

## Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu

Recep Palamutoğlu<sup>1, ✉</sup>, Cemalettin Sarıçoban<sup>2</sup><sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Afyonkarahisar<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya

Geliş Tarihi (Received): 16.10.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 10.02.2013

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [rpalamutoglu@aku.edu.tr](mailto:rpalamutoglu@aku.edu.tr) (R. Palamutoğlu)

☎ 0 272 246 28 34-176 📠 0 272 246 28 69

### ÖZET

Probiyotik mikroorganizmalar birçok gıdada mevcut olup aynı zamanda farklı gıda ürünlerinin üretiminde kullanılan insan sağlığına yararlı etkileri olan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar gıdaların işlenmesi, muhafazası ve tüketilmeleri esnasında maruz kaldıkları çeşitli çevre koşulları sonucunda insan gastrointestinal sistemine ya ulaşmamakta ya da ulaştıklarında etkili olamamaktadırlar. Bu amaçla probiyotik mikroorganizmaların gıda işleme, muhafaza ve gastrointestinal sisteme ulaşma basamaklarında canlılıklarını sürdürebilmelerini sağlamak üzere mikroenkapsülasyon tekniği uygulanmaktadır. Bu derlemede, probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyon yöntemleri, kaplama materyalleri, kaplama materyali seçiminde dikkat edilecek hususlar ve probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunu etkileyen faktörler ele alınmaktadır. Son yıllarda mikroenkapsülasyon üzerinde oldukça fazla çalışma gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalar daha da ileriye götürülerek probiyotik mikroorganizmaların kullanılabilmesi için yeni ürünler geliştirilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Probiyotik, Mikroenkapsülasyon

### Microencapsulation of Probiotic Microorganisms

#### ABSTRACT

Probiotic bacteria are present in many foods as well as used in the production of different food products, which have beneficial effects on human health. These microorganisms cannot reach to human gastrointestinal tract or cannot be effective because of the environmental conditions during food processing, preservation and consumption. For this purpose, microencapsulation technique is applied to probiotic microorganisms to maintain their viability during food processing, preservation and access to the gastrointestinal system. This review includes methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, coating materials, criteria in the selection of coating materials and the factors that influence the effectiveness of probiotic microencapsulation. In recent years, many studies are carried out on microencapsulation. Further studies are needed to develop new products where microencapsulated microorganisms can be used.

**Key Words:** Probiotic, Microencapsulation

#### GİRİŞ

Probiyotikler sindirim sistemi mikrobiyal dengesini sağlayan sağlığa yararlı bakteri, maya ve diğer mikroorganizmalardır. Birçok gıda ürünü ve gıda destekleri mikroorganizmaların bu canlı kültürlerini

içermektedir ve kalın bağırsakta çoğalarak yararlı bakteri gelişimini sağlamakta, bağırsıklık sistemini desteklemekte, besin ögesi emilimini artırmakta ve kanser riskini azaltmaktadırlar.

Bakteriler, gıda ürünleri içerisinde bulunan veya işlemler sırasında maruz kaldıkları nem, sıcaklık, oksijen veya basınç gibi şartlara genellikle duyarlıdır. Mikroenkapsülasyon, bakterileri bu şartlara karşı koruduğu gibi iletimlerine de yardımcı olmaktadır. Mikroenkapsüle probiyotiklerden yeni pazarlar oluşturması beklenmezken, ancak probiyotiklerin farklı gıda ürünlerine ve gıda desteklerine eklenmesi veya daha önce mevcut olmayan bakteri zincirlerinin ilave edilmeleri ile yeni pazarlar oluşturmaktadırlar. Mikroenkapsülasyonun gıda destek pazarında ilk yararı tablet oluşturmada probiyotiklerin canlılık oranlarını artırmasıyla cazip hale gelmesidir [1]. Probiyotik kullanımını kısıtlayan teknolojik ve metabolik engellerin ortadan kaldırılabilmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir. Mikroenkapsülasyon tekniği probiyotik mikroorganizmaların canlı kalma sürelerini arttırmak için son yıllarda üzerinde önemle durulan bir yöntemdir [2].

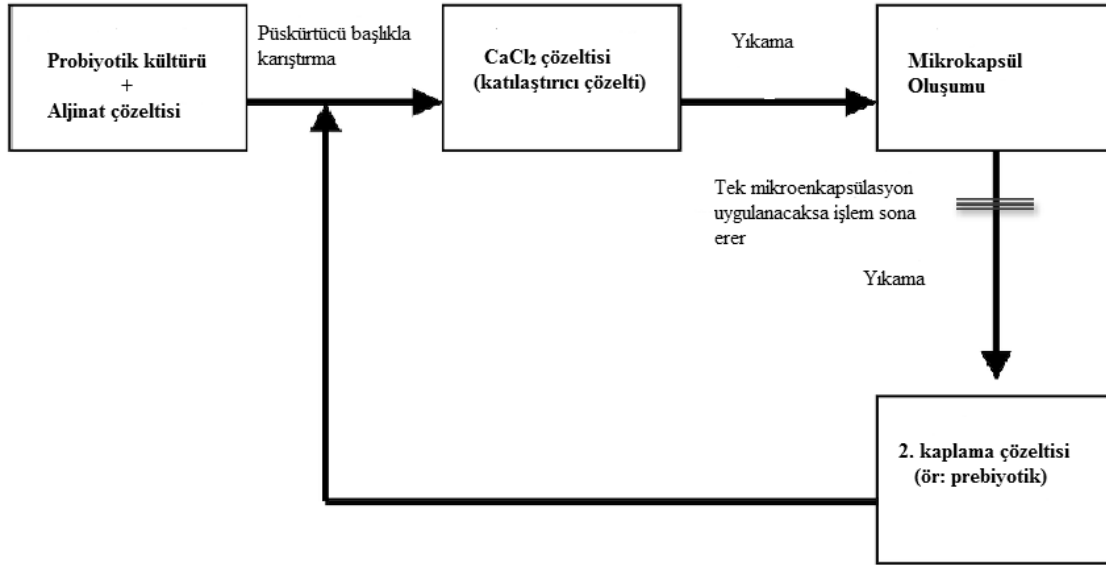
## MİKROENKAPSÜLASYON

Biyokütle veya süt ürünleri üretiminde kullanılan probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu fizikomekanik ve

fizikokimyasal olarak iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Probiyotikler sprey-kurutma tekniğini içeren fizikomekanik işlemler sırasında gaz fazında enkapsüle edilirken, ekstrüzyon ve emülsiyon tekniklerini içeren taneciklerin termal veya iyonotropik jelleşme ile sıvı içerisinde enkapsüle edilmektedirler. Bu üç teknik de probiyotiklerin canlılıklarını %90'ın üzerine çıkarmaktadır [1]. Ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1).

## Ekstrüzyon ve Emülsiyon Teknikleri

Ekstrüzyon tekniği hidrokolloitlerle kapsül yapımında kullanılan en eski ve en yaygın yöntemdir. Bu yöntemde sertleştirici çözelti içerisinde hazırlanan koloid çözeltisinin damlalar halinde enjekte edilmesiyle kapsüller elde edilmektedir. Ekstrüzyon tekniğinde destekleyici materyal olarak, alglerden ekstrakte edilen ve D-mannuronik ile L-guluronik asitten ibaret bir heteropolisakkarit olan aljinat kullanılmaktadır.



Şekil 1. Ekstrüzyon prosesinin akış şeması [3]

Emülsiyon tekniğinde hazırlanan polimer çözeltisi (sürekli olmayan faz) soya, ayçiçeği, kanola ve mısır yağı gibi sıvı yağlar (sürekli faz) içerisine eklenmektedir. Hazırlanan bu karışım yağda su emülsiyonu haline gelmesi için homojenize edilmektedir. Suda çözünen polimer çözeltisinin yağ fazı içerisinde çözünmeyen küçük jel formuna dönüşmesi gerekir. Bunun için hazırlanan su/yağ emülsiyonu bir süre bekletilmektedir. Emülsiyonun iç faz partikül boyutu ne kadar küçük olursa oluşan mikrokapsüller de o kadar küçük olmaktadır. Oluşan fazın çözünmezliği kullanılan destekleyici materyale bağlı olarak değişmektedir. Elde edilen kapsüller filtrasyonla sıvı çözeltiden ayrılmaktadır. Kapsül boyutu 25 µm ile 2 mm arasında değişmektedir. Emülsiyon tekniğinde destekleyici materyal olarak karragenan, keçiyoynuzu zamkı, selüloz asetat fitalat, aljinat, kitosan ve jelâtin kullanılmaktadır [4].

## Ko-Enkapsülasyon

Probiyotiklerin ilave edilmesi probiyotik aktivitesini daha da arttırmak için alternatif bir yöntemdir. Probiyotiklere örnek olarak, fruktooligosakkaritler, izomaltooligosakkaritler ve laktuloz verilebilir. Oligosakkaritlerin yapıları farklı olduğundan her bir probiyotiğin fonksiyonelliği farklıdır. Probiyotik takviyesi probiyotiklerin gelişmesine önemli ölçüde yardımcı olmaktadır. Aljinat ve probiyotikler kullanılarak uygulanan işleme ko-enkapsülasyon adı verilmektedir [3]. Mikroorganizmaların ve probiyotikler gibi diğer önemli bileşenlerin ko-enkapsülasyonu sinbiyoz sayesinde probiyotikleri gıda sistemlerinde ve sindirim sisteminde daha iyi korumaktadır [5].

## Çift Mikroenkapsülasyon

Ko-enkapsülasyonun daha ileri modifikasyonu bakteriyel hücrelerini koruyucu özellikleri artırılabilir. Örneğin, ko-enkapsüle mikrokapsüller (probiyotik+aljinat+prebiyotik içeren) kitosan, aljinat veya karragenan gibi diğer kaplama materyalleri kullanılıp geliştirilerek çift mikroenkapsülasyon gerçekleştirilmiş olmaktadır.

Çift mikroenkapsülasyon tekniğine ilave koruyucu özellik kazandırılması daha önceki yöntemlere karşı da avantaj sağlamaktadır. Prebiyotikler karbonhidrat kaynağı sağlarken aljinat mikrokapsülde probiyotikleri korumakta ve ilave polimerlerde probiyotiklerin yüzeyinin tamamen kaplanmasını sağlar [3].

## PROBİYOTİK HÜCRELERİN MİKROENKAPSÜLASYONUNDA KULLANILAN KAPLAMA MATERYALLERİ

Farklı tip ve özelliklerdeki katılar, sıvılar ve gazların enkapsüle edilmesinde veya kaplanmasında çok çeşitli materyaller kullanılabilir. Bununla beraber gıda katkıları için kanunlar farmasötikler gibi konulardan daha katıdır. Farklı bileşenler ilaç mikroenkapsülasyonu için kabul edilmektedir, fakat gıda endüstrisinde izin verilmemektedir. Çünkü bu materyallerin çoğu gıda uygulamaları için GRAS materyaller olarak sertifikalandırılmıştır. Bütün gıda prosesleri Avrupa'da European Food Safety Authority (EFSA) ve ABD'de Food and Drug Administration (FDA) olduğu gibi kanun koyucularının getirdiği güvenlik gerekliliklerini yerine getirmelidir [6].

Tüm materyaller içerisinde gıda uygulamalarında mikroenkapsülasyon için sıklıkla kullanılanlar polisakkaritlerdir. Nişasta ve türevleri; amiloz, amilopektin, maltodekstrinler, polidekstroz, şuruplar ve selüloz ile türevleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki ekstraktları; gum Arabic, tragakant gum, karaya gum, mesquite gum, galaktomannanlar, pektinler ve çözünebilir soya fasulyesi polisakkaritleri kullanılır. Daha sonra deniz kaynaklı; karragenanlar, aljinatlar gıdalarda bulunmaktadır. Mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı polisakkaritler; dekstran, kitosan, ksantan, gellan gum da kullanılmaktadır. Doğal ve modifiye polisakkaritlerden farklı olarak proteinler ve lipitler de enkapsülasyon için uygundur. Süt ve buğday proteinlerine en yaygın örnek; kazein, jelâtin ve glutendir. Lipid materyaller arasında gıda uygulamaları için uygun olanları; yağ asitleri ve yağ alkollerini, mumlar, gliseritler ve fosfolipitlerdir. Bunlara ilave olarak inorganik materyaller, parafin, polivinilpirolidon gibi diğer materyaller de kullanılabilir [6].

Çeşitli kaplama materyalleri ile kaplanan probiyotik kültürlerin gastrointestinal sistem ve çevre şartlarına dayanıklılıkları üzerine gerçekleştirilen bazı çalışmalar Tablo 1'de özetlenmiştir.

## Aljinat

Aljinat doğal olarak çeşitli alglerden ekstrakte edilen  $\beta$ -D-mannuronik ve  $\alpha$ -L-guluronik asitlerden oluşan polisakkaritlerdir. Polimer zincirinin kompozisyonu aljinat kaynağına bağlı olarak ardışık dağılımı ve miktarınca değişiklik gösterir ve bu aljinatın dolgu materyali olarak fonksiyonel özelliklerini etkiler. Aljinat hidrojelleri yaygın olarak hücre mikroenkapsülasyonunda kullanılır [31, 32] ve basit yapılı olmasından, toksik olmamasından, biyo uyumluluğu ve düşük maliyetli olmasından dolayı probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda kalsiyum aljinat tercih edilir [4, 32]. Bununla beraber aljinat kullanımında bazı dezavantajlar vardır. Örneğin; aljinat tanecikleri mikropartiküllerin direnci açısından midedeki asidik şartlara çok duyarlıdır [33]. Dezavantajı ölçeklendirme işleminin çok zor olmasıdır. İlave olarak elde edilen mikropartiküller çok gözenekli olduğundan hücreleri çevre şartlarından korumada sınırlı ortaya çıkmaktadır.

Buna rağmen bu kusurlar aljinatları diğer polimer bileşiklerle karıştırılarak veya çeşitli katkı maddeleri kullanarak aljinatların yapısında modifikasyonlar oluşturularak telafi edilebilmektedir [4,32]. Örneğin aljinatı nişasta ile karıştırmak probiyotik mikroenkapsülasyonunun etkinliğini sağlayan ve yaygın olarak kullanılan metottur [4, 34, 35, 36].

Karıştırılmış tip meyveli yoğurtlarda sodyum aljinatla enkapsüle edilmiş probiyotik kullanımının probiyotiklerin safra tuzları ve midenin asidik şartlarına karşı dayanıklı oldukları, kapsüllenmiş hücrelerin serbest hücrelere nazaran terapötik etki gösterebildikleri değerlerden daha fazla canlı hücre sayısına sahip oldukları belirlenmiştir [37].

Çeşitli çalışmalar probiyotikler ile kalsiyum aljinatı kaplama materyali olarak birlikte kullanmanın gıdada ve sindirim sisteminde probiyotik hücreleri daha iyi koruduğunu göstermiştir [38, 39].

## Gellan Gum ve Ksantan Gum

Gellan gum *Pseudomonas elodea*'dan elde edilen glikoz, glukoronik asit, glukoz ve ramnoz şeklinde tekrarlayan monomerlerden oluşan mikrobiyal polisakkarittir [40]. Ksantan gum selülozik omurga üzerinde her iki glikoz ünitesinde yan zincir olarak iki mannoz ve bir glukoronik asit [32, 41] içeren mikrobiyal bir eksopolisakkarittir. Ticari ksantan gum glikozun kesikli fermantasyonu yoluyla *Xanthomonas campestris* tarafından oluşturulur [41]. Probiyotik hücrelerin mikroenkapsülasyonu için ksantan-gellan gum karışımı kalsiyum iyonları ile stabilize edilir ve aside dirençlidir. [34, 35] ve aljinatın tersine asidik şartlara yüksek direnç sağlamaktadır. Sun and Griffiths [35] çalışmalarında *Bifidobacterium spp.* hücrelerini gellan-Ksantan gum karışımı kullanarak enkapsüle ettikten sonra asidik şartlarda (pH=2.5) enkapsüle hücrelerin serbest hücrelerden istatistik olarak önemli ölçüde daha fazla canlılıklarını koruduklarını tespit etmişlerdir.

Tablo 1. Çeşitli kaplama materyalleri ile kaplanan probiyotik kültürlerin gastrointestinal sistem ve çevre şartlarına dayanıklılıkları üzerine gerçekleştirilen bazı çalışmalar

Kültür	Kaplama materyalleri	Kaynak
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KFRI 673	Kitosan kaplı aljinat	[7]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 547, <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 1994, <i>Lactobacillus casei</i> 01	kitosan, sodium alginate, poly-l-lysine	[8]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CSCC 2400 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CSCC 2409	Dirençli nişasta Raftiline® Raftilose®	[9]
<i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121	Kazein/pektin kompleksi Polivinil asetat fitalat iç kaplamalı/fruktooligosakkarit, laktuloz, rafinoz	[10] [11]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121 <i>Lactobacillus acidophilus</i> PTCC1643 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> PTCC1637	Sodyum aljinat Bir veya iki tabaka sodyum aljinat	[12] [13]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC® 11975™ <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697D <i>Bifidobacterium catenulatum</i> ATCC® 27675 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC® 15703™ <i>Bifidobacterium</i>	Bezelye protein/aljinat Nişasta bazlı kürecikler (patates nişastası, yüksek amiloz içerikli mısır nişastası)	[14] [15]
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> G4	Aljinat/jelâtin Sodyum aljinat/nişasta Aljinat/nişasta	[16] [17] [18]
<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 39392 <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011 <i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 1815 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Aljinat, kitosan, alginat/guar gum, aljinat/ksantan gum Kalsiyum aljinat Bezelye protein/aljinat Buğday proteini Dirençli mısır nişastası, inülin Aljinat, karnıyarık otu/aljinat Kalsiyum aljinat/ dirençli nişasta Sodyum aljinat veya pektin/aljinat veya kitosan Mikrobiyal polimerler ksantan, gellan, pullulan gum	[19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Lactobacillus paracasei</i>	Aljinat Aljinat/maltodekstrin Aljinat	[28] [29] [30]

### κ-Karragenan

κ-Karragenan gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal polimerdir. Hücrelerin polimer çözeltisine ilave edilmesi şeklinde bileşiğin uygulandığı teknolojiye 40 ila 50°C arasında değişen sıcaklığa ihtiyaç duyulmaktadır. Daha sonra karışımı oda sıcaklığına kadar soğutmakla jelleşme oluşmakta ve potasyum iyonları ilavesiyle mikropartiküller stabilize edilmektedir [4]. κ-Karragenan içerisinde probiyotik hücrelerin mikroenkapsülasyonunda tanecikler bakterileri yaşayabilir durumda tutmaktadırlar [41] fakat jeller kırılğan ve strese dayanıklı değildirler [40].

*Bifidobacterium bifidum*'un κ-karragenan tanecikleri içerisinde mikroenkapsülasyonu ile çedar peynirinin olgunlaştırılması süresince tekstüre, lezzete veya görünümüne herhangi bir olumsuz etkisi olmadan 24 hafta boyunca canlılıklarını koruyabildikleri tespit edilmiştir [42].

### Selüloz Asetat Fitalat

Bu bileşiğin avantajı asidik pH'da (pH 5.0'ten az) çözünür olmaması fakat pH'nın 6.0'dan fazla olması durumunda çözünebilir olmasıdır. Selüloz asetat fitalat kullanılarak probiyotik bakteri mikroenkapsülasyonu, gastrointestinal sisteme benzer ortamlarda yapılan çalışmalarda mikroorganizmalara iyi bir koruma sağlamıştır [43].

### Kitosan

Kitosan glikozamin ünitelerinin anyonlar ve polianyonlar varlığında çapraz bağ oluşturabilen doğrusal bir polisakkarittir [32,33]. Kitosan kaplanarak mide sıvısına benzer ortam çalışmalarında probiyotiklerin canlılıkları üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir [32]. Bu bileşik hücrenin mikroenkapsülasyonu ile yaşayabilirliğinin artırılmasında iyi bir etki gösteremediğinden kapsül oluşturmaktan çok kaplama materyali olarak kullanımı tercih edilir [33]. Probiyotik bakterilerin aljinatla kapsüllenmesi ve kitosan ile kaplanması gastrointestinal sisteme benzer

ortamlarda korumayı desteklemekte böylece bakteri hücrelerinin kolona kadar ulaşmasında yardımcı olmaktadır [44]. Kapsül partikül büyüklük ve morfolojisi üzerine karıştırma oranının, sıcaklığın, jelleştirici ajan seviyesinin, yüzey aktif polimer konsantrasyonunun ve fazların viskozitesinin etkili olduğu bildirilmiştir [45]. Bununla beraber kitosanın LAB üzerine inhibitör etkilerinde olduğu gibi bazı dezavantajları da vardır [33].

### Nişasta

Nişasta çok sayıda glikoz ünitelerinin glikozidik bağlarla bağlandığı bir polisakarittir. Nişasta başlıca  $\alpha$ -1-4 glikozidik bağlarla bağlanan d-glikopiranoz doğrusal polimerlerden oluşan amiloz ve  $\alpha$ -1-4 glikozidik bağlarla bağlı ve  $\alpha$ -1-6 glikozidik bağlarla dallanma oluşturan amilopektinden oluşmaktadır [33]. Dirençli nişasta ise ince bağırsakta pankreatik enzimlerle (amilazlar) parçalanmayan nişastadır. Dirençli nişasta kalın bağırsağa ulaşabilmekte ve fermente edilmektedir [46]. Bu spesifiklik bağırsaklarda iyi bir geçiş karakteristiği sağlamakta ve bakteriyel hücrelerin kalın bağırsağa ulaşmalarını sağlamaktadır [33]. Sonuç olarak dirençli nişasta probiyotik hücrelerin tutunabilmesi için ideal bir yüzeye sahiptir [46] ve probiyotik bakterilerin canlı ve metabolik olarak aktif bir şekilde bağırsaklara ulaşmasını sağlamaktadır [47].

Babu ve Nithyalakshmi [23] *Lactobacillus casei* MTCC1423'ü emülsiyon tekniği uygulayarak dirençli mısır nişastası ve inülinin farklı kombinasyonları ile mikroenkapsüle ederek kalsiyum aljinatla kaplamışlar ve prebiyotiklerin probiyotik bakterinin termal direnci üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda prebiyotik kompozisyonunun probiyotiklerin termal dirençleri üzerine önemli ölçüde etkili olduklarını tespit etmişlerdir ve %2 dirençli mısır nişastası ile %3 inülin prebiyotik karışımının termal uygulamalar sırasında probiyotiklerin canlılıkları koruduklarını tespit etmişlerdir.

### Jelâtin

Isıyla geri dönüşümlü olarak jel oluşturabilen, probiyotik mikroenkapsülasyonunda yalnız veya diğer bileşenlerle kombine şekilde kullanılabilen protein yapısında bir gumdur. Amfoter yapısından dolayı gellan gum gibi anyonik polisakaritlerle birlikte kullanılabilen materyaldir. Bu hidrokoloidler pH'nın 6.0'dan yüksek değerlerinde çözünebilir çünkü bunlar net negatif iyon taşırlar ve birbirlerini iterler. Bununla beraber pH izoelektrik noktanın altına ayarlanırsa jelâtinin net yükü pozitifte dönüşebilir bu da negatif yüklü gellan gum ile çok sıkı etkileşime sebep olur [4, 46].

### Proteinler

Proteinler son yıllarda probiyotik enkapsülasyonunda daha aygın kullanılmaya başlanmıştır. Proteinler büyük kompleks yapıya sahip olmalarına rağmen enzimatik, kimyasal çapraz bağlanma veya ısı kontrolü ile sol-jel dönüşümü yöntemleriyle jel hale dönüştürülebilirler. Kazein, sığır serum albumini ve soya proteinleri ticari olarak elde edilebilen proteinlere örnek verilebilirler [32].

Süt proteinleri probiyotik hücreler için doğal taşıyıcılar ve sahip oldukları yapısal ve fiziko-kimyasal özelliklerden dolayı taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler [48]. Örneğin proteinlerin mükemmel derecede jelleşme yetenekleri vardır ve bu özellikleri Heidebach ve ark. [49, 50] tarafından probiyotiklerin enkapsüle edilmesinde kullanılmıştır.

### MİKROENKAPSÜLASYON MATERYALİNİN SEÇİMİNDE DİKKAT EDİLECEK HUSUSLAR

Mikroenkapsülasyon materyalinin seçiminde en önemli kriterler enkapsüle edilmiş son ürünün fonksiyonelliği, kaplama materyalinin potansiyel kısıtlamaları, enkapsüllerin konsantrasyonu, salınım tipi, stabilite gereklilikleri ve maliyetidir. Mikroenkapsülasyonda koruyucu olarak kullanılacak materyal gıda derecesinde, biyolojik olarak parçalanabilir olmalı ve iç faz ile çevre arasında bariyer oluşturmalıdır. Gıda sektöründe mikroenkapsülasyon için kullanılan materyallerin çoğunluğunu biyomoleküller oluşturmaktadır. Doğal olmaları dışında aktif materyalleri çevre şartlarına karşı maksimum seviyede koruyabilmeli, işleme sırasında veya çeşitli şartlar altındaki depolama koşullarında aktif materyali kapsül yapısında tutabilmeli, eğer gerekiyorsa yüksek konsantrasyonlarda iyi reolojik özellikler sergilemeli ve mikroenkapsülasyon sırasında kolay kullanılabilir olmalıdır.

Mikroenkapsülasyon materyali seçmek için bütün kriterleri sağlamak mümkün değildir. Fakat aktif materyalin tipi, özellikleri ve enkapsüle materyallerin nerede kullanılacağı listenin en başında gelmektedir. Bundan başka maliyet en uygun materyali seçebilmek için anahtar rol oynamaktadır [6].

### PROBİYOTİKLERİN MİKROENKAPSÜLASYON ETKİNLİĞİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Olumsuz çevre koşulları ile karşılaştıktan sonra canlılıklarını sürdürmeleri, hücreyi sarma/serbest bırakma, sertleşme süresi (kapsül oluşumu için ihtiyaç duyulan süre) gibi farklı faktörler probiyotik enkapsülasyonunun etkinliğini değerlendirme amacıyla kullanılabilir [51].

### Çevre Şartlarına Göre Kapsül Özellikleri

Probiyotiklerin amaçlarını gerçekleştirmeleri için kapsül materyalinin doğru seçilmesi açısından çevre şartları çok önemlidir. Örneğin aljinat kapsüllerinden kalsiyum iyonları kaçığı yapının bozulmasına sebep olmaktadır. Bununla beraber süt, krema, yoğurt gibi süt bazlı ortamlarda yüksek seviyede kalsiyum iyonlarının varlığı kaçığı önlemektedir. Böylece jel tanecikler yapı ve şekillerini korumaktadırlar [36]. Eğer ince bağırsağa probiyotik hücrelerin ulaşması amaçlanıyorsa kapsül materyallerinin seçiminde izlenecek yol bu materyallerin ince bağırsak pH'sı ve pankreatik enzimlerle karşılaştıktan sonra parçalanmaları gerçekleşecek şekilde olmalıdır. Taneciklerin belirtilen sindirim sistemi faktörlerine tolerans göstermeleri ise probiyotik hücrelerin bağırsaklara yerleşmeden doğrudan vücuttan atılmalarına sebep olmaktadır. Eğer taneciklerin kalın

bağırsağaa yerleşmeleri gerekiyorsa pankreatik ve ince bağırsak şartlarına karşı dayanıklı olmaları gerekmektedir. Bununla beraber enkapsülasyon materyallerinin kimyasal özellikleri nedeniyle kolayca gerçekleştirilememektedir. Bu bağlamda ince bağırsakta tanecikler açıldığı zaman salınan hücrelerin kalın bağırsağaa ulaşması beklenmektedir. Bununla beraber ince bağırsakta hücrelerin salınımından sonraki pankreatik şok canlılıklarını azaltabilmektedir.

### Kapsüllerin Kaplanması

Kapsüllerin kaplanması fizikokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi için etkili bir yöntemdir. Aljinat kapsüllerinin kaplanması kalsiyum iyonlarının şelatlanmasına direnç sağlamaktadır. Yapılan çalışmada 8 farklı probiyotik bakterinin aljinatla mikroenkapsülasyonu sonrası palm yağı ve poli-L-lizin kullanarak kapsülleri kaplamışlardır. Sonuçta kaplanan aljinat taneciklerinin kaplanmayanlara nazaran asidik şartlara daha iyi dayanabildiklerini tespit etmişlerdir [52].

### Kapsül Materyalinin Çözelti Konsantrasyonu ve Tanecik Çapı

Kapsül oluşturacak materyalin çözelti konsantrasyonu ve son tanecik çapı enkapsülasyonun etkinliği açısından çok önemli faktörlerdir [5,36]. Tanecik çapının artışına paralel olarak şiddetli çevre faktörlerine karşı koruyucu etkileri artmaktadır [36]. 0.5-1.0 mm çapındaki aljinat kapsüllerinin soğuk muhafaza sırasında normal pH'daki yoğurtlarda Bifidobakterilerin canlılıklarını önemli ölçüde artırdıkları bildirilmiştir [34]. Ürün ve kapsül tipine bağlı olarak, sınır değerlerin üzerinde tanecik çaplarının artması uygun olmayan damak tadı ve lezzete sebep olduklarından uygulanamamaktadırlar. Ayrıca tanecik çaplarının artışı pankreatik enzimlerin tanecikleri parçalayabilme yeteneklerini azaltmaktadır.

### Çevre Şartları

Çevre şartlarının çeşidi ve şiddeti enkapsülasyon etkinliğini azaltan parametrelerden biridir. Birçok çalışma enkapsüle hücrelerin serbest hücrelere nazaran hücre içi gastrik şartlarda avantaja sahip olduklarını ortaya koymuştur, fakat diğerleri kuvvetli asidik şartlarda ilave koruyucu etkileri olmadığını göstermiştir [34, 36, 53]. Kapsüller yoğurt gibi düşük asitli ortamları mide sıvısı gibi şiddetli asidik ortamlardan daha fazla tolere edebilmektedirler [34,36]. Ortalama 100 µm çapındaki aljinat kapsüllerinin pek çok fermente ürün için etkili olduğunu, ancak mide sıvısı için etkili olmadığını bildirmişlerdir [54]. Aljinat kullanarak enkapsüle ettikleri farklı probiyotik mikroorganizmaların kontrol gruplarına nazaran asidik şartlara (pH 2.0) [52, 55], yüksek safra tuzu konsantrasyonlarına ve orta derecede ısı uygulamasına (65°C'ye kadar) daha fazla dayanıklı olduklarını tespit etmişlerdir [55].

### Kapsüller Üzerine Bakterilerin Etkisi

Enkapsülasyon için kapsül materyali seçmeden önce kapsüle edilen bakterinin nişastayı parçalayabilme

yeteneğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir [51].

### Kapsül Materyallerinin Modifikasyonu

Enkapsülasyon etkinliğini artırmak amacıyla kapsül materyallerine kimyasal modifikasyon uygulaması yaygındır. Kapsül materyallerinin yapısal modifikasyonu doğrudan yapısal değişiklikler ve/veya özel katkı ilavesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Gliserol ilavesi taneciklere kriyojenlerle donmaya karşı hücreleri koruyabilme yeteneği kazandırmaktadır [51]. Kanmani ve ark. [56] yaptıkları çalışmada *Streptococcus phocae* P180 hücrelerinin canlılığı üzerine iki farklı metot ve kriyojenlerden koruyucu kaplamaların etkilerini araştırmışlardır. Trehalozun bakteri hücrelerinin depolanması süresince bütün sıcaklıklarda en iyi koruyucu özellik gösterdiğini ve trehaloz/yağsız süt kombinasyonunun diğer kombinasyonlardan %85 daha fazla hücre canlılığını sağladığını tespit etmişlerdir.

### Başlangıç Mikrobiyal Hücre Konsantrasyonu

Enkapsülasyon çözeltisindeki mikrobiyal hücre konsantrasyonu artışı taneciklere bağlanan hücre sayısının artmasına ve enkapsülasyon etkinliğinin artmasını sağlamaktadır. Sınır değerlerin üzerinde hücre yüklendiği zaman kapsül yapısının yumuşamasına sebep olurken, aynı zamanda tanecik çapındaki aşırı artıştan dolayı uygun olmayan damak tadına sebep olmaktadır [51].

### İşleme Şartları

Taneciklerde ve içerdikleri hücrelerde meydana gelecek hasarı önlemek için mikroenkapsülasyon prosesi sırasında dondurma (kriyojenik dondurma veya dondurarak kurutma), püskürterek kurutma, mikronlaştırma ve depolama şartları gibi işleme şartlarına özel dikkat gösterilmesi gerekmektedir [34].

### Diğer Faktörler

Mikroenkapsülasyon sırasında taneciklerin kırılmasına veya çatlamasına sebep olan bileşenlerin karıştırılma sırası, karıştırılma oranları, mekanik gerilimler gibi faktörler mikroenkapsülasyonun etkinliğini etkileyen diğer faktörlerdir [51].

### Et Endüstrisinde Mikroenkapsüle Probiyotik Kullanımı

Et ürünlerinde hücrelerin korunması amacıyla mikroenkapsülasyonun potansiyel kullanımı araştırılmış ve probiyotik hücrelerin kurutulmuş fermente ürünlerin duyuşal özelliklerine olumsuz bir etkide bulunmadıkları tespit edilmiştir. Mikroenkapsüle probiyotiklerin canlılıklarının serbest hücrelere nazaran daha fazla olduğu tespit edilmiştir [57, 58].

## SONUÇ

Probiyotik mikroorganizmalar gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmakta ve çok çeşitli probiyotik hücreler içeren gıda ürünleri satılmaktadır. Aynı zamanda yeni ürünler geliştirilmesinde probiyotiklerden istifade edilmeye yönelik birçok araştırma devam etmektedir. Probiyotik hücrelerin kullanım alanlarını geliştirmeye ve artırmaya yönelik çalışmalarda gastrointestinal sistemde hücrelerin arzu edilen faaliyetlerini yerine getirebilmelerini sağlamak üzere mikroenkapsülasyon tekniği kullanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon teknolojisinin geliştirilmesiyle birlikte probiyotik hücrelerin gerek gıdalar içerisinde gerekse insan bünyesinde karşı karşıya kaldıkları çevre şartlarına dayanıklı, fonksiyonel özelliklerini sergileyebilecekleri hücreler elde edilebilecektir. Bu alanda gerçekleştirilecek araştırmalarla farklı ve çok çeşitli yeni probiyotik ürünlerin üretilmesi mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] Brownlie K., 2007. Marketing Perspective of Encapsulation Technologies in Food Applications. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, Ed: Lakkis, M., Blacwell Publishing, U.S.A., pp. 83-112
- [2] Çakır, İ., 2006. Mikroenkapsülasyon Tekniğinin Probiyotik Gıda Üretiminde Kullanımı. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.
- [3] Aqilah, N.S., Akhlar, M., 2010. Enhancement probiotics survival by mikroencapsulation with alginate and prebiotics. *Basic Biotech.* 6: 13-18.
- [4] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13(1): 3–13.
- [5] Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R., 2012. Microencapsulation in food science and technology. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 182-186.
- [6] Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S.E., 2009. Materials for Encapsulation In: Zuidam N.J., Nedovic, V.A. (Eds.) *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, Springer: Dordrecht, The Netherlands, p. 31- 100.
- [7] Lee, J.S., Cha, D.S., Park, H.J., 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7300-7305.
- [8] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14: 737-743.
- [9] Iyer, C., Kailasapathy, K., 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science* 70(1): 18-23.
- [10] Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, J.C.C., Freitas, O., Favaro-Trindade, C.S., 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation* 24(7): 685-693.
- [11] Ann, E.Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J.Y., Park, D.J., Han, K.S., Kim, S.H., 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science and Technology* 42: 411-419.
- [12] Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, I.S., Cha, D.S., Park, H.J., 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT* 41: 493-500.
- [13] Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., Shahidi, F., 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International* 42: 1040-1045.
- [14] Kotikalapudi, B.L., 2009. Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. University of Saskatchewan College of Graduate Studies and Research, Department of Food and Bioproduct Sciences, Master of Science Thesis, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, p. 138.
- [15] Chittiprolu, S., 2009. Effect of Starch Spherulites on Survival of Bifidobacteria in the Presence of Acid or Bile. The Pennsylvania State University The Graduate School, Department of Food Science, Master of Science Thesis, Pennsylvania, U.S.A., p.137.
- [16] Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J., Liu, C.S., 2009. Microencapsulation of probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation* 26(4): 315-324.
- [17] Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D.K., Kapila, S., 2010. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology* 3(4): 586-593.
- [18] Teoh, P.L., Mirhosseini, S.H., Mustafa, S., Manap, M.Y.A., 2011. Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9(1): 69-73.
- [19] Vodnar, D.C., Socaciu, C., 2011. Metabolic activity and behavior of *Lactobacillus casei* during fermentation and microencapsulation. *Bulletin UASVM Agriculture* 68(2): 499-506.
- [20] Rodríguez-Huezo, M.E., Lobato-Calleros, C., Reyes-Ocampo, J.G., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Pimentel-González D.J., 2011. Survivability of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* in liquid- and gel-core alginate beads during storage and simulated gastrointestinal conditions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(3):353-361.
- [21] Klemmer, K.J., 2011. Synbiotic Encapsulation Employing a Pea Protein-Alginate Matrix. University of Saskatchewan College of Graduate Studies and Research, Department of Food and Bioproduct Sciences, Master of Science Thesis, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, p. 116.
- [22] Dolly, P., Anishaparin, A., Joseph, G.S., Anandharamkrishnan, C., 2011.

- Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Microencapsulation* 28(6): 568-574.
- [23] Babu, G., Rath, S., Nithyalakshmi, V., 2011. Probiotic Viability of Freeze Dried Symbiotic Microcapsules in Skim Milk Powder at Ambient Storage Condition. *Internet Journal of Food Safety* 13: 62-68.
- [24] Lotfipour, F., Mirzaeei, S., Maghsoodi, M., 2012. Preparation and characterization of alginate and psyllium beads containing *Lactobacillus acidophilus*. *The Scientific World Journal* doi: 10.1100/2012/680108.
- [25] Zanjani, M.A.K., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., Madanipour, M.M., 2012. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research* 6(26): 5511-5517.
- [26] Brinques, G.B., Ayub, M.A.Z., 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering* 103: 123-128.
- [27] Jiménez-Pranteda, M.J., Poncellet, D., Náder-Macías, M.E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., 2012. Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113(2): 179-184.
- [28] Sohail, A., Turner, M.S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B., 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145: 162-168.
- [29] Sohail, A., Turner, M.S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B., 2012. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in alginate and maltodextrin. *Food Bioprocess Technology* DOI: 10.1007/s11947-012-0938-y.
- [30] Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes A.M., Pintado, M.M., Silva, J.P., Costa, P., Amaral, M.H., Rocha-Santos, T., Freitas, A.C., 2011. Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. *Food Bioprocess Technology* 5(7): 2748-2757.
- [31] Rowley, J.A., Madlambayan, G., Mooney, D.J., 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20(1): 45-53.
- [32] Cook, M.T., Trotzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V., 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release* 162: 56-67.
- [33] Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 104: 467-483.
- [34] Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology* 62(1-2): 47-55.
- [35] Sun, W., Griffiths, M.W., 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology* 61(1): 17-25.
- [36] Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojotas, P.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T., 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 19(1): 35-45.
- [37] Eren, L., 2009. Sodyum Aljinatla Kapsüllenmiş Bazı Probiyotik Bakterilerin Stirred Tip Meyveli Yoğurtlarda in Vitro Koşullarda Canlı Kalma Sürelerinin Araştırılması. Harran Üniversitesi Fen BilimleriEnstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, s.86
- [38] Bielecka, M., E. Biedrzycka and A. Majkowska. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for symbiont and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International* 35: 125-131.
- [39] Chen, M. J., K. N. Chen and C. W. Lin. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science* 70(5): 260-267.
- [40] Chen, M.J., Chen, K.N., 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairyproducts. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83-107.
- [41] Argin, S., 2007. Microencapsulation of Probiotic Bacteria in Xanthan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Gels. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, Doctor of Philosophy Thesis. U.S.A. p. 82
- [42] Dinakar, P. and V. V. Mistry. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77: 2854-2864.
- [43] Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F., 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and B. Lactis (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation* 19(4): 485-494.
- [44] Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.D.C., 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142(1-2): 185-189.
- [45] Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., Acosta, N., 2003. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience* 3: 511-520.
- [46] Anal, A.K., Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science and Technology* 18(5): 240-251.
- [47] Crittenden, R., Laitila, A., Forsell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., 2001. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies.



- Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3469–3475.
- [48] Livney, Y.D., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15(1–2): 73–83.
- [49] Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U., 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids* 23(7): 1670–1677.
- [50] Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U., 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal* 19(2): 77–84.
- [51] Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology* 5(1):3-9
- [52] Ding, W.K., Shah, N.P., 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 74 (2): 100-107.
- [53] O’Riordan, K. I., D. Andrews, K. Buckle and P. Conway. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* 91: 1059–1066.
- [54] Cui, J., J. Goh, P. Kim, S. Choi and B. Lee. 2000. Survival and stability of *Bifidobacteria* loaded in alginate poly-L-Lysine microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 210: 51–59.
- [55] Ding, W.K., Shah, N.P., 2007. Acid, bile and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 72(9): 446-450.
- [56] Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2011. Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(6): 1106-1114.
- [57] Muthukumarasamy, P., Holley, R.P., 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology* 111(2): 164–169.
- [58] Muthukumarasamy, P., Holley, R.A., 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24(1): 82–88.
- 
-