

Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados

Encapsulation: an alternative for application of probiotic microorganisms in thermally processed foods

Carlos Pasqualin Cavalheiro¹, Mariana de Araújo Etchepare¹, Maria Fernanda da Silveira Cáceres de Menezes¹, Cristiano Ragagnin de Menezes² e Leadir Lucy Martins Fries³

¹Mestre, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil
carlos.cavalheiro@mail.ufsm.br; marianaaetchepare@hotmail.com; mfersilver@hotmail.com

²Pós-Doutor, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil
cristiano.ufsm@gmail.com

³Ph.D, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil
lucymicro@yahoo.com.br

Resumo

O consumo de alimentos probióticos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e diversos alimentos probióticos já estão disponíveis no mercado. Entre os microrganismos probióticos se destacam os dos gêneros Lactobacillus e Bifidobacterium. No entanto, a aplicação deste tipo de microrganismo é limitada a produtos que não passem por condições extremas de temperatura durante seu processamento. Assim, técnicas de encapsulação têm surgindo como alternativas para adicionar microrganismos probióticos em produtos processados termicamente. Entre as principais técnicas de encapsulação estão extrusão, spray-drying e emulsificação, sendo que todas apresentam vantagens e desvantagens. Atualmente diversos materiais podem ser utilizados para encapsular bactérias, porém, o alginato é o mais comumente utilizado. Para se obter cápsulas com maior viabilidade mesmo após tratamentos térmicos é necessário associar cepas probióticas termoresistentes e adequados materiais e técnicas de encapsulação.

Palavras-chave: Probióticos. Encapsulação. Termoresistência. Extrusão. Lactobacilli.

Abstract

The consumption of probiotics has increased considerably in recent years and many probiotic foods are already available on the market. Among probiotic microorganisms, Lactobacillus and Bifidobacterium are the most common. However, the application of this kind of microorganism is still limited to foods that not pass through extreme conditions of temperature during processing. Thus, encapsulation techniques are emerging as an alternative to use probiotic microorganisms in thermally processed foods. The main encapsulation techniques are extrusion, spray-drying and emulsification, which each one has its advantages and disadvantages. Currently, various materials can be used for encapsulating bacteria; however, alginate is the most commonly used. To obtain probiotic capsules with high viability even after heat treatments is necessary to associate heat tolerant probiotic strains and appropriated materials and encapsulation techniques.

Keywords: Probiotics. Encapsulation. Thermoresistance. Extrusion. Lactobacilli.

1 Introdução

Atualmente, consumidores buscam cada vez mais por alimentos que sejam seguros, nutritivos e o mais natural possíveis (Jiménez-Colmenero et al., 2006). Por isso, o mercado dos alimentos funcionais cresceu rapidamente nas últimas décadas, devido a essas mudanças comportamentais dos consumidores. Entre os alimentos funcionais, 65% do mercado deste tipo de alimento é representado pelos produtos probióticos (Agrawal, 2005).

O conceito de probióticos surgiu no começo do século 19 devido observações do imunologista russo Elie Metchnikoff que hipotizou que camponeses búlgaros viviam mais e de forma mais saudável devido ao consumo de leites fermentados contendo *Lactobacillus* benéficos que influenciariam na saúde intestinal (Dixon, 2002). Hoje em dia, probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos a quem os consome” (FAO/WHO, 2002).

Probióticos já vem sendo incluído em diversos produtos, tanto alimentícios (Anal & Singh, 2007) quanto para alimentação animal (Gaggià et al., 2010). Os principais microrganismos com características probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Weinbreck et al., 2010), porém outras espécies como *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Saccharomyces* também podem ser utilizadas (Tabela 1). Entre os benefícios do consumo de microrganismos probióticos, pode-se citar o fortalecimento da imunidade, redução nos sintomas de alergias alimentares, controle da síndrome do intestino irritado/inflamado, aumento na tolerância à lactose e redução nos fatores de riscos para alguns tipos de câncer (Parves et al., 2006). No entanto, para que exerçam os efeitos benéficos à saúde, é indicado que a dose diária de probióticos seja entre 10^8 - 10^9 UFC/g (Champagne et al., 2005), sendo que a mínima concentração de probióticos no alimento deve ser entre 10^6 - 10^7 UFC/g no momento do consumo (Nulkaekul et al., 2012).

Por isso, o maior desafio na incorporação de probióticos em alimentos está em manter a viabilidade das bactérias durante o

processamento e período de armazenamento até o consumo do produto (Granato et al., 2010). Dependendo do tipo de alimento, os probióticos estarão sujeitos a uma diversa gama de etapas de produção que não são favoráveis a sua viabilidade, além das características próprias do alimento, de seu armazenamento e condições de consumo. Estudos já relataram a baixa sobrevivência de microrganismos probióticos quando são adicionados como células livres aos alimentos (Burgain et al., 2011; De Vos et al., 2010).

Tabela 1- Principais microrganismos utilizados como probióticos (Vuyst et al., 2004)

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. jhonsonii</i>
	<i>L. paracasei</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
Espécies de <i>Bifidobacterium</i>	<i>L. salivarius</i>
	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. animalis</i>
	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. infantis</i>
	<i>B. lactis</i>
<i>B. longum</i>	
Outras Bactérias Ácido-Láticas	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹
	<i>Enterococcus faecium</i> ¹
	<i>Lactococcus lactis</i>
Outros microrganismos	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Escherichia coli</i> (Nissle 1917) ²
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

¹ Uso principalmente em animais

² Uso principalmente em formulações farmacêuticas

Na indústria de alimentos há uma ampla gama de produtos onde o uso de altas temperaturas no seu processo de fabricação é utilizado. Entre estes, estão a pasteurização ou esterilização de leite e sucos, cozimento de produtos cárneos e pelletização de rações. O processo de fabricação destes produtos inviabiliza a utilização de probióticos uma vez que estes não são capazes de resistir a temperaturas extremas. Nesse contexto a

encapsulação surge como uma tecnologia promissora e que já vem sendo utilizada para oferecer proteção aos microrganismos probióticos e aumentar a sua sobrevivência em vários tipos de alimentos (Homayouni et al., 2008; Ozer et al., 2009; Heidebach et al., 2012). Diversos estudos estão sendo realizados objetivando um aumento na resistência térmica de probióticos através da sua encapsulação como uma alternativa para sua utilização em alimentos termicamente processados (Cavalheiro et al., 2015; Chen et al., 2007; Chitprasert et al., 2012; Ding & Shah, 2009; Mandal et al., 2006; Sabikhi et al., 2010; Shaharuddin & Muhamed, 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Por isso, o objetivo deste trabalho é fazer uma revisão sobre os principais métodos de encapsulação e suas aplicabilidades na tentativa de aumentar a resistência térmica de probióticos.

2 Encapsulação

Encapsulação pode ser definida como uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas que são capazes de liberar seu conteúdo em determinado momento sob influência de condições específicas (Anal & Stevens, 2005; Kailasapathy & Masondole, 2005; Anal et al., 2006; Anal & Singh, 2007). A técnica de encapsulação já é amplamente utilizada nas áreas alimentícia, têxtil, agroquímica e farmacêutica.

Em relação à estrutura das cápsulas, o material externo é chamado de agente encapsulante, de cobertura ou parede, enquanto o material encapsulado (probióticos) é chamado de recheio ou núcleo (Gibbs et al., 1999; Champagne & Fustier, 2007; Fávaro-Trindade et al., 2008; Fritzen-Freire et al., 2013). Ainda, as cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macrocápsulas, que são aquelas maiores que 5000 μm e, microcápsulas, onde o tamanho varia entre 0,2 e 5000 μm . Os fatores determinantes para o tamanho das cápsulas são basicamente o material de parede e a técnica utilizada para a encapsulação.

Atualmente existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para encapsular probióticos, sendo que as mais comumente utilizadas são extrusão, atomização (spray-drying) e emulsificação.

2.1 Técnicas de encapsulação

2.1.1 Extrusão

A extrusão é uma técnica física de encapsulação que utiliza hidrocolóides como materiais encapsulantes. O material a ser encapsulado é completamente homogeneizado com o material encapsulante. A encapsulação ocorre através do gotejamento dessa solução em outra solução solidificante (cloreto de cálcio) através de um bico. Geralmente, este processo produz cápsulas com tamanho variando entre 2 e 5 mm (Figura 1) (Krasaekoopt et al., 2003). Porém, é possível o uso de um sistema com pressão, o que reduz consideravelmente o tamanho final das cápsulas. Por fim, as cápsulas são separadas da solução solidificante e podem ser secas ou usadas *in natura*. A extrusão é um método simples e barato e como não envolve o uso de condições extremas, produz uma grande viabilidade probiótica (Krasaekoopt et al., 2003; Burgain et al., 2011). Geralmente, a eficiência de encapsulação (EE) ao utilizar essa técnica é próxima de 100% (Krasaekoopt et al., 2004; Kushal et al., 2006; Urbanska et al., 2007).

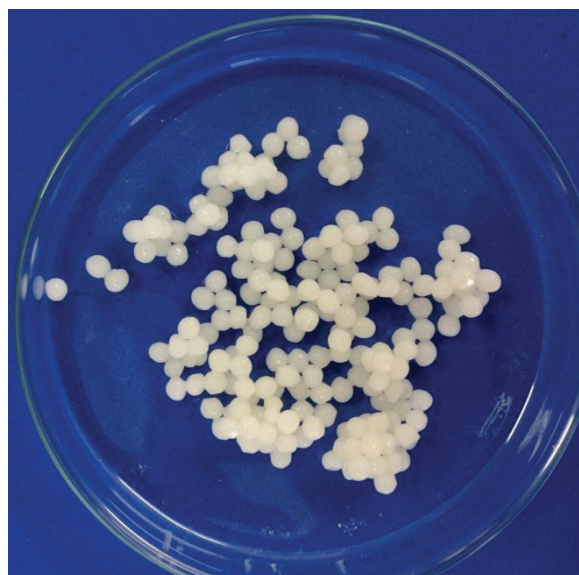


Figura 1 - Cápsulas contendo *Lactobacillus plantarum* obtidas através da técnica de extrusão, utilizando como materiais de cápsula alginato de sódio, trehalose, leite em pó e inulina

Fonte: Os autores

O material mais comumente utilizado para encapsular probióticos através da técnica de extrusão é o alginato, que é um polissacarídeo extraído de diversas espécies de algas e

composto pelos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. No entanto, as cápsulas obtidas com o uso de alginato são porosas, o que é uma desvantagem quando se deseja proteger os microrganismos de ambientes adversos (Gouin, 2004). Porém, este defeito pode ser compensado pela mistura de alginato com outros polímeros, cobrindo as cápsulas com outros compostos ou aplicando mudanças estruturais no alginato pela adição de diferentes aditivos (Krasaekoopt et al., 2003). Estudos já relataram a mistura de alginato com gelatina, amido, leite entre outras para encapsular probióticos pela técnica de extrusão (Ross et al., 2008; Li et al., 2009; Babu et al., 2009).

2.1.2 Spray-drying

Encapsulação através de spray-drying já é utilizada desde a década de 1950 em uma variedade de aplicações como vitaminas, minerais, óleos de peixe e probióticos (Gouin, 2004; Desai & Park, 2005). Nesta técnica, a solução contendo os probióticos e o material de cápsula é atomizado em uma câmara e a água é evaporada através do contato com o ar quente fazendo com que ocorra a secagem e formação da cápsula. Entre as vantagens desta técnica estão a facilidade de implantação em escala industrial, baixo custo operacional e facilidade de operação contínua. No entanto, devido o uso de altas temperaturas, seu uso é limitado a materiais que apresentem determinada resistência térmica. Apesar de esta ser uma das formas mais tradicionais utilizadas para encapsular probióticos, alguns estudos não indicam seu uso devido à perda de viabilidade durante o processo (Gibbs et al., 1999; Kailasapathy, 2002; Madene et al., 2006; Mortazavian et al., 2007).

No entanto, a perda de viabilidade probiótica pode ser amenizada através de ajustes nas temperaturas de inlet e outlet para minimizar o choque térmico (Champagne & Fustier, 2007). A perda de viabilidade também vai depender do tipo de material utilizado como material de cápsula. Por exemplo, a adição de amidos aumenta a viabilidade probiótica durante o processo de secagem e armazenamento (Burgain et al., 2011).

2.1.3 Emulsificação

A técnica de emulsificação também é amplamente utilizada para encapsular probióticos. Esta técnica consiste na dispersão da solução contendo os microrganismos probióticos e o material encapsulante (fase dispersa) em um óleo (fase contínua). Esta mistura quando submetida à agitação forma uma emulsão água-em-óleo (W/O), que pode ser tanto permanente quanto temporária. O cloreto de cálcio também é utilizado nesta técnica, e quando adicionado à emulsão faz com que ocorra a separação de fases (Krasaekoopt et al., 2003) liberando as cápsulas. No entanto, pode-se utilizar a emulsão permanente contendo os microrganismos encapsulados como ingrediente na preparação de produtos alimentícios.

O alginato também é amplamente utilizado como material de cápsula ao utilizar a técnica de emulsificação (fase dispersa). No entanto, outros materiais também podem ser utilizados como carragenas (Audet et al., 1988), quitosana (Groboillot et al., 1993), gelatina (Hyndman et al., 1993) e celulose acetato phthalate (Rao et al., 1989). Já como fase contínua, para aplicações em alimentos, óleos vegetais como canola, soja, oliva e arroz são normalmente usados (Lamba et al., 2015).

As principais vantagens desta técnica são a facilidade de utilizar-la em grande escala e a obtenção de uma alta eficiência de encapsulação (Chen & Chen, 2007). Ainda, a técnica de emulsão é capaz de formar cápsulas com tamanho muito menor quando comparada à técnica de extrusão, o que pode ser considerado como uma característica desejável dependendo do tipo de alimento onde elas serão incorporadas (Burgain et al., 2011). No entanto, a técnica de emulsificação pode formar cápsulas com formato irregular (Muthukumarasamy & Holley, 2006), e é menos econômica devido à necessidade do uso de óleos vegetais e estabilizantes de emulsão (Gbassi & Vandamme, 2012).

Mais recentemente surgiu o conceito de emulsões duplas ou múltiplas que são sistemas multicompartimentados onde uma emulsão W/O e uma óleo-em-água (O/W) coexistem (Garti, 1997; Marquez & Wagner, 2010; Jimenez-Colmenero, 2013). Assim, surgem as emulsões água-em-óleo-em-água (W/O/W) ou óleo-em-água-em-óleo (W/O/W). Microrganismos como

L. acidophilus, *L. plantarum* (Figura 2), *L. rhamnosus* e *L. salivarius* já foram encapsulados utilizando esta técnica (Shima et al., 2009; Pimentel-González et al., 2009; Rodríguez-Huezo et al., 2014; Zhang et al., 2015).

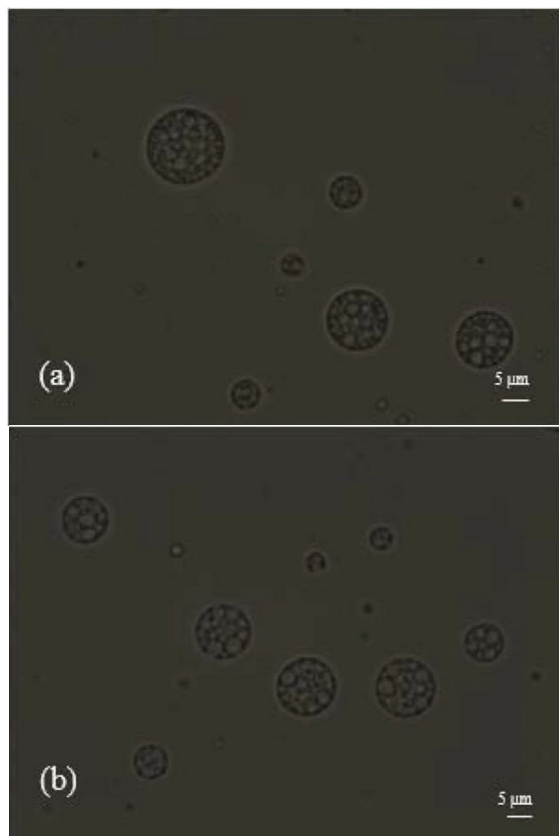


Figura 2 - Cápsulas contendo *Lactobacillus plantarum* obtidas através da técnica de emulsão dupla (W/O/W), utilizando “Aguamiel” (a) e soro de leite (b) como materiais de cápsula. Aumento de 100x
Fonte: Rodríguez-Huezo et al. (2014)

3 Encapsulação de probióticos e resistência térmica

Para que um microrganismo seja incorporado a um alimento, este deve resistir às diversas etapas de processamento, armazenamento e consumo. Sabe-se que, por cada etapa destas ocorrem quedas na viabilidade probiótica, o que acaba por muitas vezes limitar o uso deste tipo de prática na indústria de alimentos. Entre os principais responsáveis na queda da viabilidade probiótica está o uso de altas temperaturas durante o processamento (Ang et al., 1991; Kim et al., 2001). Assim, a encapsulação de probióticos surge como uma alternativa para a incorporação deste tipo de microrganismo em alimentos que são processados termicamente. No

entanto, estudos envolvendo a produção de cápsulas probióticas resistentes á altas temperaturas e sua aplicabilidade em alimentos é escassa. Na tabela 2 estão resumidos os principais estudos realizados com este objetivo.

Conforme Kim et al. (2001), a temperatura subletal e letal de *L. acidophilus* é 53 e 60 °C, respectivamente. Ao expor este microrganismo tanto na forma livre, quanto encapsulado em alginato de sódio (4%) e amido a temperaturas de 75, 85 e 90 °C por 30s, Sabikhi et al. (2010) observou reduções entre 8 e 9 log UFC/g na viabilidade de *L. acidophilus* na forma livre. No entanto, quando encapsulados, a redução na viabilidade foi significamente menor, entre 1 e 4 log UFC/g. A maior proteção aos probióticos encapsulados também está relacionada à concentração de alginato utilizada, uma vez que maiores concentrações oferecem maior proteção aos probióticos durante o tratamento térmico (Hannoun & Stephanopoulos, 1986; Mandal et al., 2006; Sabikhi et al., 2010). Porém, cápsulas de alginato normalmente apresentam poros, o que permite a difusão da temperatura para o interior da cápsula (Mandal et al., 2006; Ding & Shah, 2009; Gouin, 2004). Outros materiais que podem ser utilizados na encapsulação de probióticos, como o carboximetilcelulose também apresentam o problema de gerar cápsulas porosas (Butun et al., 2011). Como alternativa, outros materiais de cápsulas podem ser incluídos como quitosana, trehalose, inulina, leite em pó, maltodextrina, farelo de arroz, entre outros para aumentar a proteção aos probióticos (Cavalheiro et al., 2015; Silva et al., 2015; Chitprasert et al., 2012).

Conforme Cavalheiro et al. (2015), ao encapsular *L. plantarum* em alginato, leite em pó, inulina e trehalose foi possível manter a viabilidade probiótica por um maior período de tempo ao expor estas cápsulas a temperaturas de 70 °C. No entanto, sempre haverá perda de viabilidade probiótica ao expor as cápsulas aos tratamentos térmicos. Isso se deve a inativação de microrganismos que estão localizados na superfície externa da cápsula e desta forma não possuem a mesma proteção quando comparados aos microrganismos que se localizam na parte interna da cápsula. Simulando o tempo e temperatura utilizados para pelletizar rações de frango (85 °C por 25 seg), Chitprasert et al. (2012)

Tabela 2 - Microrganismos probióticos encapsulados submetidos a provas de resistência a altas temperaturas

Microrganismo	Técnica	Material	Temp./Tempo	Referência
<i>L. salivarius</i>	Emulsão S/O/W ¹	Pectina de beterraba	63 °C / 30 min	Zhang et al. (2016)
<i>L. rhamnosus</i>	Imobilização e extrusão	Alginato e bagaço de cana de açúcar	90 °C / 40 seg	Shaharuddin & Mohamad (2015)
<i>L. kefiranofaciens</i>	Liofilização	Alginato, goma gelana e leite em pó desnatado	De 25 a 75 °C, mantendo por 1 min	Wang et al. (2015)
<i>L. salivarius</i>	Emulsão multi-camadas	Isolado proteico de soro, caseinato de sódio e pectina	63 °C / 30 min	Zhang et al. (2015)
<i>L. plantarum</i>	Extrusão	Alginato, inulina, trehalose e leite em pó	70 °C / 5, 10, 20 e 30 min	Cavalheiro et al. (2015)
<i>L. plantarum</i>	Emulsão W/O/W ²	“Aguamiel” e soro de leite	73 °C / 3 min	Rodríguez-Huezo et al. (2014)
<i>L. reuteri</i>	Emulsão	Carboximetil celulose e farelo de arroz	85° C/ 25 seg	Chitprasert et al. (2012)
<i>L. acidophilus</i>	Emulsão	Alginato e amido	75, 85 e 95 °C / 30 seg	Sabikhi et al. (2010)
<i>B. bifidum</i>	Extrusão	Alginato e goma gelana	75 °C / 1 min	Chen et al. (2007)

¹ Emulsão sólido-em-óleo-em-água

² Emulsão água-em-óleo-em-água

também relatam que a associação de carboximetilcelulose de alumínio juntamente com farelo de arroz é capaz de promover maior proteção ao *L. reuteri*. Este microrganismo, apesar de apresentar características termotolerantes (Nitisinprasert et al., 2000) não foi capaz de manter uma alta viabilidade após o tratamento térmico empregado (85 °C/25 seg). Estes resultados evidenciam uma vez mais a necessidade de associar probióticos com características termotolerantes a adequados materiais de cápsulas e técnicas de encapsulação para obter resultados satisfatórios e passíveis de aplicação pela indústria. Ao usar *L. salivarius* que possui uma fraca tolerância térmica (Gardiner et al., 2000), em uma emulsão sólido-em-água-em-óleo (S/W/O), Zhang et al. (2016) não observaram uma proteção eficaz frente aos tratamentos térmicos (63 °C por 30 minutos). Após o tratamento térmico, foram observados valores de *L. salivarius* na forma livre abaixo dos níveis de detecção (< 1 log UFC/g) enquanto que na forma encapsulada ficaram entre 1,48 e 1,78 UFC/g.

Valores baixos de probióticos não permitem a aplicação das cápsulas em alimentos, uma vez que para ser considerado como alimento probióticos, este deve estar em número superior a 6 log UFC/g no momento do consumo (Nulkaekul et al., 2012).

Utilizar probióticos encapsulados por spray-drying em alimentos processados termicamente não parece ser vantajoso. Devido à utilização de altas temperaturas, o processo de encapsulação pode produzir injúrias nas células probióticas, diminuindo assim sua resistência ao passar por um novo tratamento térmico durante o processamento do alimento.

Outro fator importante é o estudo da aplicabilidade de cápsulas probióticas *in vivo*, ou seja, diretamente no alimento que sofrerá o processo térmico. Nesse contexto, Rodríguez-Huezo et al. (2014) estudaram a viabilidade de *L. plantarum* encapsulados em emulsões duplas contendo “Aguamiel” e soro de leite adicionadas em queijo Oaxaca. Este tipo de queijo é muito popular no México e seu consumo envolve o seu

derretimento, uma vez que consumido juntamente com “tortillas”. Após o tratamento térmico (73 °C por 3 min), foi observada uma redução de 2,18 log UFC/g para o tratamento sem emulsões duplas enquanto nos tratamentos com emulsões duplas foi de 1,42 e 1,94 log UFC/g, possuindo contagens finais superiores a 6 log UFC/g, que é a mínima concentração para que o alimento seja considerado como probióticos (Nulkaekul et al., 2012). De acordo com os autores, a maior proteção térmica nos tratamentos com *L. plantarum* se deve aos materiais utilizados na encapsulação, uma vez que o “Aguamiel” possui uma grande concentração de frutoligossacarídeos que agem como termoprotetores (Rodríguez-Huezo et al., 2009) enquanto o soro de leite possui capacidade tamponante contra condições de acidez (Pimentel-González et al., 2009).

Outros estudos também evidenciam a possibilidade de imobilizar bactérias probióticas em pedaços de frutas e assim aumentar a resistência às temperaturas utilizadas na produção de vinho e queijos (Kourkotas et al., 2006a; Kourkotas et al., 2006b).

Porém, apesar do potencial uso da probióticos encapsulados em alimentos termicamente processados, novos estudos são necessários objetivando verificar as possíveis alterações que a inclusão deste tipo de ingrediente pode ocasionar nas características sensoriais dos produtos.

7 Conclusões

Apesar de ser um campo de estudo recente, a encapsulação de probióticos com a finalidade de uso em alimentos termicamente processados é promissora. A escolha de microrganismos que já apresentem maior resistência térmica, assim como adequados materiais e técnicas de encapsulação é fundamental para o sucesso e possibilitar sua aplicação pela indústria. No entanto, mais estudos ainda são necessários para verificar os microrganismos mais adaptados para este fim, assim como materiais e técnicas de encapsulação. Ainda, estudos para verificar as possíveis alterações sensoriais provocadas pelo uso destas cápsulas também estão em falta.

Referências

- Agrawal R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnol.* 2005;19(3):227-246.
- Anal AK, Stevens WF. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm.* 2005;290(1-2):450-454.
- Anal AK, Stevens WF, Remuñán-López, C. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm.* 2006;312(1-2):166-173.
- Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol.* 2007;18(5):240-251.
- Ang D, Lieereck K, Showyra D, Zylicz M, Georgopoulos C. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem.* 1991;266(36):24233-24236.
- Audet P, Paquin C, Lacroix C. Immobilized growing lactic-acid-bacteria with k-carrageenan – locust bean gum gel. *Appl Microb Biotechnol.* 1989;29(1):11-18.
- Babu R, Sabikhi L, Thompson DK. Microencapsulation for enhancing the survival of probiotic *Lactobacillus paracasei* S233. *J Food Sci Technol.* 2009;46(4):325-330.
- Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng.* 2011;104(4):467-183.
- Butun S, Ince FG, Erdugan H, Sahiner N. One-step fabrication of biocompatible carbocymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems. *Carbohydr Polym.* 2011;86(2):636-643.
- Cavalheiro CP, Menezes CR, Fries LLM, Herrero AM, Jimenez-Colmenero F, Ruiz-Capillas C. Alginate beads to improve viability of *Lactobacillus plantarum* to heat stress. *J Food Process Technol.* 2015;6(5):126.
- Champagne CP, Gardner NJ, Roy D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(1):61-84.
- Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(2):184-190.

- Chen MJ, Chen KN. Applications of probiotic encapsulation in dairy foods. In: Lakkis JM, editor. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 2007. p. 83-107.
- Chen MJ, Chen K, Kuo Y. Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan – Alginate microparticles. *Bioetchnol Bioengin.* 2007;98(2):411-419.
- Chitprasert P, Sudai P, Rodklongtan A. Aluminum carboxymethyl cellulose-rice microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydr Polym.* 2012;90(1):78-86.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J.* 2010;20(4):292-302.
- Desai KGH, Park HJ. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* 2005;23(7):1361-1394.
- Ding WK., Shah NP. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated bacteria. *J Food Sci.* 2007;72(9):M446-M450.
- Dixon B. Secrets of the Bulgarian bacillus. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(4):260.
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London, Canada. 2002.
- Favaro-Trindade CS, Pinho SC, Rocha GA. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz J Food Technol.* 2008;11(2):103-112.
- Fritzen-Freire CB, Prudêncio ES, Pinto SS, Muñoz IB, Amboni RDMC. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium BB-12* exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT – Food Sci Technol.* 2013;50(1):39-44.
- Gaggià F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol.* 2010;141(Suppl 2):S15-S28.
- Gardiner G, O’Sullivan E, Kelly J, Auty M, Fitzgerald G, Collins J, Ross RP, Stanton C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray-drying. *App Environ Microbiol.* 2010;66(6):2605-2612.
- Garti N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food application. *LWT – Food Sci Technol.* 1997;30(3):222-235.
- Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics.* 2012;4(1):149-163.
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 1999;50(3):213-224.
- Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Technol.* 2004;15(1-2):330-347.
- Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JAF, Shah NP. Probiotic dairy products as functional foods. *Comp Rev Food Sci Technol.* 2010;9(5):455-470.
- Groboillot AF, Champagne CP, Darling GD, Poncelet D, Neufeld RJ. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Bioeng.* 1993;42(10):1157-1163.
- Hannoun B, Stephanopoulos G. Diffusion coefficient of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol Bioeng.* 1986;28(6):829-835.
- Heidebach T, Forst P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(4):291-311.
- Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem.* 2008;111(1):50-55.
- Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *J Chem Technol Biotechnol.* 1993;56(3):259-263.
- Jiménez-Colmenero F, Reig M, Toldrà F. New approaches for the development of functional meat products. In: Nollet LML, Toldrà F., editors. *Advanced technologies for meat processing*, 2006. p. 275-308.
- Jiménez-Colmenero F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res Intern.* 2013;52(1):64-74.
- Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications.

- Cur Issues Intest Microbiol. 2002;3(2):39-48.
- Kailasapathy K, Masondole L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Aust J Dairy Technol.* 2005;60(3):252-258.
- Kim WS, Perl L, Park HJ, Tandianus EJ, Dunn WM. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr Microbiol.* 2001;43(5):346-350.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J.* 2003;13(1):3-13.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating material on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J.* 2004;14(8):737-743.
- Kourkotas Y, Kanellaki M, Koutinas AA. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT – Food Sci Technology.* 2006a;36(9):980-986.
- Kourkotas Y, Bosnea L, Taboukos S, Baras C, Lambrou D, Kanellaki M. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. *J Dairy Sci.* 2006b;89(5):1439-1451.
- Kushal R, Anand SK, Chander H. In vivo demonstration of enhanced probiotic effect of co-immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *Int J Dairy Technol.* 2006;59(4):265-271.
- Lamba H, Sathish K, Sabikhi L. Double emulsions: Emerging delivery system for plant bioactives. *Food Bioprocess Technol.* 2015;8(4):709-728.
- Li XY, Chen XG, Cha DS, Park HJ, Liu CS. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *J Microencapsul.* 2009;26(4):315-324.
- Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int J Food Sci Technol.* 2006;41(1):1-21.
- Mandal S, Puniya AK, Singh K. Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NDC-298. *Int Dairy J.* 2006;16(10):1190-1195.
- Márquez AL, Wagner JR. Rheology of double (w/o/w) emulsions prepared with soybean milk and fortified with calcium. *J Text Stud.* 2010;41(5):651-671.
- Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principle's and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran J Biotechnol.* 2007;5(1):1-18.
- Muthukumarasamy P, Holley RA. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol.* 2006;111(2):164-189.
- Nitisingprasert S, Nilphai V, Bunyun P, Sukyai P, Doi K, Sonomoto K. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* resistant to antibiotics. *Kasetsart J (Nat Sci).* 2000;34(3):387-400.
- Nulkaekul S, Lenton D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydr Polym.* 2012;90(3):1281-1287.
- Ozer B, Kirmachi A, Senel E, Atamer M, Hayaloglu A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int Dairy J.* 2009;19(1):22-29.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006;100(6):1171-1185.
- Pimentel-González GD, Campos-Montiel RG, Lobato-Calleros C, Pedroza-Islas R. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int.* 2009;42(2):292-297.
- Rao AV, Shiwanarain N, Maharaj I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canad Instit Food Sci Technol J.* 1989;22(4):345-349.
- Rodríguez-Hueso ME, Durán-Lugo R, Prado-Barrágan LA, Cruz-Sosa F, Lobato-Calleros C, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Res Int.* 2007;40(10):1299-1306.
- Rodríguez-Hueso ME, Estrada-Fernández AG, García-Almendárez BE, Ludeña-Urquiza F, Campos-Montiel RG, Pimentel-González GD. Viability of

Lactobacillus plantarum entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *LWT – Food Sci Technol.* 2014;59(2):768-773.

Ross GR, Gusils C, Gonzalez SN. Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(11):2121-2125.

Sabikhi L, Babu R, Thompkinson DK, Kapila S. Resistance of microencapsulated Lactobacillus acidophilus La1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food Bioproc Technol.* 2010;3(4):586-593.

Silva PT, Fries LLM, Menezes CR, Silva CB, Soriani HH, Bastos JO, Motta MH, Ribeiro RF. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciênc Rural.* 2015;45(7):1342-1347.

Shaharuddin S, Muhamad II. Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with Lactobacillus rhamnosus NRRL 442: Enhancement of survivability and thermotolerance. *Carbohydr Polym.* 2015;119(1):173-181.

Shima M, Matsuo T, Yamashita M, Adachi S. Protection of Lactobacillus acidophilus from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. *Food Hydrocol.* 2009;23(2):281-285.

Urbanska AM, Bhathena J, Prakash S. Live encapsulated Lactobacillus acidophilus cells in yogurt for therapeutic oral delivery: Preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85(9):884-893.

Vuyst LD, Avonts L, Makras L. Probiotics, prebiotics and gut health. In: Remacle C, Reusens, B, editors. *Functional foods, ageing and degenerative disease.* 2004, p. 416-482.

Wang SY, Ho YF, Chen YP, Chen MJ. Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium Lactobacillus kefirifaciens M1. *Food Microbiol.* 2015;46:494-500.

Weinbreck F, Bodnár I, Marco ML. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *Int J Food Microbiol.* 2010;136(3):364-367.

Zhang Y, Lin J, Zhong Q. The increased viability of probiotic Lactobacillus salivarius NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Res Int.* 2015;71(1):9-15.

Zhang Y, Lin J, Zhong Q. S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic Lactobacillus salivarius NRRL B-30514. *Carbohydr Polym.* 2016;52:804-810.