (1993) Micro-encapsulation of *Lactobacillus* in calcium alginate gels. *J. Food Sci.* **54**, 557-561.
8. Choi, S. Y., Yoon, M. H. and Whang, K. S. (2005) Encapsulation of agro-probiotics for promoting viable cell activity. *Korea J. Soil Sci. Fert.* **38**, 287-293.
9. Champagne, C. P., Gaudy, C., Poncelet, D. and Neufeld, R. J. (1992) *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1429-1434.
10. Champagne, C. P., Girard, F. and Rodrigue, N. (1993) Production of concentrated suspensions of thermophilic lactic acid bacteria calcium-alginate beads. *Int. Dairy J.* **3**, 257-275.
11. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N. A. R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* **62**, 47-55.
12. Nishide, E., Anzai, H. and Uchida, N. (1988) Distribution of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate in different parts of *Undaria pinnatifida*. *Nippon Sui. Gak.* **54**, 1619-1622.
13. You, B. J., Lim, Y. S. and Jeong, I. H. (1998) Effect of extracting conditions on the viscosity and binding capacity of metal ion of alginate from Sea Tangle, *Laminaria* spp. *J. Korean Fish Soc.* **31**, 267-271.
14. Cho, S. Y., Kang, H. J., Joo, D. S., Lee, J. S. and Kim, S. M. (1999) A comparative study on physical properties and gel formation abilities of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate extracted from *Laminaria japonica* in East sea, Korea. *J. Korean Fish Soc.* **32**, 774-778.
15. Lee, K. H., Lee, P. M. and Siaw, Y. S. (1993) Immobilization of aminoacylase by encapsulation in poly-L-lysine-stabilized calcium alginate bead. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **57**, 27-32.
16. Cho, S. Y., Joo, D. S. et al. (1999). Preparation of water soluble alginic acid prepared from sea mustard and sea tangle by microwave and hot water. *Korean Fish Soc.* **32**, 779-783.
17. Koo, S. M., Cho, Y. H. Huh, C. S. Baek, Y. J. and Park, J. Y. (2001) Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 376-383.
18. Jankowski, T., Zielinska, M. and Wysakowska, A. (1997) Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol. Tech.* **11**, 31-34.