

# NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH ENZYME BẰNG PHỨC HỢP POLYMER

## STUDY ON IMMOBILAZATION OF ENZYME BY USING COMPLEX POLYMER

Trương Thị Mộng Thu, Wunwisa Krasaekoopt

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Email: [tmtthu@ctu.edu.vn](mailto:tmtthu@ctu.edu.vn)

### ABSTRACT

Purified protease from *Aspergillus oryzae* was immobilized by complex polymer microencapsulation. Immobilization of enzyme was effected by alginate concentration, type of polymer such as chitosan, xanthan gum, maltodextrin and concentration of polymer. The properties of immobilized enzyme have been investigated such as percentage of yield, percentage of microencapsulation efficiency, bead size, percentage of leakage of encapsulated enzyme and percentage of encapsulated enzyme retained over 10-week storage at 0-4°C. Some results are following: optimum concentration of immobilization is 2,0% alginate, alginate/chitosan complex, and 0,4% chitosan which a immobilized yield, microencapsulation efficiency and beads size is 78,07%; 73,06% and 1,94mm, respectively. Protease leakage was only 6,65% over 120minutes when encapsulated protease was soaked in de-ionized water while 81,42% retention of enzyme activity was noted in protease capsules over 10-week storage at 0 – 4°C. These results indicated that immobilized enzyme in alginate/chitosan can use for applying on continuous process which can make lower price of manufacture.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease là enzyme quan trọng của hệ enzyme thủy phân nhờ vào khả năng thủy phân liên kết peptit giữa các axit amin trong đại phân tử protein. Vì vậy, enzyme này ngày càng được ứng dụng nhiều trong một số ngành sản xuất như: chế biến thực phẩm, sản xuất chất tẩy rửa, thuộc da, y tế, nông nghiệp (Posorske 1984; Krajewsk 2004; Cruz-Ortiz 2011). Tuy nhiên, hiện nay giá thành của enzyme khá cao, bởi vì xúc tác phản ứng trong điều kiện tối ưu, enzyme hòa tan trong nước nên khó thu hồi hoặc thực hiện phản ứng liên tục (Krajewska 2004). Do đó, việc cố định enzyme ngày càng được chú trọng nhằm tăng tính ổn định của enzyme trong điều kiện phản ứng như nhiệt độ, pH..., enzyme cố định được thu hồi sau phản ứng nên có thể sử dụng để thực hiện phản ứng liên tục, góp phần làm giảm giá thành sản xuất.

Alginate là một polysaccharit được sử dụng phổ biến trong kỹ thuật cố định enzyme. Hạt calcium alginate có thể được sản xuất bởi một số phương pháp như phân tán nhũ tương, sấy phun và công nghệ liposome. Cố định enzyme trong gel alginate không hòa tan là phương pháp nhanh chóng, không độc hại, có hoạt tính tương hợp sinh học cao, không tốn kém, và ổn định trong môi trường axit, nhưng không ổn định trong môi trường kiềm (Manjanna 2010). Do đó, hạt calcium alginate được ứng dụng nhiều trong cố định các tế bào và enzyme cũng như dược phẩm và phụ gia thực phẩm (Khazaeli 2008). Tuy nhiên, hiệu suất cố định thấp và chất được cố định có thể bị thất thoát, đặc biệt là các enzyme hay các peptit có trọng lượng phân tử nhỏ hơn kích thước lỗ mao quản của mạng gel alginate sẽ bị thất thoát ra ngoài hạt cố định. Bổ sung chitosan có thể làm tăng hiệu suất cố định nhờ vào liên kết giữa nhóm polycation của chitosan và nhóm polyanion của alginate nhằm làm giảm kích thước lỗ mao quản của mạng gel alginate, giảm sự thất thoát enzyme (Anjani 2007). Vì vậy, nhằm phần nào đáp ứng nhu cầu trên, chúng tôi thực hiện: “Nghiên cứu cố định enzyme bằng phức hợp polymer”. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát tính chất của enzyme cố định với các phức hợp polymer khác nhau như sản lượng enzyme cố định, hiệu suất cố định enzyme, kích thước hạt, hoạt tính enzyme cố định thất thoát trong nước và hoạt tính của enzyme cố định còn lại theo thời gian bảo quản. Nhằm tìm ra được nồng độ alginate, loại polymer, phức hợp polymer và nồng độ polymer tối ưu cho quá trình cố định enzyme.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Cố định protease trong phức hợp polymer

Cố định protease trong phức hợp alginate/chitosan bằng phương pháp nhốt theo quy trình sau: Chuẩn bị các dung dịch phức hợp alginate/chitosan với nồng độ alginate lần lượt là 1,5% ; 2,0% (w/v), nồng độ chitosan lần lượt là 0,2% ; 0,4% (w/v) và dung dịch protease 2% (w/v). Trộn đều dung dịch alginate/chitosan với các nồng độ alginate và chitosan khác nhau với dung dịch protease theo tỷ lệ 4:1 (v/v). Nhỏ từng hỗn hợp alginate/chitosan – protease vào dung dịch CaCl<sub>2</sub> 0,1M thông qua ống tiêm và kim tiêm có đường kính lỗ kim là 0,30 x 13mm để tạo hạt enzyme cố định. Cố định protease trong phức hợp alginate/xanthan gum và alginate/maltodextrin được tiến hành tương tự như phức hợp alginate/chitosan, thay thế chitosan bằng xanthan gum hoặc maltodextrin. Hạt enzyme cố định được ngâm trong dung dịch tạo gel CaCl<sub>2</sub> 0,1M trong 30 phút. Sau 30 phút, hạt enzyme cố định được thu hồi bằng cách lọc qua giấy lọc, rửa hạt 2 lần với nước cất, cho vào lọ thủy tinh có nắp đậy, ngâm trong nước loại ion, bảo quản ở nhiệt độ 0-4°C trong 10 tuần. Ký hiệu mẫu và công thức tạo phức hợp polymer được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1: Ký hiệu mẫu và công thức tạo phức hợp polymer**

Mẫu	Nồng độ Alginate (%)	Loại polymer	Nồng độ polymer (%)
A1,5C0,2	1,5	Chitosan	0,2
A1,5C0,4	1,5	Chitosan	0,4
A1,5M0,2	1,5	Xanthan gum	0,2
A1,5M0,4	1,5	Xanthan gum	0,4
A1,5X0,2	1,5	Maltodextrin	0,2
A1,5X0,4	1,5	Maltodextrin	0,4
A2,0C0,2	2,0	Chitosan	0,2
A2,0C0,4	2,0	Chitosan	0,4
A2,0M0,2	2,0	Xanthan gum	0,2
A2,0M0,4	2,0	Xanthan gum	0,4
A2,0X0,2	2,0	Maltodextrin	0,2
A2,0X0,4	2,0	Maltodextrin	0,4

#### **Xác định sản lượng cố định protease trong phức hợp polymer**

Sản lượng cố định protease trong phức hợp polymer (Y%) được tính bằng tỷ số giữa khối lượng hạt enzyme cố định trên khối lượng phức hợp polymer-enzyme ban đầu dùng để cố định.

$$Y (\%) = (M/M_0) \times 100$$

Trong đó, Y: Sản lượng cố định enzyme (%),  
H: Khối lượng hạt enzyme cố định (g)  
H<sub>0</sub>: Khối lượng phức hợp polymer-enzyme ban đầu dùng để cố định (g)

#### **Xác định hiệu suất cố định protease trong phức hợp polymer**

Hiệu suất cố định protease trong phức hợp polymer (ME%) được tính bằng tỷ số giữa hoạt tính protease bị nhốt trong hạt enzyme cố định trên hoạt tính protease ban đầu dùng để cố định.

$$ME = (H/H_0) \times 100$$

Trong đó, ME: Hiệu suất cố định enzyme (%),  
H: Hoạt tính protease bị nhốt trong hạt enzyme cố định (U/g)  
H<sub>0</sub>: Hoạt tính protease ban đầu dùng để cố định (U/g)

#### **Xác định kích thước hạt enzyme cố định (D, mm) trong phức hợp polymer**

Kích thước hạt enzyme cố định trong phức hợp polymer được xác định bằng cách sử dụng thước Vernier Caliper (0-150mm) đo đường kính 120 hạt enzyme cố định và tính trung bình cho mỗi mẫu thí nghiệm.

### **Xác định sự thất thoát hoạt tính hạt enzyme cố định ngâm trong nước**

Sự thất thoát hoạt tính hạt enzyme cố định ngâm trong nước được xác định bằng cách cho 5 gr hạt enzyme cố định và 25 ml nước loại ion vào lọ thủy tinh có nắp đậy, đặt lọ thủy tinh vào máy lắc với tốc độ 70 vòng/phút trong 120 phút. Cứ mỗi 30 phút, 5 ml nước trong lọ được lấy ra để xác định hoạt tính enzyme thất thoát và một lượng nước 5 ml tương ứng được cho vào lọ để đảm bảo tổng lượng nước trong lọ là 25 ml.

### **Xác định hoạt tính hạt enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C**

Hoạt tính enzyme cố định còn lại sau thời gian bảo quản được xác định bằng cách cho 1 gr hạt enzyme cố định được vào 25 ml dung dịch trisodium citrate 2% (w/v) đối với hạt enzyme cố định trong phức hợp alginate/chitosan và dung dịch đệm phosphate pH 6.8 đối với hạt enzyme cố định trong phức hợp alginate/xanthan gum và alginate/maltodextrin để hòa tan hạt enzyme cố định, giải phóng enzyme tự do và hoạt tính enzyme được xác định sau mỗi 2 tuần trong suốt thời gian bảo quản 10 tuần ở 0-4°C.

### **Xác định hoạt tính protease**

Cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 5 ml cơ chất (casein 0,65%), đặt vào chậu ổn định nhiệt ở 37°C. Sau 5 phút cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml dung dịch enzyme (cũng ở nhiệt độ 37°C, dung dịch enzyme được chuẩn bị có hoạt tính từ 0,1 – 0,2 units/ml), lắc trộn đều và để 10 phút ở 37°C. Sau 10 phút cho vào mỗi ống nghiệm 5 ml dung dịch trichloacetic acid 0,11M, lắc trộn nhanh để protein dư và các hợp chất cao phân tử kết tủa, giữ các ống nghiệm ở 37°C thêm 30 phút nữa rồi lọc lấy dịch. Lấy 2 ml dịch lọc và 5 ml dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5M cho vào ống nghiệm, trộn đều và thêm 1 ml thuốc thử Folin. Sau 30 phút phản ứng, dung dịch có màu xanh, mang đo trên máy so màu ở bước sóng 660 nm. Hoạt tính enzyme được xác định dựa trên đường chuẩn tyrosin. Thí nghiệm đối chứng thay dung dịch enzyme bằng 1 ml nước cất.

Pha dung dịch gốc tyrosin có nồng độ 0,11M. Sau đó cho dung dịch tyrosin gốc vào 7 ống nghiệm theo thể tích tăng dần từ: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,50; và 0,80 ml. Sau đó cho vào 7 ống nước lượng nước cất tương ứng sau cho tổng thể tích mỗi ống nghiệm là 2 ml và mẫu đối chứng 2 ml nước cất. Cho thêm vào mỗi ống nghiệm 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5M và 1 ml thuốc thử Folin và mẫu đối chứng. Giữ hỗn hợp phản ứng trong 30 phút, sau đó đo trên máy so màu ở bước sóng 660 nm. Xây dựng đường chuẩn tyrosin với trục hoành là nồng độ tyrosin (micromol/ml), trục tung là mật độ quang OD.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Sản lượng, hiệu suất và kích thước hạt enzyme cố định trong phức hợp polymer**

Kết quả sản lượng cố định, hiệu suất cố định và kích thước hạt enzyme cố định trong phức hợp polymer được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả cho thấy phần trăm sản lượng và kích thước hạt enzyme cố định bị ảnh hưởng bởi tất cả các thông số thí nghiệm như nồng độ alginate, loại polymer và nồng độ polymer ( $p < 0,05$ ). Ngoài ra, hiệu suất cố định enzyme khác biệt đáng kể khi nồng độ alginate tăng và khác biệt giữa các loại polymer khác nhau ( $p < 0,05$ ), trong khi nồng độ polymer không ảnh hưởng lên hiệu suất cố định enzyme ( $p > 0,05$ ). Kết quả cho thấy sản lượng, hiệu suất cố định và kích thước hạt enzyme cố định của 12 công thức là 28,23 - 77,20%; 11,50 - 81,66% và 1,36 - 1,94mm, tương ứng. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 còn cho thấy sản lượng, hiệu suất và kích thước hạt enzyme cố định tăng khi nồng độ alginate tăng từ 1,5% đến 2,0% ở tất cả các loại polymer và nồng độ polymer. Ngoài ra, protease cố định trong phức hợp alginate/chitosan cho sản lượng, hiệu suất và kích thước hạt enzyme cố định lớn nhất từ 78,07% đến 81,66% ; 73,06% đến 77,20% và 1,85 đến 1,94mm, tương ứng.

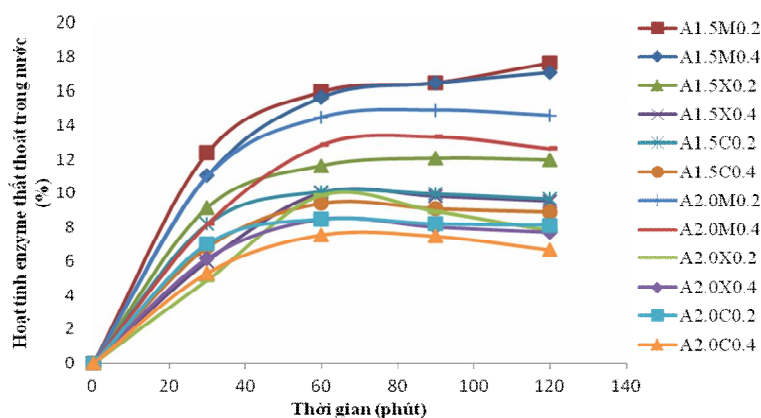
**Bảng 2 Kết quả sản lượng cố định, hiệu suất cố định và kích thước hạt enzyme cố định trong phức hợp polymer**

Mẫu	Y (%) ± SD	ME (%) ± SD	D (mm) ± SD
A1,5C0,2	64.05 ± 2.19 <sup>c</sup>	65.63 ± 1.70 <sup>c</sup>	1.73 ± 0.04 <sup>de</sup>
A1,5C0,4	58.18 ± 3.52 <sup>d</sup>	62.17 ± 2.55 <sup>d</sup>	1.74 ± 0.03 <sup>d</sup>
A1,5M0,2	28.23 ± 0.73 <sup>j</sup>	11.50 ± 0.23 <sup>h</sup>	1.36 ± 0.05 <sup>g</sup>
A1,5M0,4	32.57 ± 1.27 <sup>i</sup>	14.30 ± 1.22 <sup>gh</sup>	1.35 ± 0.06 <sup>g</sup>
A1,5X0,2	34.75 ± 1.10 <sup>hi</sup>	15.51 ± 1.86 <sup>fg</sup>	1.62 ± 0.04 <sup>f</sup>
A1,5X0,4	39.07 ± 0.61 <sup>fg</sup>	13.10 ± 0.63 <sup>gh</sup>	1.69 ± 0.03 <sup>de</sup>
A2,0C0,2	81.66 ± 2.42 <sup>a</sup>	77.20 ± 3.18 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.05 <sup>bc</sup>
A2,0C0,4	78.07 ± 1.66 <sup>b</sup>	73.06 ± 2.12 <sup>b</sup>	1.94 ± 0.03 <sup>a</sup>
A2,0M0,2	37.42 ± 1.65 <sup>gh</sup>	13.24 ± 2.30 <sup>gh</sup>	1.66 ± 0.03 <sup>ef</sup>
A2,0M0,4	40.03 ± 1.67 <sup>fg</sup>	15.70 ± 1.05 <sup>fg</sup>	1.68 ± 0.01 <sup>def</sup>
A2,0X0,2	41.48 ± 1.83 <sup>f</sup>	17.96 ± 1.49 <sup>ef</sup>	1.82 ± 0.05 <sup>c</sup>
A2,0X0,4	51.22 ± 4.23 <sup>e</sup>	20.35 ± 2.36 <sup>e</sup>	1.89 ± 0.02 <sup>ab</sup>

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

### Sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định ngâm trong nước

Sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định ngâm trong nước trong thời gian 120 phút được thể hiện trên Hình 1. Hình 1 cho thấy sự thất thoát hoạt tính hạt enzyme cố định ngâm trong nước diễn ra theo 3 giai đoạn: giai đoạn đầu tốc độ thất thoát tăng nhanh sau 30 phút, sau đó tốc độ tăng chậm đến 60 phút và không tăng ở giai đoạn cuối đến 120 phút, ngoại trừ hạt enzyme cố định trong phức hợp alginate/maltodextrin sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định tăng dần suốt 3 giai đoạn. Giai đoạn đầu tốc độ thất thoát hoạt tính enzyme nhanh có thể là do một số phân tử enzyme nằm tại bề mặt ngoài của hạt. Giai đoạn 2 và 3 tốc độ chậm lại và không tăng nhờ vào cấu trúc mạng gel vững chắc của phức hợp polymer nên enzyme không thất thoát ra ngoài (Takka và Gürel 2010).

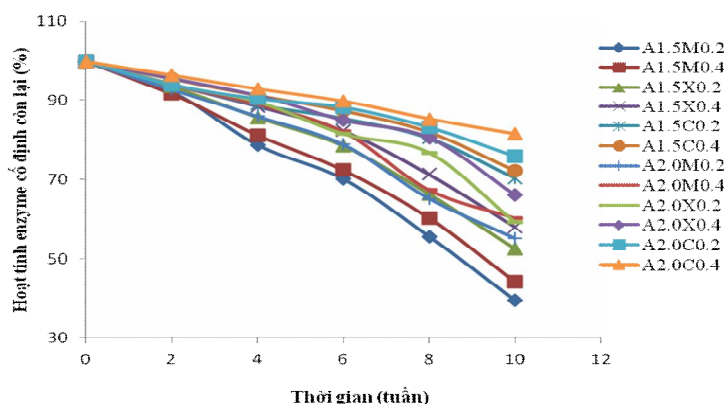


**Hình 1 Sự thất thoát hoạt tính hạt enzyme cố định ngâm trong nước trong 120 phút**

Khi tăng nồng độ alginate từ 1,5% đến 2,0% sự thất thoát enzyme cố định chậm lại ở tất cả các loại polymer và nồng độ polymer. Đồng thời, kết quả cho thấy rằng sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định trong phức hợp alginate/chitosan là thấp nhất 6,65% và cao nhất khi hạt enzyme cố định trong phức hợp alginate/maltodextrin là 17,63% (Hình 1).

## Hoạt tính hạt enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C

Hình 2 cho thấy rằng tốc độ thất thoát enzyme chậm trong thời gian tồn trữ và cao hơn ở 2 tuần cuối cùng của thời gian tồn trữ cho tất cả các mẫu. Ngoài ra, kết quả cho thấy rằng khi tăng nồng độ alginate và nồng độ polymer không làm tăng hoạt tính enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản. Tuy nhiên, loại polymer có ảnh hưởng đáng kể lên hoạt tính còn lại của enzyme cố định sau 10 tuần bảo quản như sau hạt enzyme cố định trong phức hợp alginate/chitosan có hoạt tính enzyme cố định còn lại cao nhất là 81,42%, trong khi phức hợp alginate/xanthan gum còn lại là 66,11% và thấp nhất là trong phức hợp alginate/maltodextrin là 39,65% so với ban đầu sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C ở tất cả các nồng độ alginate và polymer. Kết quả này cũng tương tự như Takka và Gürel 2010 đã báo cáo rằng chitosan, một polyamine tích điện dương, tạo thành một màng bán thấm xung quanh một loại polymer mang điện tích âm như alginate. Màng này không hòa tan trong sự hiện diện của  $Ca^{2+}$  và do đó tăng cường sự ổn định của mạng gel và cung cấp một rào cản làm giảm sự thất thoát enzyme ra khỏi hạt cố định.



**Hình 2 Phần trăm hoạt tính enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C**

Sản lượng cố định, hiệu suất cố định, kích thước hạt và hoạt tính hạt enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C tăng khi nồng độ alginate tăng, trong khi sự thất thoát hoạt tính enzyme ngâm trong nước giảm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Khazaeli 2008; Manjanna 2009; Lotfipour 2012; Sathali 2012. Các tác giả này cho rằng khi nồng độ alginate tăng sẽ góp phần làm tăng độ nhớt của dung dịch. Vì vậy khi nhỏ dung dịch qua ống tiêm và kim tiêm vào dung dịch tạo gel  $CaCl_2$ , hạt enzyme cố định hình thành sẽ có kích thước lớn hơn. Ngoài ra, Sheela 2011; Khazaeli 2008 và Chen 2010 cũng chỉ ra rằng khi nồng độ alginate tăng sẽ làm tăng số lượng phân tử alginate liên kết với ion  $Ca^{2+}$  tạo thành cấu trúc mạng gel dày đặc hơn và làm giảm lỗ mao quản của mạng gel alginate, góp phần giảm sự thất thoát enzyme nên làm tăng sản lượng, hiệu suất và kích thước hạt enzyme cố định. Ngoài ra, Samia 2008 và Joshi 2012 cũng chứng minh rằng sự thất thoát hoạt tính hạt enzyme cố định ngâm trong nước thấp hơn do giảm độ xốp của mạng gel alginate khi nồng độ alginate tăng. Đồng thời enzyme được cố định trong phức hợp alginate/chitosan cũng cho kết quả sản lượng cố định, hiệu suất cố định, kích thước hạt và hoạt tính hạt enzyme cố định còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C cao hơn enzyme cố định trong alginate/xanthan gum và alginate/maltodextrin ở cả 2 nồng độ polymer và alginate, trong khi sự thất thoát hoạt tính enzyme ngâm trong nước giảm thì giảm hơn. Kết quả này cũng đúng với nghiên cứu của Takka và Gürel 2010. Tác giả cho rằng do sự hình thành phức hợp giữa nhóm carboxyl của sodium alginate và các nhóm amin của chitosan, kết quả làm cho mạng gel alginate vững chắc hơn. Thêm vào đó, chitosan sử dụng trong nghiên cứu này có trọng lượng phân tử thấp nên dễ dàng khuếch tán vào cấu trúc lỗ mao quản của mạng gel alginate và làm giảm kích thước lỗ nên giảm lượng enzyme thất thoát ra ngoài và tạo thành màng dày đặc nên nhốt được nhiều enzyme. Vì vậy, sản lượng, hiệu suất và kích thước hạt enzyme cố định cao hơn và làm giảm lượng enzyme thất thoát ra ngoài.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Protease được cố định trong phức hợp alginate/chitosan với nồng độ alginate là 2,0% và nồng độ chitosan 0,2% cho sản lượng, hiệu suất hạt cố định cao nhất, trong khi với nồng độ chitosan 0,4% thì sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định ngâm trong nước loại ion là thấp nhất và hoạt tính enzyme còn lại sau 10 tuần bảo quản ở 0-4°C là cao nhất, tuy sản lượng và hiệu suất thấp hơn nồng độ chitosan 0,2% nhưng vẫn ở mức cao. Vì vậy, nồng độ alginate 2% và nồng độ chitosan 0,4% được ứng dụng để cố định protease trong phức hợp alginate/chitosan để sản xuất ra hạt enzyme cố định có hoạt tính enzyme ổn định trong thời gian bảo quản dài và sự thất thoát hoạt tính enzyme cố định ngâm trong nước thấp nhất và hiệu suất cố định enzyme vẫn cao để ứng dụng trong các quá trình sản xuất liên tục nhằm giảm giá thành sản xuất tăng hiệu quả kinh tế.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anjani K., K. Kailasapathy, M. Phillips, 2007. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal* 17 (1) :79–86.
- Chen R., Q. Wu, Q. Ping, 2010. Preparation and in vitro characterization of pH/[Na<sup>+</sup>] dual sensitive ketoprofen calcium alginate gel beads using multiple hydrophilic polymers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 5 (4): 131-144.
- Cruz-Ortiz R., L. J. Ríos-González, Y. G. García, J. A. Rodríguez de la Garza, and J. Rodríguez-Martínez, 2011. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase in PVA-alginate Beads. *Journal México Chemical Sociedad* 55(3): 176-180.
- Joshi S., P. Patel, S. Lin, P. L. Madan, 2012. Development of cross-linked alginate spheres by ionotropic gelation technique for controlled release of naproxen orally. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7 (2): 134-142.
- Khazaeli P., A. Pardakhty and F. Hassanzadeh, 2008. Formulation of Ibuprofen Beads by Ionotropic Gelation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3): 163-170.
- Krajewska B., 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35:126–139.
- Lotfipour F., S. Mirzaeei, M. Maghsoodi, 2012. Evaluation of the effect of CaCl<sub>2</sub> and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Journal: Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2 (1) 71.
- Manjanna K.M., B. Shivakumar, T. M. Pramod kumar, 2009. Formulation of oral sustained released acecclofenac sodium microbeads. *International Journal of PharmTech Research* 1(3):940-952.
- Manjanna K. M. , T. M. Pramod Kumar, B. Shivakumar, 2010. Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis. *Drug Discoveries and Therapeutics* 4(2):109-22.
- Posorske L. H., 1984. Industrial scale application of enzymes to the fat and oil's industry. *Journal Am Oil Chem Soc* 61:1758–60.
- Samia A Ahmed, 2008. Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. *Journal of Applied Sciences Research* 4:1777-1781.
- SATHALI A. A. H, J. VARUN, 2012. Formulation, development and in vitro evaluation of candesartan cilexetil mucoadhesive microbeads. *International Journal of Current Pharmaceutical Research Vol 4* (3): 109-118.
- Sheela N., B. Vijayakumar, K. Bhaskar Reddy, N. saravanan, S. Narendiran and E. Mohanambal, 2011. Design and characterization of novel calcium alginate/xanthan gum beads of ketoprofen. *Journal of Pharmacy Research* 4(10):3750-3752.
- Takka S. and A. Gürel, 2010. Evaluation of Chitosan/Alginate Beads Using Experimental Design: Formulation and *In Vitro* Characterization. *AAPS PharmSciTech* 11(1): 460–466.