

## Sourdough에서 분리된 유산균의 고농도 배양을 위한 중화제로서 Calcium Carbonate-Alginate Bead의 이용가능성 평가

정승원<sup>1</sup> · 이광근<sup>1</sup> · 김철우<sup>2</sup> · 이수한\*

<sup>1</sup>동국대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>한국식품공업협회, \*울지대학교 식품산업의식학과

### Assessment of Applicability of a Calcium Carbonate-Alginate Beads as Neutralizer for the High Cell Density Cultivation of Isolated Sourdough Lactic Acid Bacteria

Seung-Won Jung<sup>1</sup>, Kwang-Geun Lee<sup>1</sup>, Cheol Woo Kim<sup>2</sup>, and Su Han Lee\*

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Dongguk University

<sup>2</sup>Korea Advanced Food Research Institute

\*Department of Food Technology and Services, Eulji University

#### Abstract

Lab scale experiments were conducted in order to assess the applicability of CaCO<sub>3</sub>-alginate beads as neutralizer for the high cell density cultivation and prepare the direct vat inoculation cultures of isolated sourdough lactic acid bacteria. With increasing the amount of bead and decreasing the diameter of bead in acidic solution, the neutralizing effect of CaCO<sub>3</sub>-alginate bead became higher. In batch process with CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, *Lactobacillus amylovorus* DU-21 isolated from sourdough showed the highest viable cell counts and optical density in MRS broth. The values of viable cell counts and optical density were 9.996 log CFU/mL and 3.97, respectively. Experiments on the conditions which increase viability during lyophilization were carried out and the following results were obtained; 15% glycerol revealed the high cryoprotective effect on the concentrated cultures during lyophilization among the two cryoprotective agents. Consequently, CaCO<sub>3</sub>-alginate beads and 15% glycerol were found to be useful not only to cultivate *Lactobacillus amylovorus* DU-21 but also to preserve strain.

**Key words:** CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, neutralizer, direct vat inoculation cultures, lactic acid bacteria

## 서 론

미생물에 있어서 생장은 그들이 처한 물리화학적 환경에 대한 가장 기본적인 반응이다. 생장은 복제와 세포 크기 변화의 결과이며, 미생물들은 다양한 물리적, 화학적, 영양 조건 하에서 성장할 수 있다(Ha, 2002).

환경의 pH는 미생물의 생육을 비롯해서 여러 가지 대사 능력이나 화학적인 활성에 큰 영향을 미치게 되며, 수소 이온 농도(pH)는 효소 활성에 영향을 미침으로써 미생물 성장 속도에 영향을 미친다. 산성 환경에서는 세포 내의 pH를 중성으로 유지하기 위해서 세포 내로 들어오는 H<sup>+</sup>를

급속히 세포 밖으로 배출한다(Salle, 1961). 이는 DNA, chlorophyll, ATP 등은 산성에서 분해되고 RNA, 인지질 등은 알칼리성에서 분해되며 또 세포질내의 효소는 중성 부근에서 높은 활성을 나타내기 때문이다. 이와 같이 pH는 세포에 직접 영향을 미치게 되는 이외에 배지 중의 유기물의 이온화로 간접적 영향을 미치게 된다. 대부분의 발효에 있어서, pH는 상당히 변할 수 있다. 종종 질소원의 성질이 중요할 수도 있다. 암모늄이 단 하나의 질소원일 경우 암모니아가 소모됨에 따라 배지에 수소이온이 방출되며 pH가 감소한다. 질산염이 질소원일 경우 질산기를 암모늄으로 환원하기 위해 수소 이온이 배지로부터 제거되며 동시에 pH가 증가한다. 또한, pH는 유기산의 생산, 산의 소모, 또는 염기성 물질의 생산에 의해 변할 수 있다. 어떤 경우에는 CO<sub>2</sub>의 생성 또는 공급이 pH를 바꾼다. 그러므로 완충용액 또는 적극적인 의미의 pH 제어 시스템을 사용한 pH 제어가 중요하다(Shuler & Kargi, 2000).

유산균은 발효식품에 반드시 관계하며, 그 특유한 유산

Corresponding author: Su Han Lee, Professor, Department of Food Technology and Services, Eulji University, 212, Yanggi-dong, Sujeong-gu, Seongnam-shi, Gyeonggi-do 461-713, Korea  
Tel: +82-31-740-7196; Fax: +82-31-740-7349  
E-mail: shlee@eulji.ac.kr

Received May 28, 2010; revised July 2, 2010; accepted July 5, 2010

생성의 힘으로 발효식품의 품질을 조절할 뿐만 아니라 우리들의 소화기관에서도 많은 종류의 유해세균을 억제하여 우리의 건강에 이로운 역할을 하고 있다. 그러나 유산균은 자신이 생성한 산과 산에 의해 조성되는 낮은 pH 환경에 의하여 생장이 크게 저해 받기 때문에 배양 시 문제가 되고 있다. 유산균을 배양하기 위해서는 배지 내의 pH를 일정 수준 이하로 떨어지지 않게 NaOH, 또는 NH<sub>4</sub>OH 등과 같은 알칼리를 첨가하여 일정 pH를 유지시켜 주거나 신선한 배지로 계속 치환해주는 등 여러 가지 방법을 사용하고 있다(Christian et al., 1992). 그러나 이러한 중화제의 사용은 배양액 내 이온강도를 지속적으로 증가시켜 균의 활력과 증식을 감소시킬 뿐만 아니라 많은 양의 알칼리 용액의 첨가로 인하여 배양액이 희석되므로 균의 생화학적 환경변화를 가져올 수 있다(Open & Thames, 1992). 따라서 이와 같이 pH 조절 방법을 이용할 경우 유산균의 효율적인 고농도 균체를 얻는데 한계가 있다.

대량발효공정에서 중화제로 이용되는 CaCO<sub>3</sub>를 유산균 배양에 이용할 경우, 배양 중 생성되는 유산과 반응하여 배양액 내부의 수소 이온을 제거시킴으로써 배양액 내 pH를 안정화시키게 되고 부반응으로 생성되는 CO<sub>2</sub>는 배양액 내부의 산소 분압을 떨어뜨림과 동시에 혐기적 환경을 제공하여 유산균이 성장하기에 적당한 환경을 제공해 줄 것이다(Lee et al., 1997). 그러나 수용액 내에서 불용성인 특성으로 인하여 배양과정 중 pH 조절용 완충제로 직접 사용하기에는 어려움이 있고, 배양액으로부터 균체와 잔여 CaCO<sub>3</sub>를 분리하기 쉽지 않다. 이러한 CaCO<sub>3</sub>의 특성을 고려하여 유산균의 효율적인 회분식 배양을 위한 완충제로서 alginate를 이용한 고정화된 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 배양액에 도입하면 pH 조절장치와 혐기장치를 사용하지 않는 배양공정이 가능하다(Yu et al., 2002). Alginate는 해조류로부터 추출된 탄수화물로 β-(1,4)-D-mannuronic acid(M)와 α-(1,4)-L-guluronic acid(G)의 잔기로 이루어진 천연고분자로서 Ca<sup>2+</sup> 혹은 Ba<sup>2+</sup>와 같은 2가 이온에 의해 gel을 형성하는 특징을 가지고 있다(Thu et al., 1996). Gel 내에서 2가 이온은 GG 단위에 의해 형성되는 'egg-box' 구조에 결합하여 alginate 분자 사이를 연결하는 가교제 역할을 한다(Dumitriu, 1996).

Starter라는 것은 발효유, cheese, butter 등의 제품 제조 시, 미생물을 사용하는 경우, 그 미생물의 배양액을 말한다. 우리나라 국민들이 가장 선호하는 유제품인 요구르트의 제조에 이용되는 유산균 starter는 국내에서 자체 개발하여 상업적으로 사용된 예가 거의 전무한 실정으로 대부분 Christian Hansen, Danisco AS 등과 같은 외국의 중견회사에서 직접 구입하여 사용하고 있다(Jeon et al., 2007). 본 연구는 산업적으로 이용 가능한 sourdough에서 분리된 exopolysaccharides 생성능이 우수한 유산균(Jung et al., 2008; Jung et al., 2009)을 이용, 직접투입식 starter 제조를

위하여 다양한 CaCO<sub>3</sub> 함량을 가지는 beads를 제조하여 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 물리화학적 특성 및 유산균 증식과의 상관성을 파악하고 이를 이용하여 고농도로 배양된 직접투입식 유산균 분말 starter제조에 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 제조

CaCO<sub>3</sub>-alginate beads는 Ryoo(2006)의 방법을 변형하여 제조하였다. 즉, sodium alginate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 2%(w/v)가 되도록 증류수에 넣어 교반기를 이용하여 충분히 녹인 후 CaCO<sub>3</sub>를 15%와 20%가 되도록 첨가하여 충분히 섞일 때까지 교반하였다. 충분히 섞인 혼합 콜로이드액은 200±10 rpm으로 교반 중인 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 주사기를 이용하여 주사바늘(Gauge 18, 20)로 적하하여 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 제조하였으며, 약 1시간 정도 방치하여 beads를 강화시킨 후 증류수로 3회 세척한 후 사용하였다.

### CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 질량, 직경 및 함유된 CaCO<sub>3</sub> 질량 측정

Beads의 습윤중량(weight of wet beads; W<sub>wet</sub>)은 beads를 거즈(gauze) 주머니에 넣어 탈수기를 이용하여 beads 사이에 잔존하는 수분을 최대한 제거한 후에 무게를 측정하였고, 건조중량(weight of dry beads; W<sub>dry</sub>)은 105°C dry oven에서 항량이 될 때까지 건조한 후에 무게를 측정하였다. Beads의 직경의 크기는 현미경하에서 ocular micrometer와 objective micrometer를 사용하여 측정하였다. Beads에 함유된 CaCO<sub>3</sub>의 질량(weight of CaCO<sub>3</sub> in beads; W<sub>CaCO<sub>3</sub></sub>)은 습윤 beads를 0.1 M의 lactic acid 200 mL에 넣고 충분히 반응시켜 beads 내에 존재하는 CaCO<sub>3</sub>를 유기산과 반응시켜 모두 제거시킨 후에 남은 alginate 격자부분의 건조중량(alginate weight of dry beads; W<sub>alginate</sub>)을 측정하여 beads의 건조중량과 alginate 격자부분의 건조중량과의 차이값으로부터 구하였다. 유기산 반응 후, beads의 감소된 CaCO<sub>3</sub>의 양(decrease of CaCO<sub>3</sub>; D<sub>CaCO<sub>3</sub></sub>)은 beads를 증류수로 세척한 후에 건조중량을 측정하여 반응초기의 beads의 건조중량과의 차이값으로부터 구하였다. 또한 습윤 beads 내로 흡입된 CaCO<sub>3</sub>의 양은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Immobilization efficiency (IE; \%)} = (W_{\text{CaCO}_3} / W_{\text{wet}}) \times 100$$

where W<sub>CaCO<sub>3</sub></sub> : weight of CaCO<sub>3</sub> in beads, W<sub>wet</sub> : weight of wet beads

### Lactic acid에 대한 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 반응특성과 중화효과

Lactic acid를 1,000 mL 증류수에 넣어 산 농도가 전체적

으로 0.1 M인 lactic acid 용액을 제조한 후, 이 용액 200 mL에 습윤중량 3, 6, 9, 12, 15 g의 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 첨가하여 200±10 rpm으로 교반하면서 반응시간에 따른 pH 변화와 bead의 질량변화 및 직경의 크기변화 등을 측정하였다. 또한 lactic acid에 대한 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 반응모델은 습윤입자의 리칭(leaching) 반응모델을 이용하여 다음과 같이 설정하였다(Blancerte-zurita et. al., 1985).

$$K_{p1}^3 = K_{p0}^3 - \{(s \times K_{p0}^3) / (I_E \times C_0)\}$$

where  $K_{p0}^3$  : Initial bead diameter (mm),  $K_{p1}^3$  : Bead diameter after reaction (mm),  $I_E$  : Immobilization efficiency of CaCO<sub>3</sub>,  $C_0$  : Initial weight of beads (g/L),  $s$  : Amounts of the decreased CaCO<sub>3</sub> from surface area (g/L)

### CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 pH neutralizer로 이용한 유산균 배양

Lactobacilli MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 직경이 다른 CaCO<sub>3</sub>-alginate bead를 각각 20%(w/v)가 되게 넣고, sourdough에서 분리한 exopolysaccharides(EPS) 생성균인 *Lactobacillus amylovorus* DU-21과 상업적으로 이용가능한 *Streptococcus thermophilus* St-Body 1(Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark)을 접종[1%, v/v (10<sup>5</sup> CFU/mL)]하여 37°C에서 24시간 배양하면서 3시간 간격으로 pH, 적정산도(titratable acidity; T.A.), 균 증식도(optical density; O.D.)와 생균수(viable cell counts; VCC)를 측정하였다. pH는 pH meter(model 420A; Orion, Boston, MA, USA)로 직접 측정하였으며, AOAC(1995) 방법에 준하여 발효 종료한 발효액 10 g에 멸균 증류수 20 mL와 1% phenolphthalein(Duksan pure chemical Co., Ltd., Ansan, Korea) 용액 2 mL를 첨가한 후 0.1 N NaOH로 적정하여 그 소모량으로 유산 함량을 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \% \text{ acid as lactic acid} \\ & = \{(0.1 \text{ N NaOH required} \times 0.1 \text{ N NaOH factor} \times 0.009) \\ & / \text{weight of sample}\} \times 100 \end{aligned}$$

균 증식도는 spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액의 생균수는 시료를 10-fold dilution 방법으로 희석한 후 BCP agar(Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan)배지를 이용하여 standard plate count method에 준하여 생균수를 측정하였다.

### 고농도 유산균을 이용한 직접 투입식 유산균 starter 제조

*L. amylovorus* DU-21과 *S. thermophilus* St-Body 1을 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads(w/v)가 첨가된 MRS broth에 접종[1%, v/v (10<sup>5</sup> CFU/mL)]하여 37°C에서 24시간 배양한

후, 원심분리(8,000 rpm for 10 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 skim milk 10%(w/v), 15% glycerol로 구성된 기본 보호제 조성물을 첨가하여 균질화 한 다음, -20°C로 동결시킨 후에 동결건조기(DC-55B, Yamato, Tokyo, Japan)에서 건조(-10°C, 9 mm/Torr) 하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화시킨 다음, 0.1% buffered peptone water(Difco)에 10-fold dilution 방법으로 희석한 후 BCP agar 배지를 이용하여 standard plate count method에 준하여 생균수를 측정하였다.

### 통계처리

실험 결과는 SAS 9.1 for window(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 계산하였고, 실험군 간의 비교는 분산분석법(analysis of variance; ANOVA)을 이용하였으며, 분산분석을 실행한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료 간의 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다. 또한 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 이용한 유산균의 고농도 배양 시, pH와 생균수의 상관성과 선형관계는 단순회귀분석법(simple regression)을 이용하여 최소자승추정량(least square estimator; LSE)을 구하여 검증하였다. 이때 회귀모형(regression model)은 다음과 같이 설정하였다(SAS, 1990).

$$Y_i = \alpha + \beta X_i + \varepsilon_i$$

where  $Y_i$  : Dependent variable,  $X_i$  : Independent variable,  $\alpha$  : Constant,  $\varepsilon_i$  : Regression error

## 결과 및 고찰

### CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 질량, 직경 및 함유된 CaCO<sub>3</sub> 질량

다가 양이온과 결합한 불용성 alginate gel은 다양한 공정에 쉽게 적용할 수 있고 재사용이 편리하며 gel 내부에 약물이나 다당과 같은 복합물을 함유할 수 있다(Murata, 2000). 'Egg-box' 모델에서 alginate의 -COOH 원자단은 CaCl<sub>2</sub> 용액의 Ca<sup>2+</sup>와 반응하면서 alginate의 겔화를 일으킨다. Gel을 형성시키는 방법은 크게 두 가지로 구분된다. Alginate 용액 방울을 CaCl<sub>2</sub> 용액에 떨어뜨리면 내/외부가 거의 균일한 beads 구조가 형성되는 반면에, CaCl<sub>2</sub> 용액을 alginate 용액에 떨어뜨릴 경우에는 capsule 구조가 형성된다(Koyama & Seki, 2004).

본 실험에서는 CaCO<sub>3</sub>를 각각 15%와 20% 함유한 alginate 용액을 0.1 M의 CaCl<sub>2</sub> 용액에 주사바늘을 이용하여 떨어뜨려서 직경이 서로 다른 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 제조하였으며, CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 물리적 특성을 Table 1에 제시하였다. 제조된 beads의 직경을 현미경하에서 ocular micrometer과 objective micrometer를 사용하여 측정한 결과,

**Table 1. Properties of CaCO<sub>3</sub>-alginate beads size fraction before and after reaction in 0.1 M 200 mL lactic acid solution**

Bead diameter (mm)	I <sub>E</sub> <sup>1)</sup> (%)	Bead weight <sup>2)</sup> (mg)	CaCO <sub>3</sub> weight <sup>3)</sup> (mg)	Bead numbers <sup>4)</sup>	Surface area <sup>5)</sup> (mm <sup>2</sup> )	Decrease of CaCO <sub>3</sub> <sup>6)</sup> (mg)	Bead diameter (mm)	
							Calculative <sup>7)</sup>	Experimental <sup>8)</sup>
3.01	15	21.93	3.80	45	1280.19	0.789	3.005	2.98
2.41	15	10.83	2.08	82	1495.47	0.631	2.407	2.38
3.15	20	24.07	6.68	49	1526.68	0.851	3.146	3.00
2.60	20	14.78	4.43	73	1549.53	0.702	2.598	2.54

<sup>1)</sup> Immobilization efficiency

<sup>2)</sup> The wet weight of one bead

<sup>3)</sup> The weight of CaCO<sub>3</sub> in one bead

<sup>4)</sup> The number of beads per gram

<sup>5)</sup> Surface area of beads per gram

<sup>6)</sup> The amount of decreased CaCO<sub>3</sub> from one bead after reaction in 0.1 M 200 mL lactic acid solution

<sup>7)</sup> The calculated bead diameter using the mathematical model after reaction in 0.1 M 200 mL lactic acid solution

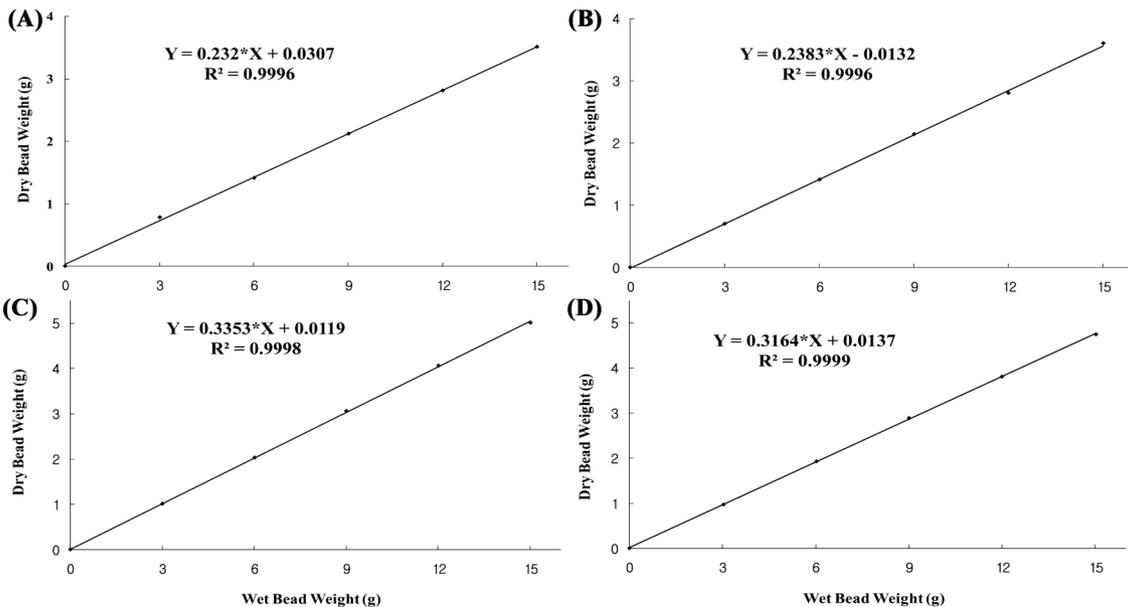
<sup>8)</sup> Experimental bead diameter using a microscope after reaction in 0.1 M 200 mL lactic acid solution

15%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 gauge 18 주사바늘로 제조한 beads의 평균 직경은 3.01±0.022 mm이고, 20%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 gauge 18 주사바늘로 제조한 beads의 평균 직경은 3.15±0.356 mm이었다. 15%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 gauge 21 주사바늘로 제조한 beads의 평균 직경은 2.41±0.146 mm이며, 18%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 gauge 21 주사바늘로 제조한 bead의 평균 직경은 2.6±0.162 mm로 측정되었다. 탈수기를 이용하여 beads 사이에 존재하는 수분을 제거한 후, beads의 질량을 측정된 결과와 105°C dry oven에서 수분을 완전히 제거한 건조중량을 비교한 결과 Fig. 1과 같이 습윤질량이 증가함에 따라 건조중량이 비례적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서의 결과는 제조된 beads의 CaCO<sub>3</sub>, alginate 함량 및 수분 함유율이 beads에 일정하게 고루 분포함을 의미하므로 제조된 beads는 일정한 밀도를 갖는

입자임을 알 수 있었으며, 제조된 습윤 beads 내로 흡입된 CaCO<sub>3</sub>의 양은(immobilization efficiency; IE) 3.01±0.022 mm, 2.41±0.146 mm, 3.15±0.356 mm, 2.6±0.162 mm의 평균 직경을 갖는 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads에서 각각 17.35%, 19.26%, 27.72%, 30.14%이었다. 또한 고정화에 사용된 0.1 M의 CaCl<sub>2</sub>에서 Ca<sup>2+</sup>과 결합하여 젤라틴화는 ‘egg-box’라고 일컫는 사슬의 3차원 망상구조에 의하여 고정화 모양(shape)과 경도(hardness) 등의 특성을 변화시킬 수 있는 alginate gel을 얻을 수 있음을 유추할 수 있었다.

#### Lactic acid에 대한 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 반응특성과 중화효과

0.1 M의 lactic acid 용액 200 mL에 IE 값이 각각 19.26%, 17.35%인 2.41±0.146 mm, 3.01±0.022 mm 직경의



**Fig. 1. Plot of dry weight vs. wet weight. A: 3.01±0.022 mm diameter, B: 2.41±0.146 mm diameter, C: 3.15±0.356 mm diameter, D: 2.6±0.162 mm diameter.**

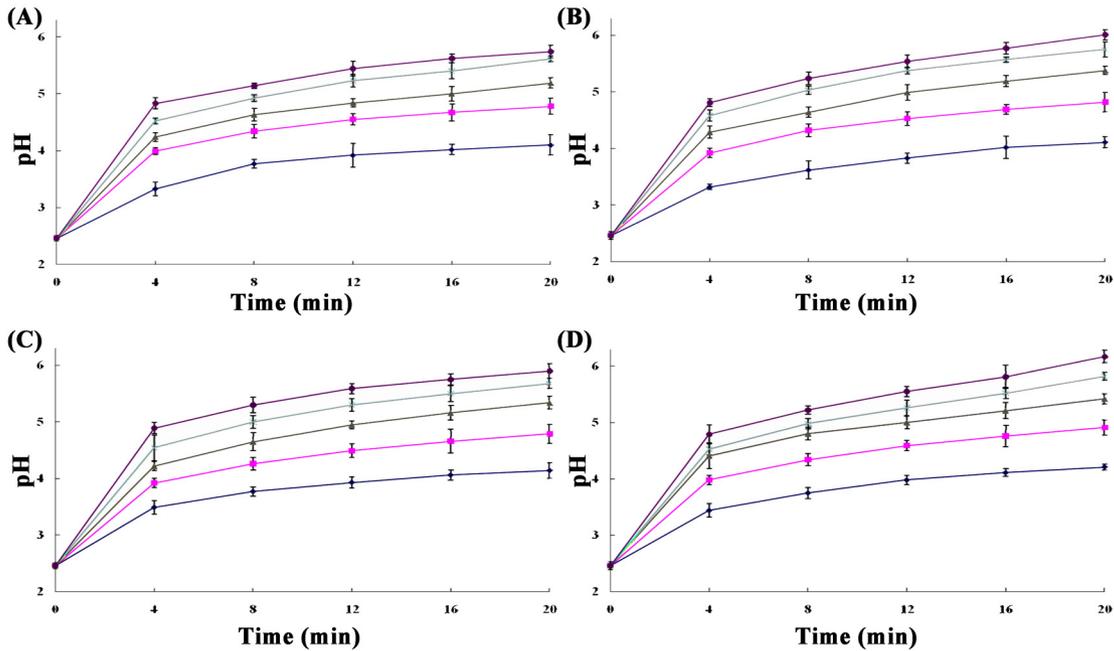


Fig. 2. Change of pH in the 0.1 mole lactic acid solution with the various amounts of  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads.  $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ : 3 g  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacksquare$ - $\blacksquare$ : 6 g  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : 9 g  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\times$ - $\times$ : 12 g  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ : 15 g  $\text{CaCO}_3$  beads. A:  $3.01 \pm 0.022$  mm diameter, B:  $2.41 \pm 0.146$  mm diameter, C:  $3.15 \pm 0.356$  mm diameter, D:  $2.6 \pm 0.162$  mm diameter.

$\text{CaCO}_3$ -alginate beads와 IE 값이 각각 30.14%, 27.72%인  $2.6 \pm 0.162$  mm,  $3.15 \pm 0.356$  mm 직경의  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads를 무게를 달리하여 첨가하여 20분간 lactic acid 용액의 pH 변화를 측정된 결과 Fig. 2와 같이  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 양이 증가함에 따라 용액의 pH가 더 높이 증가함을 알 수 있었다. 3, 6, 9, 12, 15g의  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads가 첨가된 lactic acid 용액에서 초기 4분 이내에 급격한 pH변화가 있었고 그 이후에는 시간이 경과됨에 따라 완만하게 변화하며, IE 값이 각각 다른  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 모두에서 9g 이상이 첨가되었을 때 lactic acid 용액의 pH가 반응 20분 이내에 5.0 이상으로 상승됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은  $\text{CaCO}_3$ 의 중화작용에 기인한 것으로 생각되며, 첨가되는  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 양에 따라 다양한 pH 상승효과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이, bead의 직경이 작을수록 그리고 bead의 IE값이 클수록 더 높은 중화작용을 나타내었다. 이는 bead의 직경이 작아지게 되면 단위 부피당 beads의 표면적이 증가하게 되어 단위 시간당 lactic acid와 반응하는 beads의  $\text{CaCO}_3$ 가 상대적으로 증가하게 되고, 결국 높은 중화작용을 갖게 되는 것으로 생각된다. 또한 beads의 IE값이 큰 경우, lactic acid와 반응할 수 있는 bead 표면의  $\text{CaCO}_3$  함량의 증가가 결국 lactic acid와 반응할 수 있는  $\text{CaCO}_3$  표면적의 증가를 가져오기 때문에 높은 중화작용을 나타내게 되는 것이다. 또한 반응 시간에 따른  $\text{CaCO}_3$  감소량을 반응모델을 적용하여 이론적 bead

직경을 검토한 결과 실험값과 큰 차이가 없었다. 이것은 lactic acid가  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 내부로 자유롭게 확산될 수 있음을 나타내주고 있다.

$\text{CaCO}_3$ 의 물에 대한 용해도는  $25^\circ\text{C}$ 의 경우,  $1.4 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 이지만, 산성용액에서는  $\text{CO}_2$ 를 발생하면서 녹게 된다.  $\text{CaCO}_3$ 는  $\text{CaCO}_3 = \text{CaO} + \text{CO}_2$ 로 분해되고 반응생성물인 CaO는 물과 반응하여  $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca(OH)}_2$ 로 되어 강알칼리를 생성한다(Rhee & Lee, 1994). 생성된 알칼리로 인하여 lactic acid는 calcium lactate와 물로 중화됨을 추측할 수 있다. 또한  $\text{CaCO}_3$ 는 lactic acid를 일시에 중화시키는 것이 아니라 서서히 녹아 나와 중화시킴을 알 수 있다. 또한 lactic acid 반응 후,  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 모양을 관찰한 결과 Fig. 3과 같이 lactic acid에 대한  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 반응은 표면으로부터 일어나기 시작하여 내부로 진행됨을 알 수 있다.  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 내부에서 일어나는 반응은 외부에 의한 확산으로 침투되는 lactic acid가  $\text{CaCO}_3$ 와 반응에 의한 반응물로  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 외부로 확산되는 과정을 이룬다. 그러나  $\text{CaCO}_3$  체적과 담체의 체적비가 적합하지 않은 경우,  $\text{CaCO}_3$ 의 확산이 저해되거나 또는  $\text{CaCO}_3$ 가 물리적 장해 및 beads 내부에서 농도분포가 다르다면 beads 내부에서 부분적으로 반응방법이 달라지므로 beads 중심 부근의  $\text{CaCO}_3$ 가 효과적으로 이용되지 못한다. 또한 alginate gel은 가교제인 2가 이온의 유출로 인해 gel의 강도 약화, 확산속도의 증가 및 matrix disintegration 등의 문제점을 가지고 있다(Murata et al., 1993). 최근에 양이온

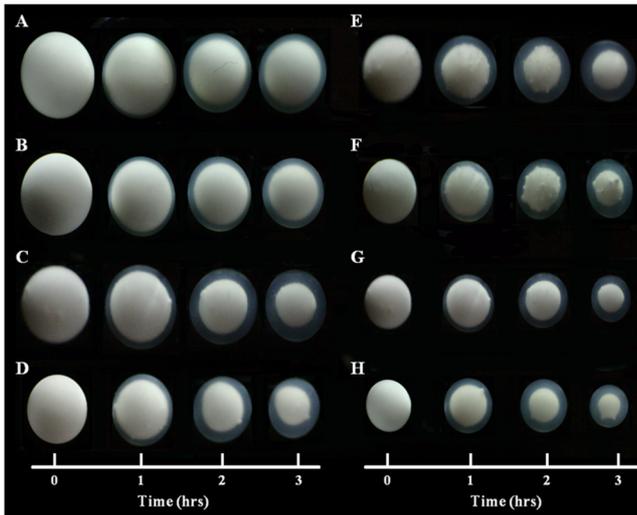


Fig. 3. The size change of  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads before and after lactic acid reaction. A: 3.62 mm diameter, B: 3.45 mm diameter, C: 3.31 mm diameter, D: 2.89 mm diameter, E: 2.80 mm diameter, F: 2.37 mm diameter, G: 2.14 mm diameter, H: 2.13 mm diameter.

천연고분자인 chitosan에 의해 alginate gel 표면을 캡슐화하는 것이 gel matrix의 안정성을 향상시킬 수 있고, gel 내부에 봉입된 물질의 확산속도를 제어할 수 있음이 연구 보고되고 있다(Cho, 2001).

본 실험에서의 결과와 같이  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 양의 증가는 결국 lactic acid와 반응할 수 있는  $\text{CaCO}_3$  표면적의 증가를 가져오게 되며, 단위시간당 lactic acid와 반응하는  $\text{CaCO}_3$ 의 상대적 증가를 가져오기 때문에  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads 양의 증가는 lactic acid 용액 내부의 중화작용의 증가를 가져오게 된다. 따라서 제조된  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 직경이 다르더라도 전체표면적을 같게  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads의 양을 조정하면 같은 중화효과를 나타내리라 사료된다. 그러므로  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads를 pH neutralizer로 이용하여 유산균을 배양하기 위하여 beads를 제조할 때 가능한 직경을 작게하고, 내부의  $\text{CaCO}_3$  함량을 높게하면, 단위 부피당 넓은 표면적과 높은 중화작용을 가지는  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads를 얻을 수 있다고 사료된다. 그러나 가능한 작은 직경의 beads를 사용하는 것이 바람직하지만 직경이 너무 작을 경우에는 배양 후, 배양액 내 균체로부터 완전히 회수하는데 어려움이 있으므로 어느 정도 큰 직경을 갖는 것을 사용하는 것이 더 효율적일 것이다.

#### $\text{CaCO}_3$ -alginate beads를 pH neutralizer로 이용한 유산균 배양

$\text{CaCO}_3$ -alginate beads를 20% (w/v) 첨가한 MRS broth 배지에 *Streptococcus thermophilus* ST-Body 1과 *Lactobacillus amylovorus* DU-21을 배양하면서 배양액 내 pH 변화, 적정산도 및 증식도를 조사하여  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads가 첨가되

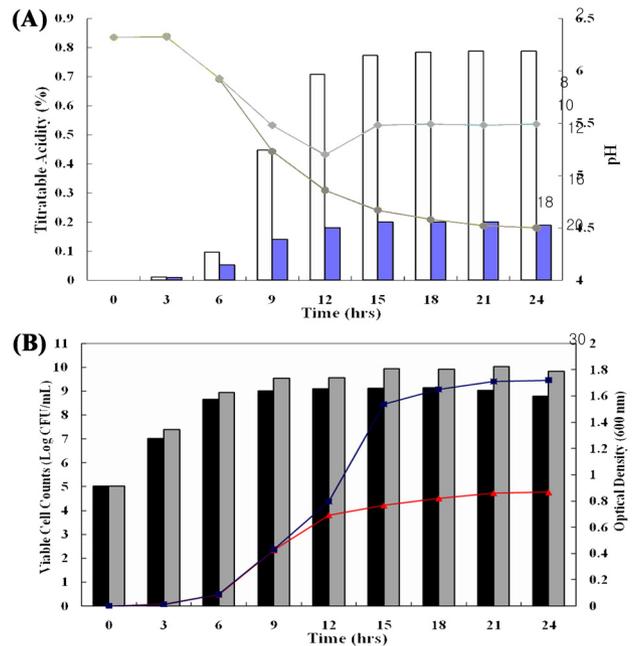


Fig. 4. The growth of *Streptococcus thermophilus* ST-Body 1 in MRS broth with and without  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads (Diameter:  $2.6 \pm 0.162$  mm, IE value: 30.14%).  $\blacklozenge - \blacklozenge$ : pH change in MRS broth with 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\bullet - \bullet$ : pH change in MRS broth without 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacksquare$ : %TA value in MRS broth with 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\square$ : %TA value in MRS broth without  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacksquare - \blacksquare$ : growth of *S. thermophilus* ST-Body 1 in MRS broth with 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacktriangle - \blacktriangle$ : growth of *S. thermophilus* ST-Body 1 in MRS broth without 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacksquare$ : viable cell count in MRS broth with  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads,  $\blacksquare$ : viable cell count in MRS broth without 20%  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads.

지 않은 MRS broth 배지에서 배양된 것과 비교해 본 결과 Fig. 4, 5와 같은 결과를 얻었다.

*S. thermophilus* ST-Body 1의 경우 무첨가구에서 MRS broth의 pH는 약  $4.5 \pm 0.12$ 까지 떨어졌고, 적정산도는 약  $0.787 \pm 0.010\%$ 까지 증가하였으며, 균 증식도는 O.D. 값이  $0.867 \pm 0.009$ 까지 도달하였고 생균수는  $8.78 \pm 0.026$  Log CFU/mL이었으나,  $\text{CaCO}_3$ -alginate beads가 20%(w/v) 첨가된 MRS broth의 pH는 약  $4.86 \pm 0.12$ 까지 떨어지다  $5.49 \pm 0.07$ 까지 상승하였으며, 적정산도는 약  $0.19 \pm 0.015\%$ 까지 증가하였다. 균 증식도는 O.D. 값이  $1.720 \pm 0.010$ 까지 도달하였고 생균수는  $9.83 \pm 0.019$  Log CFU/mL이었다. *L. amylovorus* DU-21의 경우 무첨가구에서 MRS broth의 pH는 약  $4.06 \pm 0.10$ 까지 떨어졌고, 적정산도는 약  $1.192 \pm 0.012\%$ 까지 증가하였으며, 균 증식도는 O.D. 값이  $1.493 \pm 0.015$ 까지 도달하였고 생균수는  $8.980 \pm 0.019$  Log CFU/mL이었으나,  $\text{CaCO}_3$ -alginate bead가 20%(w/v) 첨가된 MRS broth의 pH는 약  $5.08 \pm 0.10$ 까지 떨어진 후 다시  $5.52 \pm 0.12$ 까지 상승하였다. 적정산도는 약  $0.19 \pm 0.010\%$ 까지 증가하였으며, 균

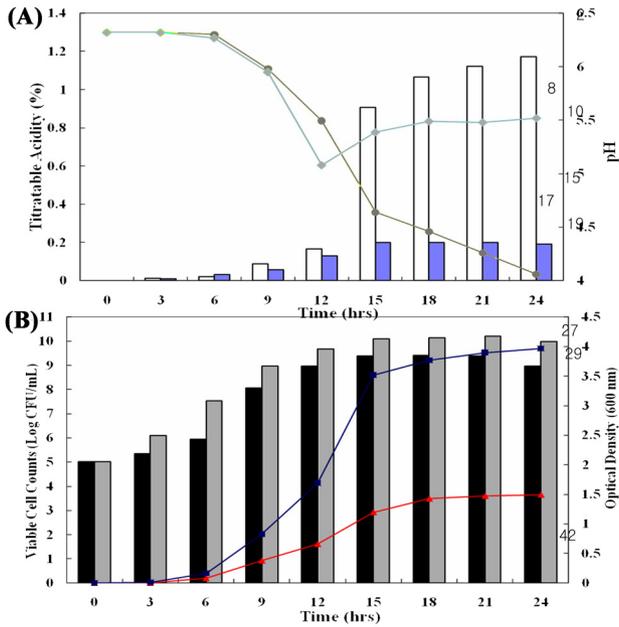


Fig. 5. The growth of *Lactobacillus amylovorus* DU-21 in MRS broth with and without CaCO<sub>3</sub>-alginate beads (Diameter: 2.6±0.162 mm, IE value: 30.14%). ◆ - ◆ : pH change in MRS broth with 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ● - ● : pH change in MRS broth without 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ■ : %TA value in MRS broth with 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, □ : %TA value in MRS broth without CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ■ - ■ : growth of *L. amylovorus* DU-21 in MRS broth with 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ▲ - ▲ : growth of *L. amylovorus* DU-21 in MRS broth without 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ■ : viable cell count in MRS broth with 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads, ■ : viable cell count in MRS broth without 20% CaCO<sub>3</sub>-alginate beads.

증식도는 O.D. 값이 3.79±0.011까지 도달하였고 생균수는 9.996±0.011 Log CFU/mL이었다.

CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 이용한 유산균의 고농도 배양

시, pH와 생균수의 상관성과 선형관계를 단순회귀분석법 (simple regression)을 이용하여 최소자승추정량(least square estimator; LSE)을 구하여 검증한 결과, 구하여진 회귀모형은 *S. thermophilus* ST-Body 1의 경우, 무첨가구는  $Y = 15.79802 - 1.43588 \times X$ , 첨가구는  $Y = 29.32259 - 3.58846 \times X$ 이었다. *L. amylovorus* DU-21의 경우, 무첨가구의 회귀모형은  $Y = 16.74030 - 1.67553 \times X$ , 첨가구는  $Y = 29.81048 - 3.67825 \times X$ 이었다. 각 X의 회귀계수의 값은 통계적으로 유의한 결과( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )를 보였다(Table 2). Table 2에서 보는 바와 같이, R<sup>2</sup> 값은 *S. thermophilus* ST-Body 1의 경우, 무첨가구에서는 0.6310, 첨가구에서는 0.7505이었다. *L. amylovorus* DU-21의 경우, 무첨가구에서는 0.7452, 첨가구에서는 0.7609이었다. 이는 구하여진 회귀선이 Y의 변동을 각각 63.10%, 75.05%, 74.52%, 76.09% 정도 설명하고 있음을 나타내므로 pH가 균 증식에 다소나마 영향을 주는 것으로 보여진다. 그러나 생균수 측정 시 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 20%(w/v) 첨가로 인하여 *S. thermophilus* ST-Body 1과 *L. amylovorus* DU-21의 균 증식도는 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads가 첨가되지 않은 대조구보다 생균수가 각각 4.70±1.75, 11.47±2.85배씩 증가하였음을 확인할 수 있었다.

유산균 배양액은 각종 수용성 성분이 녹아 있는 다양한 반응계를 이루고 있다. 유산균에 의하여 생성된 lactic acid (CH<sub>3</sub>CHOHCOOH)는 H<sup>+</sup> + CH<sub>3</sub>CHOHCOO<sup>-</sup>로 화학적 평형을 이루고, 이들 중 CH<sub>3</sub>CHOHCOO<sup>-</sup> 이온은 염기로서 물과 반응하여 다시 산(CH<sub>3</sub>CHOHCOOH)과 염기(OH<sup>-</sup>)로 가수분해되어 평형을 이루게 된다(Kang et al., 1981). 본 실험에서 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 첨가는 유산균의 고농도 배양에 매우 효과적이었다. 특히 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 첨가구에서는 12시간 이후에 완충효과로 판단되는 현상이 나타

Table 2. Results of linear regression analyses of pH vs. viable cell counts during the fermentation period<sup>1)</sup>

Model <sup>2)</sup>	R	R-Square	Adjusted R-Square	Coefficients		t-value	Significance <sup>3)</sup>	
				Parameter Estimate	Standard Error			
MSTWO	0.7944	0.6310	0.5783	Constant	15.79802	2.18512	7.23	0.0002**
				X <sub>i</sub>	-1.43588	0.41499	-3.46	0.0105*
MSTW20	0.8663	0.7505	0.7149	Constant	29.32259	4.45776	6.58	0.0003**
				X <sub>i</sub>	-3.58846	0.78199	-4.59	0.0025**
MLAWO	0.8632	0.7452	0.7088	Constant	16.74030	1.99626	8.39	0.0001**
				X <sub>i</sub>	-1.67553	0.37031	-4.52	0.0027**
MLAW20	0.8723	0.7609	0.7267	Constant	29.81048	4.49888	6.63	0.0003**
				X <sub>i</sub>	-3.67825	0.77932	-4.72	0.0022**

<sup>1)</sup> Dependent variable : Y

<sup>2)</sup> MSTWO: MRS broth fermented with *Streptococcus thermophilus* St-Body 1 without CaCO<sub>3</sub>-alginate beads (Diameter: 2.6±0.162 mm, IE value: 30.14%), MSTW20: MRS broth fermented with *Streptococcus thermophilus* St-Body 1 with CaCO<sub>3</sub>-alginate beads (Diameter: 2.6±0.162 mm, IE value: 30.14%), MLAWO: MRS broth fermented with *Lactobacillus amylovorus* DU-21 without CaCO<sub>3</sub>-alginate beads (Diameter: 2.6±0.162 mm, IE value: 30.14%), MLAW20: MRS broth fermented with *Lactobacillus amylovorus* DU-21 with CaCO<sub>3</sub>-alginate beads (Diameter: 2.6±0.162 mm, IE value: 30.14%)

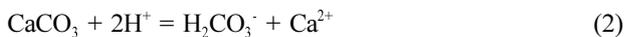
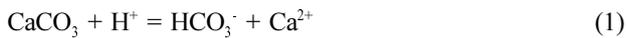
<sup>3)</sup> \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

**Table 3. Survival rate of *Streptococcus thermophilus* ST-Body 1 and *Lactobacillus amylovorus* DU-21 in freeze-dry using the skim milk and 15% glycerol as cryoprotectant**

Strains	Cryoprotectant	Viable count (Log CFU/mL) <sup>1)</sup>		Survival rate (%)
		Before freeze-dry	After freeze-dry	
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-Body 1	10% Skim milk	8.97±0.265	8.73±0.015	57.10±2.02
	15% Glycerol	8.97±0.265	8.93±0.006	91.96±1.35
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DU-21	10% Skim milk	10.06±0.094	9.84±0.006	60.01±0.77
	15% Glycerol	10.06±0.094	10.01±0.021	89.09±4.49

<sup>1)</sup> Mean±S.D. of six replications

났다. Fig. 4와 5의 pH와 O.D.의 측정결과에서 보듯이 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 첨가구에서는 pH의 감소가 현저히 지연되는 반면 O.D.에서는 pH와 역의 현상으로 첨가구에서 높은 O.D.를 보이고 있다. 이러한 현상은 CaCO<sub>3</sub>의 용해가 주원인으로 예상된다. CaCO<sub>3</sub>의 용해반응은 다음과 같다.



이때 식 (1)은 pH가 6.3 이상일 때 일어나며, 식 (2)는 pH 6.3 미만일 때 일어난다(Kim et al., 1997). 실험 결과 12시간 이후에 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 첨가구에서 완충효과가 나타나는 현상은 CaCO<sub>3</sub>가 발효에 의해 생성된 lactic acid를 중화시켜 calcium lactate(Ca(CH<sub>3</sub>CHOHCOO)<sub>2</sub>)를 생성함으로써 완충작용을 하는데 기여한다고 사료된다. 또한 완충작용이 발효 후기에 두드러지게 나타나는 현상으로 보아 발효 초기에는 중화작용을 주로 하고 중화반응에서 생성된 calcium lactate의 양이 많아지면 후기에 완충효과를 나타내는 것이 아닌가 생각된다.

고농도 유산균을 이용한 직접 투입식 유산균 starter 제조

동결건조된 starter에 있어서 생존수 함량이 가장 중요한 것이므로, 이것을 높이기 위하여 여러가지 세포보호 물질을 첨가하고 있다. Table 3은 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 20% (w/v) 첨가에 의해 고농도로 배양된 *S. thermophilus* ST-Body 1과 *L. amylovorus* DU-21 균주를 동결건조 보호제로서 skim milk 10%(w/v)와 15% glycerol을 이용하여 동결건조시켰을 때, 생존율을 나타낸 결과이다.

동결건조 보호제로서 skim milk를 이용한 결과 *S. thermophilus* ST-Body 1과 *L. amylovorus* DU-21 균주의 생존율이 각각 57.10±2.02%와 60.01±0.774%였으며, 15% glycerol을 동결건조 보호제로 이용한 경우, 91.96±1.35%와 89.09±4.49%의 생존율을 보였다. Leach & Scott(1959)가 starter 조제에 사용되는 동해방지제의 작용과 농도조건에 관하여 제시한 내용은 고형분 함유도가 높은 물질들이 동해방지 효과를 크게 나타내며 이들은 삼투성 완충제로 수

분이 동결 건조된 세포 내로 출입하는 것을 조절하는 능력에서 기인된다고 보고하였다. 또한 재환원매체의 종류에 따라 생존율이 변화한다고 보고되었다(De Valdez et al., 1986). 근래에 와서 starter 이용기술의 발전과 더불어 재래식 starter 이용기법에서 발전된 양식으로 직접투입식 starter 이용방법으로 대체되고 있다. 직접투입식 starter 활용에 의하여 starter 조제와 관여되는 인력을 감소시킬 수 있으며, 중온성 유산 균에서 빈발하는 bacteriophage 오염을 예방하는 효과도 기대될 수 있고, 발효산업에서 일반적으로 문제되는 오염사고 빈도를 저하시킬 수 있는 장점도 있다(Tiemin et al., 2005). 본 연구를 통하여 확립된 기법은 probiotics 조제나 정장제 조제방법에 있어서도 공히 적용 가능하므로 미생물 세포의 이용기법으로 그 생존율과 발효에 연관되는 기능보존과 수반되는 여러 분야에 적용한다는 면에서 산업적으로 중요하다 사료된다.

## 요 약

유산균을 고농도로 배양하기 위하여 CaCO<sub>3</sub>를 각각 15%와 20%씩 첨가하여 직경이 서로 다른 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 제조한 후, lactic acid에 대한 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 반응 특성과 완충효과를 관찰하였으며, lactic acid에 대하여 완충작용이 있는 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 이용하여 *S. thermophilus* ST-Body 1과 *L. amylovorus* DU-21을 고농도로 배양하여 직접투입식 starter를 제조하였다.

본 연구에서 제조된 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads는 CaCO<sub>3</sub>, alginate 함량 및 수분 함유율이 beads에 일정하게 고루 분포되어 있으며, 일정한 밀도를 갖는 입자임을 알 수 있었다. 또한 lactic acid에 대한 beads의 반응은 표면으로부터 일어나기 시작하여 내부로 진행됨을 확인하였으며, CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 양의 증가는 결국 lactic acid와 반응할 수 있는 CaCO<sub>3</sub> 표면적의 증가를 가져오게 되며, 단위시간당 lactic acid와 반응하는 CaCO<sub>3</sub>의 상대적 증가를 가져오기 때문에 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 양의 증가는 lactic acid 용액 내부의 중화작용의 증가를 가져온다는 것을 확인하였다. 즉, CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 직경이 작을수록, 내부의 CaCO<sub>3</sub> 함량이 높을수록, 단위 부피당 넓은 표면적과 높은 중화작용

을 가지므로 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 pH neutralizer로 이용하여 유산균을 배양할 경우에는 CaCO<sub>3</sub> 함량이 높고 직경이 작은 CaCO<sub>3</sub>-alginate beads의 이용이 유산균 배양에 효과적임을 알 수 있었다.

CaCO<sub>3</sub>-alginate beads를 이용한 유산균의 고농도 배양 시, pH와 생균수와의 상관성과 선형관계를 단순회귀분석법 (simple regression)을 이용하여 최소자승추정량(least square estimator; LSE)을 구하여 검증한 결과, 각 X의 회귀계수의 값은 통계적으로 유의한 결과( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )를 보였다. 또한 R<sup>2</sup> 값은 *S. thermophilus* ST-Body 1와 *L. amylovorus* DU-21의 경우, CaCO<sub>3</sub>-alginate beads 무첨가구와 첨가구에서 각각 0.6310, 0.7505, 0.7452, 0.7609이었다. 이는 pH가 균 증식에 다소나마 영향을 주는 것을 나타낸다. 고농도로 배양된 *S. thermophilus* ST-Body 1과 *L. amylovorus* DU-21 균주를 이용하여 직접투입식 starter를 제조한 결과, 동결건조 보호제로 15% glycerol을 이용하였을 때 각각 91.96±1.35%와 89.09±4.49%의 생존율을 보였다.

본 연구에서 확립된 기법은 probiotics 조제나 정장제 조제방법에 있어서도 공히 적용 가능하므로 미생물 세포의 이용기법으로 그 생존율과 발효에 연관되는 기능보존과 수반되는 여러 분야에 적용한다는 면에서 산업적으로 중요하다고 사료된다.

## 참고문헌

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington DC, USA, pp. 988-989.
- Blancerte-zurita, MA, Branion RMR, Lawrence RW. 1985. Particle size effects in the microbiological leaching of sulfide concentrates by thiobacillus ferrooxidans. Biotech. Bioeng. 28: 751-755.
- Christian C, Madec MN, Patrick B. 1992. Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 53: 189-198.
- Cho AR. 2001. Preparation and characterization of alginate-chitosan microsphere for controlled delivery of silver sulfadiazine. J. Kor. Pharm. Sci. 31: 101-106.
- De Valdez G, De GiorideRuiz HF, Oliver G. 1986. Composition of the recovery medium and its influence on the survival of freeze-dried lactic acid bacteria. Milchwissenschaft 41: 286-288.
- Dumitriu S. 1996. Polysaccharides in Medicinal Chemistry. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 197-198.
- Ha DM. 2002. Food Microbiology. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea, pp. 221-272.
- Jeon SR, Song TS, Kim JY, Shin WC, Her SW, Yoon SS. 2007. Identification and characterization of lactic acid bacteria starters isolated from the commercial drink-yogurt products. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 27: 509-516.
- Jung SW, Kim WJ, Lee KG, Kim CW, Noh WS. 2008. Fermentation characteristics of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from sourdough and assessment of the isolates for industrial potential. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 1266-1273.
- Jung SW, Kim WJ, Lee KG, Kim CW, Noh WS. 2009. Isolation and identification of lactic acid bacteria from sourdough with high exopolysaccharide production ability. Food Sci. Biotechnol. 18: 384-389.
- Kang IK, Kwon SJ, Kim JH, Kim CW, Park KC, Park NH, Oh SH, Jung HC, Han DS. 1981. Basic chemistry. In: Acid, Base and Buffer Agent. Hyung Seoul Publishing Co., Seoul, Korea, pp. 294-296.
- Kim SD, Kim MH, Kim MK, Kim ID. 1997. Neutralization and buffer effect of crab shell power in Kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 569-574.
- Koyama K, Seki M. 2004. Evaluation of mass-transfer characteristics in alginate-membrane liquid-core capsules prepared using polyethylene glycol. J. Biosci. Bioeng. 98: 114-121.
- Leach RH, Scott WJ. 1959. The influence of rehydration medium on viability of dried microorganisms. J. Gen. Microbiol. 21: 295-307.
- Lee KY, Hwang IB, Heo TR. 1997. Enhancement of cultivation efficiency of *Bifidobacterium longum* using calcium carbonate buffer system. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 126-132.
- Murata Y, Sasaki N, Miyamoto E, Kawashima S. 2000. Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50: 221-226.
- Murata Y, Nakada K, Miyamoto E, Kawashima S, Seo SH. 1993. Influence of erosion of calcium-induced alginate gel matrix on the release of brilliant blue. J. Control Release 23: 21-26.
- Open U, Thames P. 1992. The effect pH on growth. In: In Vitro Cultivation of Microorganisms. Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House, Jordan Hill, Oxford, UK, pp. 35-36.
- Rhee HS, Lee GJ. 1994. Effects of preheating treatment and chitosan addition on the textural properties of Korean radish during salting. Korean J. Dietary Culture. 9: 53-59.
- Ryoo HJ. 2006. Lactic acid fermentation characteristics of liquorice extract by the immobilized lactic acid. PhD thesis, Dongguk University, Seoul, Korea.
- Salle AJ. 1961. Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Inc., New York, NY, USA, pp. 236-237.
- SAS Institute Inc. 1990. SAS User's Guide. Statistical Analysis System institute, Cary, NC, USA.
- Shuler ML, Kargi F. 2000. Bioprocess Engineering. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA, pp. 185-186.
- Tiemin J, Xin S, Jian W, Lijun C, Weiming Z. 2005. Discuss on the propagation of lactic acid bacteria for preparation of direct vat inoculation. Food Ferment. Ind. 31: 112-114.
- Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smids d O, Soon-Shing P, Skj k-Bræk. 1996. Alginate polycation microcapsules. Biomaterials 17: 1031-1040.
- Yu WK, Kim JY, Lee KY, Heo TR. 2002. High cell density cultivation of *Bifidobacterium longum* using a calcium carbonate-alginate beads system. J. Microbiol. Biotechnol. 12: 444-448.