

유산균 함유 이중층 미세캡슐화를 위한 조건 최적화

박병규 · 이종혁 · 신혜경 · 이재환 · 장판식*

서울산업대학교 식품공학과

Optimization of Conditions for the Double Layer Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria

Byoung-Gye Park, Jong Hyuk Lee, Hye Kyoung Shin, JaeHwan Lee, and Pahn Shick Chang*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Abstract In this study, we sought to produce a double layer microcapsule containing *Lactobacillus* sp. as the core material. The conditions for this microencapsulation process were optimized for the formation of a microcapsule with high storage stability. The effects of the ratio of [core material] to [wall material], the type and concentration of emulsifier used, the stirring rate (dispersibility) and the temperature of the dispersion fluid on the microencapsulation yield were studied. The optimal concentration and type of emulsifier required in order to allow for the stable formation of a W/O type emulsion (a primary process in double layer microencapsulation) were 1.00% (w/w) and polyglycerol polyricinoleate (PGPR, HLB 0.6). However, the optimal concentration and type of emulsifier required to construct a W/O/W type emulsion (a secondary process in double layer microencapsulation), were 0.65% (w/w) and polyoxyethylene sorbitan monolaurate (PSML, HLB 16.7). Finally, we obtained a maximum yield of microencapsulation with a dispersion fluid stirring rate of 270 rpm and a dispersion fluid temperature of 10°C after spraying a W/O/W type emulsion into the dispersion fluid.

Key words: emulsion, double layer microencapsulation, *Lactobacillus*, emulsifier

서 론

미세캡슐화란 고체, 액체, 기체상의 물질을 특정 조건하에서 조절된 속도로 내용물을 방출할 수 있도록 특성의 물질이나 조직 내부에 포장하는 기술을 지칭한다. 이때의 미세한 포장단위를 미세캡슐(microcapsule)이라고 하며, 그 크기(직경)는 수 μm 에서 수 mm 범위로 분포되는데, 모양은 구형이 이상적이지만 캡슐화 되기 전 원래의 물질구조에 따라 타원형 혹은 직육면체와 같이 형태가 다양하게 변할 수 있다(1,2).

미세캡슐화 기술의 상업적 응용에 대한 역사를 살펴보면 1973년대 말경으로 거슬러 올라가는데, 당시 National Cash Register사에 의하여 개발된 「탄소 가루 없는」 먹지(먹이 묻어나지 않는 염색물질의 전구체를 gelatin으로 미세캡슐화시켜 사용한 것으로서 그 당시에는 coacervation이라고 표현하였음)가 최초로 개발되었던 것이다. 한편, 제약공업에서는 더 빨라서 1931년에 gelatin 코팅에 의한 미세캡슐화 기술을 이미 사용하였다. 그 후 Wisconsin 대학의 Dale Wurster 팀에 의하여 많은 발전을 하여 1950년대에 전성기를 이루었다(3).

최근에는 캡슐화 기술에 의하여 *Bifidus*균을 장까지 안전하게 운반할 수 있는 보호기능에 대한 여러 보고들이 있으며(4), 예전

에는 단순히 식품영양학적 기능만 있던 물질들을 캡슐화 기술을 접목시킴에 의하여 만성퇴행성 질환, 성인병 등 질병예방과 치료 등에 이용할 수 있다는 것을 과학적으로 증명하는 연구들이 수행되어왔다(5-15). 이외에도 다양한 생리적 기능을 가진 것으로 보고되어지는 EPA와 DHA가 풍부하게 함유된 어유를 캡슐로 제조하거나 분말화하여 건강 보조 식품, 수산식품, 제과, 제빵, 탄산음료, 가공치즈, 조제분유 등에 첨가하여 상품화하고 있다.

건강한 사람의 장내 미생물 균총이 질병이나 항생제 투여 등에 의하여 균형을 잃게 되어 장내에 유해한 미생물이 증가하면서 소화불량이나 복부 팽만 등의 증상이 나타나며, 이러한 증상에 대한 예방 및 치료제로서 유산균 제제가 사용되어 왔으며 우유나 유산균 발효유의 섭취가 권장되어 왔다. 이때 경구 투여된 유산균은 위장의 낮은 pH와 담즙산 등으로 인하여 위장과 소장 상부에서 사멸될 수 있으므로 낮은 pH에서 생존할 수 있거나 낮은 pH에 노출을 방어하는 방법이 필요하며(16,17), 이러한 필요에 부응하기 위하여 장내 유익균을 캡슐화하는 방안이 대두되기 시작하였는데, 이때의 캡슐은 외부로부터 내부의 유산균을 보호하고 적절한 안전성과 견고성을 가져야 하며 동시에 장내에서는 파괴되어 목적 유산균이 유리되어야만 한다.

따라서, 본 논문에서는 유산균의 생존율을 높여 장내에 도달할 수 있도록 미세캡슐화 공정을 개발하고 그 공정에 관련된 중요 변수들을 최적화하였다. 즉, 옥배경화유를 이용해 유산균을 1차 캡슐화한 후 최종의 피복물질로 2차 캡슐화함으로써 내산성 및 저장·운반성을 향상시키도록 유산균을 함유하는 2중층 미세캡슐을 제조하되, 2중층 미세캡슐화의 전단계인 유화(emulsification) 단계 및 미세캡슐화와 관련된 분산액내로의 분무 공정 요인들을 최적화하였다.

*Corresponding author: Pahn Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Gongneung 2-dong, Noweon-gu, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6437
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: pschang@snut.ac.kr
Received October 16, 2006; accepted October 23, 2006

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 식품유화제인 polyglycerol polyricinoleate(HLB 0.6), glycerol monooleate(HLB 2.8), propyleneglycol monoester(HLB 3.4), glycerol monolaurate(HLB 4.0), sorbitan monooleate(HLB 4.3), sorbitan monostearate(HLB 4.7), glycerol monostearate(HLB 5.0), sorbitan monopalmitate(HLB 6.7), polyoxyethylene sorbitan monostearate(HLB 9.6), polyglycerol monooleate(HLB 13.0), polyoxyethylene sorbitan monolaurate(HLB 16.7) 등은 (주)일신유화(서울, 한국)에서 제공 받았으며 모두 95.0% 이상의 순도를 갖는 제품을 사용하였다. 1차 피복물질(wall material, Wm)로 사용한 옥배경화유는 (주)영미산업(용인, 경기도)에서 구입하였으며, 2차 피복물질로서는 sweet potato starch(Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)와 gelatin((주)덕산화학, 김포, 한국)을 사용하였고, 유산균의 일종인 *Lactobacillus* sp.를 중심물질로 사용하였다. 피복물질 제조 및 분산매에 사용한 물은 pH 6.8-7.0의 탈이온화 된 2차 증류수이며, 기타 시약은 EP등급 이상을 사용하였다.

유화안정지수의 산출

W/O형 및 W/O/W형 유화계의 유화안정성을 결정하기 위한 유화안정지수 산출법은 Chang 등이 보고한 아래의 계산식을 이용하였다(18).

즉, 유산균 함유 수분층-1차 유화제-옥배유 함유 기름층의 W/O형 단일층 유화계와 유산균을 둘러싼 옥배유 유화층-2차 유화제-다당류 호화액으로 이루어진 W/O/W형 2중층 유화계를 형성시킨 후, 시간이 경과함에 따라 분리되어지는 유산균층과 옥배유층의 부피를 각각 측정하여 그 측정값을 아래 식에 대입하여 ESI 값을 산출하였다.

$$\text{유화안정지수(ESI, \%)} = \left[1 - \frac{\text{분리된 (유산균층/옥배유층)의 부피}}{\text{유화액 내 (유산균층/옥배유층)의 총 부피}} \right] \times 100$$

W/O형 유화액내의 중심 물질(Cm) 제조

본 연구에서 사용한 중심물질인 *Lactobacillus* sp.를 증류수에 1차 유화제(polyglycerol polyricinoleate, PGPR, HLB 0.6)와 함께 첨가하여 8,000 rpm의 고속으로 균질화 시켰다. 0.025%(w/w)의 oil red O로 염색시킨 녹는점이 30°C인 옥배경화유(Wm, 본 연구에서의 1차 피복물질이며 Wm으로 표기하였음)를 첨가하여 다시 균질화 시킴으로써 2중층 미세캡슐 형성을 위한 전단계인 W/O형 유화액내의 중심물질(Cm, 본 연구에서의 1차 중심물질이며 Cm으로 표기하였음)을 제조하였다.

2차 피복물질(WM)의 제조

예비실험 결과, 단일종류의 피복물질보다 복합물질 사용법이 더 효율적인 것으로 판명되었으며, 따라서 본 연구에서의 최종 바깥층 피복물질(본 연구에서의 2차 피복물질이며 1차 피복물질과 구분하기 위하여 WM으로 표기함)은 sweet potato starch와 gelatin을 1:4(w/w)의 비율로 혼합하여 65°C에서 호화시켜 제조하였다.

W/O/W형 유화액의 제조

Fig. 1의 장치에서, 항온수조에 증류수를 채우고 온도를 50°C로 유지시킨 후 미리 준비한 W/O형 유화액인 2차 중심물질(CM,

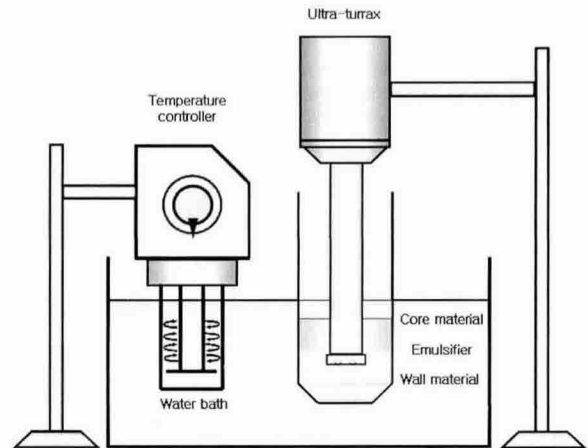


Fig. 1. Schematic diagram of emulsification tool.

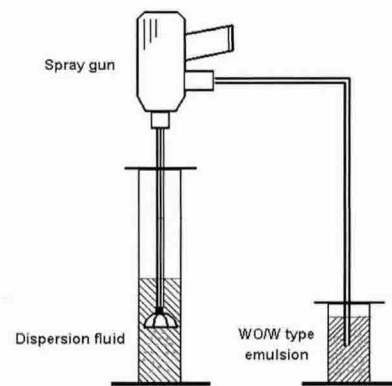


Fig. 2. Schematic diagram of microencapsulation tool.

본 연구에서의 2차 중심물질은 전술한 방법에 의하여 준비한 W/O형 유화액이며 1차 중심물질과 구분하기 위하여 본 논문에서는 CM으로 표기하였음)과 유화제를 혼합하여 Ultra-turrax T25(Janke & Kunkel, Staufen, Germany)를 사용하여 8,000 rpm의 고속으로 50초간 강하게 교반하였으며 미리 준비한 최종 피복물질(2차 피복물질, WM)을 첨가하여 60초간 교반함으로써 W/O/W형의 2중층 미세캡슐 제조를 위한 유화액 형성을 완성하였다.

분산매의 제조

증류수에 HLB가 9.6(polyoxyethylene sorbitanmonostearate)인 유화제를 0.025% 농도로 첨가하여 강하게 교반하여 용해시킨 후 10°C로 유지하여 보관하면서 2중층 미세캡슐 형성을 위한 분산매로 사용하였다.

2중층 미세캡슐의 완성

미리 준비한 W/O/W형 유화액을 Fig. 2의 미세캡슐화 장치에 적용시키되, 분무기를 사용하여 분산매내로 분무함으로써 직경 10 μm 내외의 미세한 캡슐을 제조하였다.

비극성 유기용매 추출법에 의한 미세캡슐화 수율 측정

미세캡슐화 공정을 완성한 후 비극성 유기용매인 *n*-hexane을 50 mL 첨가하되, 미세캡슐이 함유된 현탁액과의 비율이 1:1(v/v)이 되게 혼합하였으며 50 rpm 이하의 저속으로 교반한 후 30분 동안 정치시켰다. 정치 후, 미세캡슐화 되지 못한 중심물질을 합

Table 1. Effect of various emulsifiers on W/O type emulsion stability index

Kinds of emulsifiers (HLB)	Emulsion stability index (%)
Polyglycerol polyricinoleate (HLB 0.6)	92.1
Glycerol monooleate (HLB 2.8)	68.4
Propyleneglycol monoester (HLB 3.4)	74.8
Glycerol monolaurate (HLB 4.0)	83.6
Sorbitan monooleate (HLB 4.3)	57.1
Sorbitan monostearate (HLB 4.7)	54.9
Glycerol monostearate (HLB 5.0)	41.7
Sorbitan monopalmitate (HLB 6.7)	36.2
Polyoxyethylene sorbitan monostearate (HLB 9.6)	39.4
Polyglycerol monooleate (HLB 13.0)	42.3
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (HLB 16.7)	41.2

Table 2. Effect of various emulsifiers on W/O/W type emulsion stability index

Kinds of emulsifiers (HLB)	Emulsion stability index (%)
Polyglycerol polyricinoleate (HLB 0.6)	41.2
Glycerol monooleate (HLB 2.8)	42.3
Propyleneglycol monoester (HLB 3.4)	39.4
Glycerol monolaurate (HLB 4.0)	36.2
Sorbitan monooleate (HLB 4.3)	41.7
Sorbitan monostearate (HLB 4.7)	54.9
Glycerol monostearate (HLB 5.0)	57.1
Sorbitan monopalmitate (HLB 6.7)	80.6
Polyoxyethylene sorbitan monostearate (HLB 9.6)	74.8
Polyglycerol monooleate (HLB 13.0)	87.4
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (HLB 16.7)	92.1

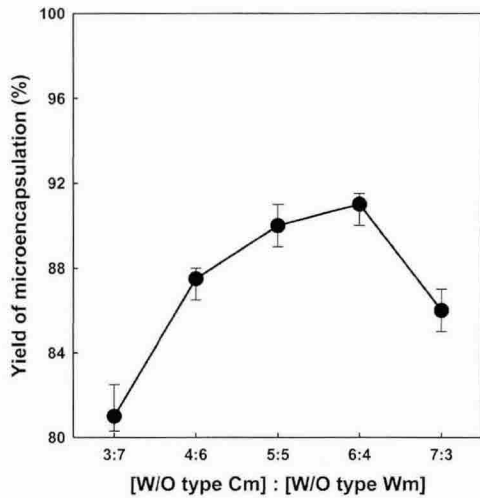


Fig. 3. Effect of [W/O type Cm] : [W/O type Wm] on microencapsulation yield.

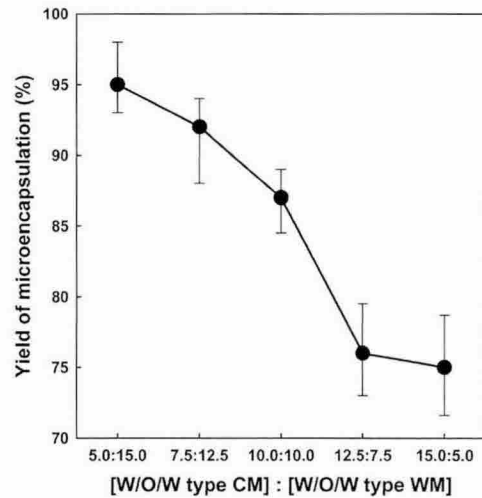


Fig. 4. Effect of [W/O/W type Cm] : [W/O/W type Wm] on microencapsulation yield.

유하고 있는 추출액인 *n*-hexane층 일정량을 취해 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 측정값(A)을 아래 계산식에 적용시켜 미세캡슐화 수율(yield of microencapsulation, YM)로 나타내었다.

$$\text{Yield of microencapsulation (YM, \%)} = \{(B - A) / B\} \times 100$$

- A: 미세캡슐화 후, 미세캡슐화되지 못한 중심물질을 추출한 *n*-hexane층의 흡광도
- B: 미세캡슐화 공정에서 2차 중심물질(CM)로 사용된 전체 옥배경화유를 캡슐화 시키지 않고 oil red O로 발색시켜 *n*-hexane으로 추출한 시료의 흡광도

결과 및 고찰

W/O형 및 W/O/W형 유화액 안정성을 위한 중심물질과 피복물질 혼합비율의 최적화

W/O형 유화액내의 유화제 종류가 유화 안정성에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 1에서 볼 수 있듯이 HLB값이 0.6인 소수성 유화제인 polyglycerol polyricinoleate(PGPR)가 가장 안정한 유화계를 형성하는 것으로 판명되었으며, 중심물질(Cm)과 피복물

질(Wm)을 제조한 후 미세캡슐을 제조한 결과, *Lactobacillus* sp. (Cm)와 옥배경화유(Wm)의 혼합비율은 Fig. 3에서와 같이 [W/O형 Cm] : [W/O형 Wm] = 3 : 2(w/w)에서 최대의 미세캡슐화 수율을 나타내었다.

W/O/W형 유화액의 경우도 위와 동일한 방법에 의하여 유화안정성을 측정하여 Table 2의 결과를 얻었는데, HLB값이 16.7인 친수성이 강한 polyoxyethylene sorbitan monolaurate(PSML)가 가장 안정한 유화계를 형성하였으며, W/O/W형의 중심물질(2차 중심물질, CM)과 피복물질(2차 피복물질, WM)을 제조한 후 미세캡슐화 수율을 측정 한 결과, *Lactobacillus* sp.를 옥배경화유가 둘러싼 W/O/W형 중심물질과 최종 피복물질인 sweet potato starch 호화 및 gelatin 첨가액과의 혼합비율, 즉 [W/O/W형 CM] : [W/O/W형 WM] = 1 : 3(w/w)이 최적인 것으로 판명되었다(Fig. 4).

이상의 결과로 볼 때, W/O형 유화계의 안정성을 위해서는 HLB 값이 낮은 소수성 유화제가 적절하며, 반면 W/O/W형 유화계와 같이 최종의 껍질층이 수분층이면 HLB값이 높은 친수성 유화제가 적합한 것으로 판단되었는데, 이러한 결과는 Tharwat와 Brian의 보고(19)와 일치하는 경향을 보였다.

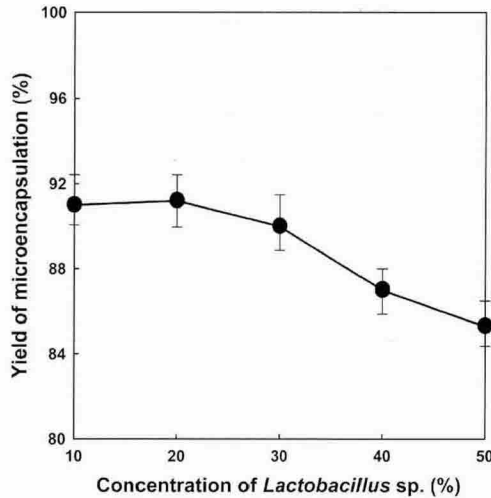


Fig. 5. Effect of *Lactobacillus* sp. concentration on microencapsulation yield.

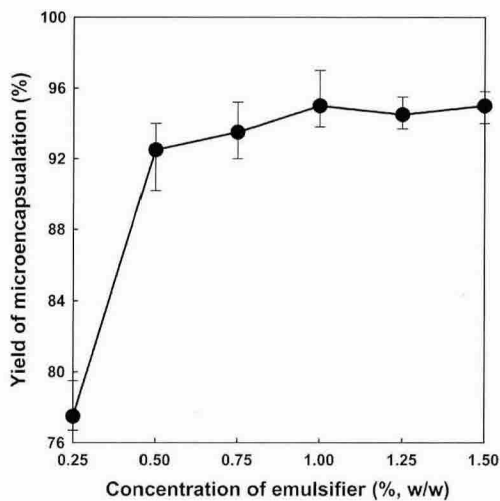


Fig. 6. Effect of the polyglycerol polyricinoleate (HLB 0.6) concentration on microencapsulation yield.

W/O형 유화액 중심물질내의 *Lactobacillus* sp. 농도 최적화

W/O형 유화제에서, 중심물질과 피복물질의 혼합비율을 3:2(w/w)로 최적화 시킨 후, 미세캡슐화 공정에 첨가되는 *Lactobacillus* sp.의 최적농도를 결정하기 위하여 *Lactobacillus* sp.의 농도가 각각 10, 20, 30, 40, 50% 되게 현탁액을 준비하고, 농도당 3회 반복하여 미세캡슐화 수율을 측정하였다. 그 결과, 10-20% 농도에서 91.0-91.2%의 수율을 보였으며, 30% 농도에서는 90.0%의 수율을 보였다. 반면, 40-50% 농도에서는 87.0% 이하로 수율이 급격히 낮아지는 양상을 보였다(Fig. 5).

따라서, 본 연구에서는 90% 이상의 높은 미세캡슐화 수율을 나타내며 미세캡슐화 되어지는 *Lactobacillus* sp.의 절대함량도 높은 30%의 농도를 최적의 농도로 결정하여 향후 실험에 적용하였다.

유화제 첨가의 최적화

미세캡슐화 공정에 첨가되는 유화제의 최적농도를 결정하기 위하여 HLB값이 0.6인 1차 유화제 PGPR과 HLB값이 16.7인 2차 유화제 PSML의 농도를 동시에 변화시키는 것은 물론, 1차 유화제 농도를 고정시킨 후 2차 유화제 농도를 변화시키거나 또는 2차 유

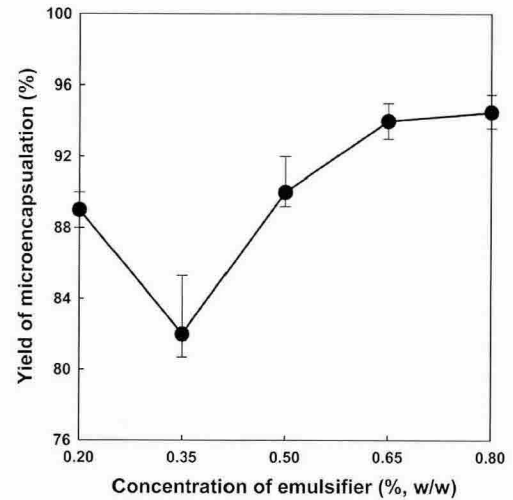


Fig. 7. Effect of the polyoxyethylene sorbitanmonolaurate (HLB 16.7) concentration on microencapsulation yield.

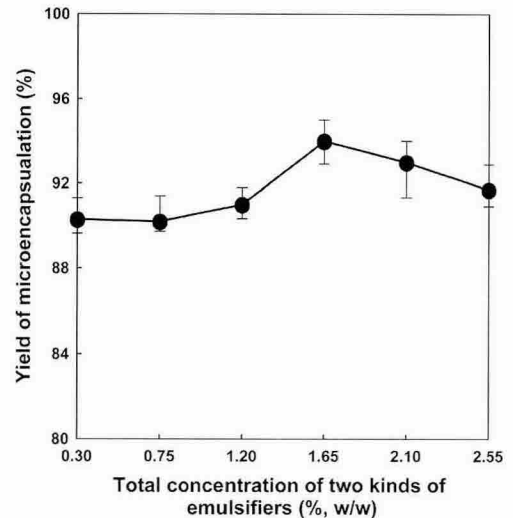


Fig. 8. Effect of total concentration of two kinds of emulsifiers (HLB 0.6 + HLB 16.7) on microencapsulation yield.

화제농도를 고정시킨 후 1차 유화제 농도를 변화시켜 미세캡슐화 수율이 변화되는 양상을 검토하였다. 이상의 실험군을 각각 3회 반복하여 얻은 결과는 Fig. 6-8과 같다.

1차 유화제인 PGPR의 농도를 변화시켜 Fig. 6의 결과를 얻었는데, 1%의 농도일 때 미세캡슐화 수율이 가장 효율적인 것으로 나타났다. 반면, 친수성이 강한 2차 유화제인 PSML의 첨가농도를 변화시켜 Fig. 7의 결과를 얻을 수 있었으며, 0.65%의 농도에서 극대의 수율을 나타내는 가장 효과적인 미세캡슐을 형성하는 것으로 판명되었다.

또한, 1, 2차 유화제 농도를 동시에 변화시킨 결과, Fig. 8에서 보는 바와 같이 1.00% PGPR과 0.65% PSML인 경우(전체 유화제 농도는 1.65%)에 미세캡슐화 수율이 94.1%로 가장 높았다.

이상의 결과로부터, 유화제의 전체 첨가농도가 1.65% 이상의 높은 농도에서는 Tharwat와 Brian의 보고(19)와 동일한 현상을 나타내었으며 이들의 결과분석에 의해, 유화 형성 이후의 일정 농도 이상에서는 유화제가 W/O/W형 유화 입자의 표면장력을 증가시켜 파괴하는 분산제로 작용한 것으로 판단하였다. 또한, 단일 종류 유화제보다 2종류 유화제를 함께 사용하였을 때 전체적으

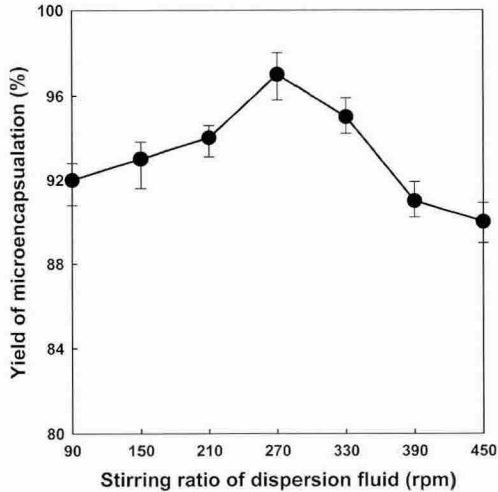


Fig. 9. Effect of stirring rate of dispersion fluid on microencapsulation yield.

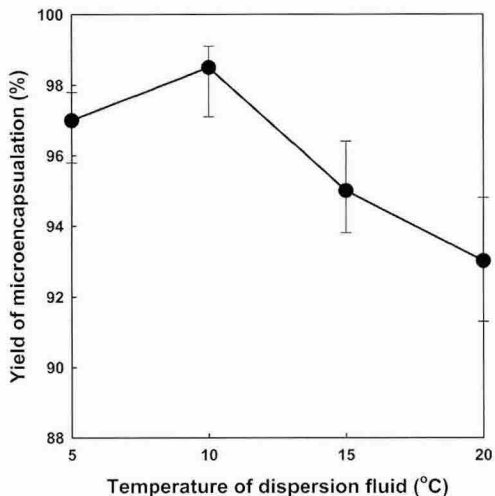


Fig. 10. Effect of temperature of dispersion fluid on microencapsulation yield.

로 미세캡슐화 수율이 더 높은 것으로 나타났는데 이는 2종류 유화제 사용에 의한 유화안정성의 상승효과(synergistic effect)에 의한 것으로 예상된다.

미세캡슐화를 위한 분산액 교반속도의 최적화

2중층 미세캡슐 형성을 위한 W/O/W형 유화액을 분무시켜 미세캡슐을 형성시키는 과정 중에 분산액을 계속 교반하되, 교반의 속도를 달리하여 미세캡슐화 수율을 측정함으로써 Fig. 9의 결과를 얻었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 교반 속도에 따른 수율은 증가 후 감소하는 양상을 나타냈으며, 중속(270 rpm)에서 미세캡슐화 수율이 97% 수준으로 가장 높은 것으로 판명되었다. 저속(90-210 rpm)으로 교반하였을 경우, 형성된 미세캡슐들의 융합으로 인한 불안정성 때문에 미세캡슐화 수율이 낮은 것으로 판단되었으며, 고속(390 rpm 이상)으로 교반하였을 경우, 미세캡슐의 파괴로 인하여 미세캡슐화 수율이 낮아지는 것으로 판단되었다.

따라서, 본 연구에서는 미세캡슐화 수율을 가장 높게 하는 270 rpm의 분산액 교반속도를 최적의 것으로 결정하였다.

미세캡슐화에 대한 분산액 온도의 영향

미세캡슐화 공정의 최종단계인 분무과정 중의 분산액 온도를 변화시켜 미세캡슐화 수율을 측정된 결과 Fig. 10을 완성하였다.

분산액 온도가 10°C일 때 최대의 수율을 얻을 수 있었는데, 이러한 결과는 10°C 이하에서는 미세캡슐의 형성에 필요한 시간이 부족하여 형성 중인 미세캡슐의 모양이 불균일해지는 불안정성이 높아지며 반면, 10°C 이상의 온도는 미세캡슐의 피복물질 형성을 저해함에 기인하는 것으로 판단하였다. 이러한 결과는 단일층 미세캡슐 형성의 연구 보고(20)와도 일치하는 것이다.

요 약

유산균의 일종인 *Lactobacillus* sp.을 중심물질로 하고 그 바깥을 2중층으로 미세캡슐화하는 공정을 위한 최적 조건을 확립하였는데, [중심물질]과 [피복물질]의 혼합비율과 유화제 첨가농도, 2중층 유화계내의 2종류 유화제(PGPR/PSML)에 의한 상승효과, 분산액의 온도 및 분산액의 교반속도가 유산균 함유 2중층 미세캡슐화 수율에 미치는 영향을 검토하였다. W/O형 및 W/O/W형 유화계내에서의 중심물질과 피복물질의 혼합비율과 유화제 첨가농도에 따른 최적조건을 탐색한 결과, *Lactobacillus* sp.(Cm)와 옥배경화유(Wm)와의 혼합비율이 [W/O형 Cm]:[W/O형 Wm]=3:2 (w/w), 1.00%의 유화제(PGPR) 첨가농도에서 최대의 수율을 나타내었으며, 유산균을 옥배경화유가 단일층으로 둘러싼 W/O형 유화제와 다당류 호화액의 혼합비율 즉, [W/O/W형 중심물질, CM]:[W/O/W형 피복물질, WM]=1:3(w/w), 0.65%의 유화제(PSML) 농도에서 가장 높은 미세캡슐화 수율을 얻을 수 있는 것으로 판명되었다. 최종적으로, 유산균 2중층 미세캡슐화 공정을 위한 여러 가지 요인들 중 물리적인 조건의 변화를 살펴본 결과, 분산액의 온도가 10°C이며, 미세캡슐을 함유하는 분산액 제조시의 교반정도가 270 rpm일 때 2중 미세캡슐화의 가장 높은 수율을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(204023-03-1-CG000)의 지원에 의해 수행한 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cho YH, Shin DS, Park JY. Microencapsulation technology in food industry. *Food Sci. Ind.* 30: 98-111 (1997)
2. Lee SC, Im CH, Lee SC. Characteristics of spray dried polysaccharide for microencapsulation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1322-1326 (1997)
3. Kim CH, Lee KW, Kwak HS, Kang OJ. Studies on the microencapsulation of ω -3 polyunsaturated fatty acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 743-749 (1996)
4. Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross linked gelatin membrans. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 56: 259-263 (1993)
5. Arshady R. Microcapsules for food. *J. Microencapsul.* 10: 413-435 (1975)
6. Bakan JA. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technol.* 27: 34-40 (1985)
7. Deasy PB. *Microencapsulation and Related Drug Processes*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. pp. 26-35 (1984)
8. Jackson LS, Lee. K. Microencapsulated iron for food fortification. *J. Food Sci.* 56: 1047-1050 (1991)

9. Dziezak JD. Microencapsulation and encapsulated ingredient. *Food Technol.* 42: 136-151 (1988)
10. Cordray JC, Huffman DL. Restructured pork form hot processed sow meat: Effect of encapsulated food acids. *J. Food Prot.* 48: 965-968 (1985)
11. Magee EL, Olson NF, Lindsay RC. Microencapsulation of cheese ripening system: Production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell-free extract. *J. Dairy Sci.* 64: 616-621 (1981)
12. Chilvers GR, Gunning AP, Morris VJ. Coacervation of gelatin-XM6 mixture and their use in microencapsulation. *Carbohydr. Polym.* 8: 55-61 (1988)
13. Iso M, Masumoto H, Urushiyama S, Omi S. Application of encapsulated enzyme dispersed in a continuous stirred tank reactor. *J. Microencapsul.* 7: 167-177 (1990)
14. Baik OR, Uy R, Byun SM. Hydrolysis of lactose in milk by microencapsulation of β -galactosidase. *Korean J. Food Sci. Technol.* 12(1): 45-52 (1980)
15. Shin MG, Chang PS, Min BK, Kwak HS. Quantitative analysis of microencapsulation of β -galactosidase. *Korean J. Anal. Sci.* 5: 471-475 (1992)
16. Morichi T. Preservation of lactic acid bacteria by freeze-drying. *Jpn. Agric. Res. Quart.* 8: 171-176 (1974)
17. Deeth HC. Yoghurt and cultures products. *Aus. J. Dairy Technol.* 39: 111-113 (1984)
18. Chang PS. Determination of emulsion stability index in W/O emulsion. *Anal. Sci. Technol.* 7: 233-236 (1994)
19. Tharwat FT, Brian V. Emulsion stability. Vol. I, pp. 129-286. In: *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Paul B (ed). Marcel Dekker. Inc., New York, NY, USA (1983)
20. Chang PS. Microencapsulation and oxidative stability of docosahexaenoic acid. *Am. Chem. Soc. Symp.* 674: 264-274 (1997)