

PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALARIN MİKROENKAPSÜLASYONU

Emel Ünal*, Zerrin Erginkaya

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / Received: 03.03.2010

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 11.06.2010

Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2010

Özet

Probiyotikler yeterli sayıda alındıklarında, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalardan beklenen yararlı etkinin görülmesi için üründe raf ömrü sonuna kadar belirli sayıda canlı mikroorganizmanın bulunması ve sindirim sisteminden etkilenmeden bağırsaklara geçmesi gerekmektedir. Probiyotik gıda üretiminde söz konusu mikroorganizmaların canlılığını korumada mikroenkapsülasyon tekniğinin, yeni yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işleminde kaplama yöntemi olarak çoğunlukla ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu derlemede, probiyotik gıda üretiminde kullanılan mikroenkapsülasyon tekniklerinin yanı sıra mikroenkapsülasyonla ilgili geliştirilen alternatif yöntemler ve konu ile ilgili yapılan çalışmalar hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Mikroenkapsülasyon, probiyotik, immobilizasyon, kaplama yöntemleri

MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC MICROORGANISMS

Abstract

Probiotics are defined as live microorganisms that have beneficial effects on their hosts when administered in adequate amounts. For having beneficial effects of probiotics, it is necessary that probiotic microorganisms maintain the adequate number of viable cells during the shelf life of the product as well as during the gastrointestinal (GI)-tract transit after consumption. It was reported that one of the new methods is microencapsulation technique to enhance the survival of microorganisms used in production of probiotic food. Mostly, techniques of extrusion and emulsion have been used as a microencapsulation method. In this review, it was informed about microencapsulation techniques used in food production, new alternative methods and some researches.

Keywords: Microencapsulation, probiotic, immobilization, microencapsulation methods

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ unale@cu.edu.tr ☎ (+90) 322 338 61 73 📠 (+90) 322 338 66 14

GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli sayıda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır (1-4). Probiyotik mikroorganizmaların beklenen faydalı etkiyi sağlayabilmeleri için, 106-107 kob/mL veya daha fazla sayıda vücuda alınmaları ve içinde buldukları gıdanın üretimi ve raf ömrü süresince canlı kalabilmeleri gerekmektedir (5). Probiyotiklerin belirli sayıda ve düzenli olarak tüketilmelerine ilaveten, alınan bakterilerin sindirim sisteminde mide asitliği, safra tuzları, çeşitli enzimler vb. gibi zor koşullarda da canlılığını koruyabilmesi, uygun miktarlarda bağırsaklara ulaşarak, kolonize olması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların canlılığının ve stabilitesinin korunması, birçok üründe, gerek işleme sırasında, gerekse depolama ve satış aşamalarında önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Probiyotik gıdalarda kullanılan mikroorganizmalarda, ürüne özgü türler olma özelliklerinin yanı sıra, ürünün raf ömrü boyunca canlılıklarını koruyabilme özellikleri de aranmaktadır. Ayrıca, probiyotik türlerin seçiminde, ilgili yeni üretim teknolojileri ve formülasyonları dikkate alınarak, fonksiyonel özellikleri olanlar öncelikli olarak seçilmektedir (6-9). Diğer yandan, probiyotik ürünlerin, ticari olarak üretilmeden önce, pilot üretimleri gerçekleştirilerek, üretiminde uygulanan işlemler sırasında ve sonrasında canlı kalma oranları belirlenmektedir (10, 11).

Tüketici talepleri doğrultusunda, probiyotik ürünlerin çeşitliliği artmakta ve pazardaki payı büyümektedir (12). Ancak probiyotik mikroorganizma içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesini ve üretimini kısıtlayan bir takım engeller vardır (13-15). Bunlar; gıdanın işlenmesinden kaynaklanan engeller (yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam), tüketiminden sonra metabolizmadan kaynaklanan engeller (sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları) ve mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan engellerdir (anaerobik gelişme koşulları ve zengin besin maddeleri gereksinimi, oksijen, sıcaklık, pH, inhibitörler ve rekabetçi mikroorganizmalardan kaynaklanan stres koşulları).

Probiyotik gıda üretimini kısıtlayan en önemli etken, kullanılan mikroorganizmaların stabilitesini, yani canlılığını koruyamamasıdır. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda mikroenkapsülasyon (ME) tekniğinin, probiyotiklerin teknolojik özelliklerinin artırılmasında kullanılan yeni yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir. ME tekniği ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda, mikroenkapsüle probiyotiklerin olumsuz koşullardaki canlı kalma süreleri incelenmiştir. Çalışmalarda probiyotikler için uygun ME teknikleri ve materyalleri avantaj ve dezavantajlarıyla araştırılmıştır (10, 16-18). Bu derlemede, probiyotik gıda üretiminde kullanılan ME tekniklerinin yanı sıra ME ilgili geliştirilen alternatif

Çizelge 1. Probiyotik mikroenkapsülasyonunun yararlı etkileri (2, 16, 17)

Ürün	Yarar
Kurutulmuş probiyotik kültür	-Oksijene duyarlı kültürlerin üretimini sağlama -Santrifüje duyarlı kültürlerin düzeltilmesini sağlama -Yüksek ekzopolisakkarit üreten kültürlerin iyileştirilmesini sağlama -Daha düşük kontaminasyon tehlikesi -Kültürler havada kurutulabilir
Nutrosötikler	-Gastrik çözeltilerde dayanımın artırılması -Safra çözeltilerinde dayanımın artırılması -Kurutulmuş formda depolama sırasında dayanıklılığın artırılması
Kuru Sosisler	-Asidifikasyon oranını iyileştirme
Bisküviler, tozlar	-Isıtmayla canlılığın iyileştirilmesi
Dondurma, süt bazlı ortam, kızılık suyu	-Dondurma işlemi üzerine canlılığın korunması
Peynir	Son üründe bulunan miktarın korunması
Fermente sütler	Bakteriyofajlara ve maya bulaşlarına karşı koruma
Yoğurt, mayonez, süt	Depolama sırasında canlılığın korunması

yöntemler hakkında bilgi verilerek, konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelenmeye çalışılmıştır.

Mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon, katı, sıvı veya gaz halindeki gıda bileşenlerinin, enzimlerin, hücre ve diğer maddelerin, protein veya karbonhidrat esaslı minyatür kapsüller içerisinde tutulması olarak tanımlanmaktadır. Bazı kaynaklarda, immobilizasyon ve ME terimleri birbirinin yerine geçecek şekilde kullanılmaktadır. Ancak, immobilizasyon genel bir terim olup, ME de dahil olmak üzere, farklı bir çok immobilizasyon yöntemini içermektedir. ME, tutuklama yöntemi ile yapılan immobilizasyon işlemidir (19-22).

ME yönteminde, hücreler kapsül veya kaplama maddesi olarak da adlandırılan yarı geçirgen membran içerisinde tutuklanırlar. Bu yöntemde hücreler 0.45 µm'den daha küçük gözenekleri olan 5-300 µm çapındaki kaplama maddesinin içerisinde tutulur. ME işlemindeki ilk basamak, uygun kaplama maddesinin seçilmesidir. Kaplama maddeleri, film oluşturabilen, şekerler, gamlar, proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, yağlar veya sentetik polimerlerdir (20, 23).

ME işlemi, gıda, tarım, ilaç, enerji ve savunma gibi alanlarda kullanılmaktadır (20). ME'daki temel amaç; gıda bileşenlerini, kötü çevre koşullarından korumak, stabilitesini sağlamak ve kontrollü olarak kullanımını gerçekleştirmektir. ME'un temel nedenleri şöyle özetlenebilir: 1. Uyumsuz bileşikler ayırmak, 2. Sıvıların katı hale getirilmesi 3. Stabilitiyi arttırma (çevreden gelen oksidasyon ve deaktivasyona karşı mikroenkapsüle materyali korumak) 4. Mikroenkapsüle edilen materyalin tadını kokusunu ve aktivitesini maskeleyerek 5. Mevcut çevrenin korunması 6. Aktif bileşiklerin, kontrollü olarak açığa çıkarılması 7. Mikroenkapsüle materyallerin hedeflendiği şekilde salınmasıdır (24).

Mikroenkapsülasyonun probiyotik mikroorganizmalar üzerine etkileri

Yararlı birçok özelliğinden dolayı gıdalarda mikroenkapsüle probiyotiklerin kullanımı her geçen gün daha da çok önem kazanmaya başlamıştır. Çizelge 1'de çeşitli probiyotik gıdalarda ME işleminin sağladığı yararlar özetlenmiştir.

Probiyotiklerin gelişimi ve canlılığının korunması

bakımından uygun olmadığı düşünülen birçok gıda maddesi, probiyotiklere koruyucu görev yapan ME yönteminin kullanımıyla uygun hale gelmiştir. ME işlemi, organizmanın canlılığını koruyarak gastrointestinal sistemde yararlı etkiler yapmasının yanı sıra, organizmanın üründe meydana getirdiği biyokimyasal değişiklikler ve sentezlediği maddeler açısından da oldukça önemlidir (4, 16, 18, 25). Ancak probiyotiklerin ME'unda aşılması gereken bazı faktörler vardır. Bunlardan ilki boyutları büyük olan mikrobiyel hücreleri (1-4 µm) küçük kapsüllere sığdırmanın zor olması veya büyük kapsüllere konulduğunda da gıdanın duyuşal veya tekstürel özelliği üzerinde negatif etki yapmasıdır. Aşılması gereken bir diğer faktör de, özellikle gıda işleme sırasında probiyotiklerin, yüksek sıcaklığa maruz kalmaları sırasında, canlılıklarının korunması konusunda olmuştur. Ticari probiyotik kültürlerin yüksek sıcaklıklara uygun olmadıkları görülmektedir. Bu nedenle de, söz konusu ısı işlem görmüş gıdalarda, geliştirilmiş ME uygulamaları gibi sistemlere gereksinim duyulmuştur (13, 18, 26-30).

Mikroenkapsülasyon yöntemleri

Çalışmada kullanılan sütün ortalama kurumadde ME işleminde kapsüllerin oluşturulması için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar; püskürterek kurutma, püskürterek soğutma ve dondurma, ekstrüzyon kaplama, lipozom ile kaplama, koazervasyon, rotasyonel süspansiyonlu ayırma, emülsiyon polimerizasyonu, yüzeyler arası polikondensasyon, çapraz bağlama süspansiyonu, solvent evaporasyonu/solvent ekstraksiyonu olarak sıralanabilir. Bu yöntemlerden probiyotik gıdalarda en çok, püskürterek kurutma, emülsiyon ve ekstrüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (20, 12, 31). Çizelge 2'de probiyotik mikroorganizmaların ME'unda yaygın olarak kullanılan yöntemler verilmiştir.

Ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemleriyle mikroenkapsülasyon

Probiyotiklerin ME'unda, daha çok emülsiyon teknolojisinin kullanıldığı bildirilmiştir. Kapsüller, yayılım ve katılaşmayı içeren iki aşamadan meydana gelen işlemlerle oluşturulmaktadır. Yayılım, ya emülsiyon, ya da ekstrüzyon tekniği ile gerçekleştirilir. Ekstrüzyon yönteminde, bakteriyel hücreler ve polimer süspansiyonu, iğne veya şırıngadan katılaştırıcı çözelti (genellikle CaCl₂ çözeltisi) içine, sferik damlacıklar halinde verilir. Emülsiyon tekniğinde ise, mikroorganizma, genellikle sodyum al-

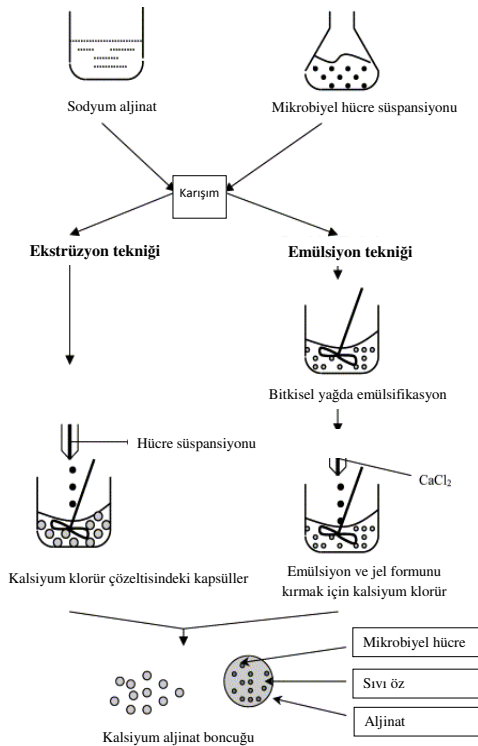
Çizelge 2. Probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonunda kullanılan yöntemler (12, 13, 16, 20)

Mikrokapsülasyon yöntemleri	Kaplama materyali	ME işlem adımları
Püskürtmeli Kurutma	Suda çözünür polimerler	-Mikroorganizma içeren solüsyonun hazırlanması -Karışımın sprej kurutucuya yüklenmesi -Sprej kurutma -Kurutulan ürünün ayrılması
Püskürtmeli Dondurma	Mumlar, yağ asitleri, suda çözünür ve çözünmez polimerler, monomerler	-Probiyotikleri içeren çözeltinin hazırlanması -Eritilmiş kaplama materyalinin dondurularak katılaşması -Kaplama materyalinin sorpsiyon, ekstraksiyon ve evaporasyon teknikleri ile taşınması
Akışkan yatak kaplama/hava süspansiyonu	Suda çözünmez ve suda çözünür polimerler, lipitler, mumlar	-Kaplama yapılacak çözeltinin hazırlanması -Kapanacak materyalin akitılması -Kapanacak materyalin (örn, probiyotikler) kaplama çözeltisi ile kaplanması
Ekstrüzyon	Suda çözünür ve çözünmez polimerler	-Kaplama yapılacak çözeltinin hazırlanması -Kaplama yapılacak materyalin kaplama çözeltisi içinde dağılması -Elde edilen karışımın kurutucu sıvıdan geçirilmesi veya soğutulması
Koazervasyon/Faz ayırım teknikleri	Suda çözünür polimerler	-Kaplama yapılacak madde (örn, probiyotik bakteri) kaplama çözeltisi içinde aracı bir sıvı faz yardımıyla dağıtılır -Aracı sıvı fazdaki kısım fiziksel olarak karıştırılarak kaplamanın tortusu bırakılır -Kaplama termal, çapraz bağlama veya desolvasyon teknikleri ile katılaşır
Elektrostatik yöntem	Zit yüklü polimerler/bileşikler	-Kaplama materyali ile kaplanacak maddenin karıştırılması -Karışımın zit yüklü çözeltiler içinde ekstrüzyonu -Mikrokapsül/mikrosfer/boncuklar kuru hava ile veya dondurularak kurutulur

jinat çözeltisine ilave edildikten sonra, aljinatın jel içerisinde küresel boncuk oluşturmasını sağlayan kalsiyum klorür çözeltisine belli bir akış hızında damlatılır. Jel oluşumu sırasında sodyum iyonları kalsiyum iyonları ile yer değiştirir ve suda çözünmeyen ve hücreleri tutuklayan Ca-aljinat boncukları oluşur. Her iki yöntemde de en son bütün işlemler tamamlandığında elde edilen katı taneçiklere boncuk veya kapsül denilmektedir. Emülsiyon tekniğinde, daha küçük çaplarda boncuklar elde edildiği için, çok aşamalı uygulamalara daha yatkındır (21). Şekil 1'de emülsiyon ve ekstrüzyon teknikleri ile bakterilerin ME'unun akış diyagramı verilmiştir (18, 32, 33).

Yapılan bazı çalışmalarda, emülsiyon ve ekstrüzyon tekniği ile elde edilen mikroenkapsüle probiyotiklerin canlılıkları ve üründe meydana getirdikleri duyuşal özellikleri bakımından önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, her iki yöntemde isteğe bağılı olarak rahatlıkla uygulanabilmektedir (34, 35).

Ancak emülsiyon ve ekstrüzyon tekniklerinde, üzerinde durulması ve dikkat edilmesi gereken en önemli aşama, karıştırma veya bir diğeri ifa-



Şekil 1. Ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri ile mikroenkapsülasyon (16, 21, 32)

deyle de homojenizasyon işlemidir. Homojenizasyon işlemi, mikroenkapsüle edilecek bakterinin canlılığı ve kapsül boyutu üzerinde direkt etkili olmaktadır. Kullanılan homojenizatörün özelliğine göre, bakteri canlılığı ve kapsül boyutu değişmektedir. Bu nedenle, mikroenkapsülasyon işlemi sırasında amacımıza en uygun homojenizatörün seçimi de oldukça önemlidir (36, 37).

Mikroenkapsülasyonda kullanılan kaplama materyalleri

ME, daha önce de bahsedildiği gibi, çeşitli maddelerin 5-300µm çapındaki kapsüller içerisinde tutulması ile gerçekleşir. Kaplamanın yani kapsülün boyutu ve şekli, stabilite ve geçirgenlik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Tekli, çok duvarlı, düzensiz, çok çekirdekli ve matriks olmak üzere farklı şekillerde mikroenkapsüller bulunmaktadır. ME işlemindeki ilk basamak, uygun kaplama materyalinin (kapsül) seçilmesidir. Kaplama materyalleri olarak, film oluşturabilen, şekerler, gamlar, proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, yağlar veya sentetik polimerlerdir, jelatin, pektin, nişasta, kappa-karreganan, agar, peyniraltı suyu gibi maddeler kullanılabilir. İdeal bir kaplama materyali; toksik olmamalı, kolay uygulanabilmeli, tam koruma sağlamalı ve ekonomik olmalıdır (15, 20, 24, 38). Sıralanan bütün özellikleri taşıyan bir kaplama materyali olmadığı için, kaplama materyalleri pratikte diğeri kaplama materyalleri ile ve/veya oksijen tüketiciler, antioksidanlar, şelat ajanları ve biyosümfaktanlar gibi tamamlayıcılar ile birlikte kullanılmaktadır (18, 20, 23, 31).

Şimdiye kadar ME'da en yaygın olarak kullanılan kaplama materyali biyogam aljinattır. Mikroenkapsüle edici destek olarak aljinat kullanımının, toksik olmaması, kolay temin edilebilir olması, mekanik stabilitesi iyi ince jeller oluşturması, alkali tampon çözeltide süspansiyon olduğunda kolaylıkla açığa çıkması ve kalsiyum klorür ile probiyotik bakteriler gibi duyarlı materyalleri kaplamada hafif matrisler oluşturması gibi avantajları vardır (39). Ancak aljinat bazen tek başına yeterli olmamaktadır. Yapılan birçok çalışmada, aljinatı başka bir destek materyaliyle daha kaplamanın probiyotikleri korumada daha etkili bir yol olduğu bildirilmiştir (40-46).

Mandal ve ark. (47), mikroenkapsüle edilmiş *Lactobacillus casei* NCDC-298 türünün canlılığı üze-

rine farklı aljinat konsantrasyonlarının (%2, %3 ve %4) etkisini incelemiştir. Aljinat konsantrasyonu arttıkça bakterinin gastrointestinal koşullara dayanımının arttığı ve canlılık üzerinde olumlu etkisi olduğu saptanmıştır.

Chen ve ark. (48), probiyotiklerin, ME'unda gastrointestinal koşullara dayanıklılıkları açısından, kullanılacak olan ME materyallerinin en uygun kombinasyonunu saptamak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda en uygun kombinasyonun %1 peptit ve %3 fruktooligosakkarit ile karıştırılmış olan %3'lük sodyum aljinat olduğunu bulmuşlardır.

Muthukumarasamy ve Holley (49), aljinat ile mikroenkapsüle edilen *Lactobacillus reuteri*'yi içeren fermente kuru sosisin duyuşal ve mikrobiyolojik kalitesini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, kurutma işlemi ile birlikte mikrokapsüle edilmemiş *L. reuteri* içeren kuru fermente sosiste yani kontrol örneğinde 2.6 birimlik logaritmik azalış meydana gelirken, mikroenkapsüle edilen kuru fermente sosiste 0.5 birimlik logaritmik azalış meydana gelmiştir. Ayrıca duyuşal özellikler bakımından kontrol örneği ile ME probiyotik katılmış sosis arasında önemli farklılıkların olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışma sağlık üzerinde olumlu özellikleri olan probiyotiklerin, fermente et ürünlerinde de kullanılması ile ilgili bir fikir vermiştir.

Allan-Wojtas ve ark. (50), bakteri yüklü kapsül ile bakteri içermeyen kapsülü gastrik koşullara benzeyen bir ortama bırakmışlar ve aljinat-kapsüldeki fiziksel aşınmaları, elektron mikroskopunu kullanarak ayrıntılı bir şekilde incelemiştir. Çalışma sonucunda bakteri yüklü kapsülde, daha çok aşınmanın meydana geldiği saptanmıştır. Bu çalışmadan alınan sonuçlarla, ME yapılacak organizmalarda öncelikle en az aşınma gösterecek kapsülün seçiminin yapılması gerektiği ve bunun için de en etkili yolun elektron mikroskopunu kullanmaktan geçtiği bildirilmiştir.

SONUÇ

ME işlemi, gıda endüstrisinde kullanılan özellikle de probiyotik mikroorganizmaların canlılığı, gelişimi ve dayanıklılığı gibi problemleri çözmede bir alternatif olarak uygulanmaya başlanmıştır. Ancak, bu yöntemin kullanılmasında dikkat edilmesi ge-

reken en önemli konu, uygun ME tekniğini ve ME materyalini seçmektir. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, probiyotiklerin düşük pH ve yüksek safra konsantrasyonlarında canlılıklarının korunması üzerine yoğunlaşmıştır. ME ile ilgili yeni çalışmalarda, hem probiyotik mikroorganizmayı, hem de probiyotik katkıyı aynı kapsül içine koyarak, gastrointestinal bölgede, her ikisinin açığa çıktıktan sonra simbiyotik etki yapmaları hedeflenmektedir. Gelecekte probiyotiklerin ve probiyotiklerin yanı sıra, nutrasötiklerin de birlikte mikroenkapsüle edilmesi ve gıdaya verilmesini içeren ko-enkapsülasyon uygulamaları önem kazanacaktır. Ayrıca, probiyotiklerin ME'unundan sonra, organizmanın üründe meydana getirdiği biyokimyasal değişiklikler ve sentezlediği maddeler avantaj ve dezavantajlarıyla ayrıntılı şekilde incelenecektir.

KAYNAKLAR

1. De Vuyst L, Falony G, Leroy F. 2008. Probiotics in fermented sausages. *Meat Sci*, 80, 75–78.
2. Cruz AG, Antunes A, Sousa AL, Faria J, Susana S. 2009. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res Int*, Article in press.
3. Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. 2009. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int*, Article in press.
4. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT-Food Sci Technol*, 39, 177–183.
5. Vasiljevic T, Shah, NP. 2008. Probiotics—from metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J*, 18, 714–728.
6. Mattila-Sandholm T, Arinena PM, Crittenden R, Mogensen AG, Fond R, Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J*, 12, 173–182.
7. Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J*, 17, 1262–1277.
8. Knorr D. 1998. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci Tech*, 9, 295–306.
9. Ouwehand, AC, Isolauri SSE. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *A Van Leeuw J Microb*, 82, 279–289.
10. Argin S. 2007. Microencapsulation of probiotic bacteria in xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. Ph. D. Dissertation, University of Maryland, College Park, Amerika, 70p.

11. Mosilhey SH. 2003. Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Institut für lebensmitteltechnologie, Doctor-Ingenieur, El-Beheira, Agypten, 154p.
12. Gouin S. 2004. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends Food Sci Tech*, 15, 330–347.
13. Anal AK, Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Tech*, 18, 240-251.
14. Hsieh YP, Ofori JA. 2007. Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 (1), 65-73.
15. Qi WT, Ma J, Yu WT, Xie YB, Wang W, Ma X. 2006. Behavior of microbial growth and metabolism in alginate–chitosan–alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme Microb Tech*, 38, 697–704.
16. Champagne C, Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotech*, 18, 184–190.
17. Lacroix C, Yildirim S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr Opin Biotech*, 18, 176–183.
18. Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr Iss Intest Microbiol*, 3, 39-48.
19. Hsieh CW, Lu WC, Hsieh WC, Huang YP, Lai CH, Ko WC. 2009. Improvement of the stability of nattokinase using g-polyglutamic acid as a coating material for microencapsulation. *LWT-Food Sci Technol*, 42, 144–149.
20. Dubey R., Shami TC, Bhasker Rao KU. 2009. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Sci J*, 59(1), 82-95.
21. Park JK, Chang HN. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol Adv*, 18, 303–319.
22. Öztürk N. 2006. Hidrofobik nanoyapılarda *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü Yüksek Lisans Tezi, Aydın, Türkiye, 116s.
23. Kabaharnup Y. 2004. İmmobilize *Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla şarap üretimi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 47s.
24. Uyan Ersus S. 2004. Kara havuç antsiyanin ekstraktının püskürtmeli kurutucu kullanılarak mikroenkapsülasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 167s.
25. Piana MD, Morellic L, Strozzi GP, Allesinab S, Barbab M, Deiddab F, Lorenzinib P, Ballar'ea M, Montinoa F, Orselloa M, Sartoria M, Garelloa E, Carmagnolaa S, Pagliaruloa M, Capurso L. 2006. Probiotics: from Research to Consumer. *Digest Liver Dis*, 38 (2): 248–255.
26. Kim S, Cho SY, Kim SH, Song O, Shin S, Cha DS, Park HJ. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC-43121. *LWT-Food Sci Technol*, 41, 493–500
27. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P. 2009. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1, 319–323.
28. Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int*, 39, 203–211.
29. Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem*, 111, 50–55.
30. Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *Int Dairy J*, 19, 77–84.
31. Kailasapathy K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Sci Technol*, 39, 1221–1227.
32. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J*, 13, 3–13.
33. Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.
34. Özer B, Kirmaci HA, Şenel E, Atamer M, Hayaloğlu A. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int Dairy J*, 19, 22–29.
35. Papagianni M, Anastasiadou S. 2009. Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions. *Enzyme Microb Tech*, 45, 514–522.
36. Capela P, Hay B, Shah NP. 2007. Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Res Int*, 40, 1261–1269.
37. Ding WK, Shah NP. 2009. Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *J Food Sci*, 74(6), 231-236.
38. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathya 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.

39. Chandramoulia V, Kailasapathya K, Peiris P, Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J Microbiol Meth*, 56, 27–35.
40. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J*, 14, 737–743.
41. Ding WK, Shah NP. 2009. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J Food Sci*, 74(2).
42. Annan NT, Borza AD, Hansen LT. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res Int*, 41, 184–193.
43. Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MBH, Shahidi F. 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res Int*, 42, 1040–1045.
44. Thantsha MS, Cloete TE, Moolman FS, Labuschagne PW. 2009. Supercritical carbon dioxide interpolymer complexes improve survival of *B. longum* BB-46 in simulated gastrointestinal fluids. *Int J Food Microbiol*, 129, 88–92.
45. Pimentel-González DJ, Campos-Montiel RG, Lobato-Calleros C, Pedroza-Islas R, Vernon-Carter EJ. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int*, 42, 292–297.
46. Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int J Food Microbiol*, 129, 103–105.
47. Mandal S, Puniya AK, Singh K. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int Dairy J*, 16, 1190–1195.
48. Chen KN, Chen MJ, Lin CW. 2006. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *J Food Eng*, 76, 313–320.
49. Muthukumarasamy P, Holley RA. 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol*, 111, 164–169.
50. Allan-Wojtas P, Truelstrup Hansen L, Paulson AT. 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using Standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation, *LWT-Food Sci Technol*, 41, 101-108.