

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN LIÊN TỤC SACCHAROSE BẰNG ENZYME INVERTASE CỐ ĐỊNH TRONG GEL ALGINATE

Vũ Thị Kim Hạnh, Lê Văn Việt Mẫn

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 26 tháng 08 năm 2007)

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu khảo sát quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate. Hai yếu tố được khảo sát là ảnh hưởng của nhiệt độ và tốc độ pha loãng đến quá trình thủy phân saccharose trong thiết bị phản ứng liên tục. Kết quả thực nghiệm cho thấy: Trong những giờ thủy phân đầu tiên, hoạt tính của enzyme ở nhiệt độ 55 °C cao hơn hoạt tính của enzyme ở 35 °C. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme bị giảm nhanh hơn trong những giờ thủy phân tiếp theo. Thời gian “bán hủy” của invertase cố định khi vận hành thiết bị ở 55 °C và 35 °C lần lượt là 4 và 95 ngày. Còn khi tăng tốc độ pha loãng của hệ thống, năng suất hoạt động của thiết bị sẽ tăng nhưng hiệu suất thủy phân saccharose giảm đi. Với tốc độ pha loãng của hệ thống là 0,12 và 0,17 giờ⁻¹, hiệu suất thủy phân saccharose sau 7 ngày vận hành lần lượt là 82 và 72%.

1. GIỚI THIỆU

Invertase, tên khoa học là -fructofuranoside fructohydrolase (EC 3.2.1.26), là enzyme xúc tác phản ứng thủy phân saccharose thành glucose và fructose (tỉ lệ mol 1:1), còn được gọi là đường nghịch đảo. Đường nghịch đảo được ứng dụng rất nhiều trong công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong công nghệ sản xuất bánh kẹo và nước giải khát [3, 5, 7].

Đường nghịch đảo có thể được sản xuất bằng phương pháp hóa học (sử dụng xúc tác là acid citric, acid tartaric hay acid phosphoric) hoặc phương pháp hoá sinh (sử dụng xúc tác là enzyme invertase). Tuy nhiên, phương pháp hoá sinh cho sản phẩm có chất lượng cao hơn hẳn phương pháp hóa học [6, 7, 10]. Trong công nghiệp, khi sử dụng enzyme làm xúc tác, enzyme cố định được coi là một giải pháp kỹ thuật góp phần làm giảm chi phí cho sản xuất. Cho đến nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về cố định enzyme invertase trên nhiều loại chất mang như polyvinylalcohol (Agkul và cộng sự, 2001), polyacrylamide (Mansour và Dawoud, 2003), chitosan (Hseih và cộng sự, 2000)...

Vấn đề được đề cập đến trong nghiên cứu này là chúng ta nên sử dụng enzyme cố định như thế nào để quá trình sản xuất đạt hiệu quả cao nhất. Một trong những giải pháp phổ biến là sử dụng enzyme cố định làm xúc tác trong thiết bị phản ứng liên tục [3, 6, 8, 11]. Kế thừa kết quả nghiên cứu về enzyme invertase cố định trong gel alginate của tác giả Lê Văn Việt Mẫn và Dương Thị Thùy Trâm (2003), trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sơ bộ quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chế phẩm invertase (β -D-fructofuranoside fructohydrolase, E 3.2.1.26) dạng bột, được thu nhận từ nấm men bánh mì *Saccharomces cerevisiae* do hãng Sigma (Mỹ) sản xuất.

Alginate có nguồn gốc từ giống rong mơ *Sargassum* do Đại học thủy sản Nha Trang sản xuất (Chế phẩm dạng rắn, độ ẩm 21,88%, độ nhớt của dung dịch alginate 1,5% ở 25 °C là 720 cp).

Saccharose do Công ty đường Biên Hòa sản xuất (Hàm lượng saccharose: $\geq 99,8\%$, độ ẩm: $\leq 0,05\%$, hàm lượng đường khử: $\leq 0,03\%$).

Các hóa chất phân tích sử dụng trong nghiên cứu do Merck AG (Đức) và Shantou Xilong - Guangdong (Trung Quốc) sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cố định invertase trong gel alginate bằng phương pháp nhốt enzyme trong mạng gel đặc

Trong nghiên cứu này, enzyme invertase được cố định trong gel alginate bằng phương pháp nhốt theo quy trình như sau: Trộn đều dung dịch alginate natri nồng độ $2,5\%$ (w/v) với dung dịch enzyme invertase $1,33\%$ (w/v) theo tỉ lệ 1:1 (v/v). Nhỏ hỗn hợp trên vào dung dịch CaCl_2 2% (w/v) để tạo hạt enzyme cố định. Tiếp tục ngâm hạt enzyme cố định trong dung dịch CaCl_2 2% trong 2 giờ để làm tăng độ bền của hạt. Sau 2 giờ, vớt hạt enzyme cố định ra khỏi dung dịch CaCl_2 2% và rửa hạt 3 lần bằng nước cất. Hạt enzyme cố định tạo thành có dạng hình cầu với đường kính trung bình 3-4 mm. Hạt enzyme cố định được ngâm vào dung dịch đệm acetate $0,1$ M pH 4,5 trước khi đem sử dụng.

2.2.2. Xác định hiệu suất cố định invertase trong gel alginate

Hiệu suất cố định enzyme invertase trong gel alginate (H_{cd}) được tính bằng tỉ số giữa lượng enzyme đã bị nhốt trong hạt gel trên lượng enzyme ban đầu dùng để cố định.

$$H_{cd} = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó, H_{cd} : Hiệu suất cố định enzyme (%),

A_o : Lượng enzyme ban đầu dùng để cố định (g),

A: Lượng enzyme bị thoát ra ngoài hạt gel trong quá trình cố định (g).

2.2.3. Khảo sát quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate

Quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate được tiến hành trong cột phản ứng liên tục hình trụ với đường kính 32 mm và chiều cao 300 mm. Thể tích dung dịch trong bình phản ứng là 180 mL. Lượng enzyme cố định trong cột phản ứng: 18 cm^3 hạt enzyme cố định (tương đương với $0,095$ g chế phẩm enzyme dạng bột). Nồng độ dung dịch saccharose trong bình phản ứng: 200 g/L.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: Cho dung dịch saccharose và enzyme cố định vào cột phản ứng. Tiến hành lưu dung dịch cơ chất trong cột đến khi hiệu suất thủy phân trong cột phản ứng không thấp hơn 85% . Sau đó, bắt đầu tiến hành châm cơ chất vào cột từ phía đỉnh và tháo sản phẩm ra khỏi cột từ phía đáy với lưu lượng như nhau. Sau những khoảng thời gian xác định, chúng tôi tiến hành lấy mẫu sản phẩm và xác định hàm lượng đường khử trong mẫu.

Hiệu suất phản ứng thủy phân saccharose H (%) bằng enzyme invertase cố định được tính bằng công thức sau:

$$H (\%) = (\text{TRS}/\text{TS}) \times (19/20) \times 100 \quad (2)$$

Trong đó, TRS: Lượng đường khử sinh ra sau phản ứng (mM),

TS: Lượng đường saccharose trong dung dịch trước phản ứng (mM),

19/20: Hệ số chuyển đổi từ đường khử sang saccharose.

Sự vô hoạt enzyme dưới tác dụng của các yếu tố môi trường (nhiệt độ, pH...) được biểu diễn theo phương trình (3) [5].

$$[A] = [A_0] \cdot e^{-kt} \quad (3)$$

Trong đó, k: Hằng số tốc độ vô hoạt enzyme (phút⁻¹),

A₀: Hoạt độ riêng của enzyme tại thời điểm ban đầu (U/mg protein enzyme),

A: Hoạt độ riêng còn lại của enzyme sau thời gian gia nhiệt t (U/mg protein enzyme).

Lấy logarit phương trình (3) ta được phương trình:

$$\ln[A] = -kt + \ln[A_0] \quad (4)$$

Trong thực nghiệm, để đơn giản, người ta có thể thay giá trị hoạt độ riêng của enzyme A và A₀ bằng hoạt tính của enzyme invertase (tính theo % so với hoạt tính ban đầu) mà không làm thay đổi đáng kể kết quả thí nghiệm.

Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi tiến hành dựng đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa hàm ln (hoạt tính của enzyme invertase) theo thời gian. Từ đó, chúng tôi tiến hành xác định hằng số tốc độ k và thời gian “bán hủy” t_{1/2}.

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme invertase cố định trong gel alginate tại những thời điểm xác định trong thiết bị phản ứng liên tục

Do giá trị hoạt tính của enzyme tỉ lệ thuận với lượng sản phẩm sinh ra, nên trong nghiên cứu này, hoạt tính của invertase cố định tại một thời điểm xác định khi hoạt động trong thiết bị phản ứng liên tục được đánh giá gián tiếp thông qua hàm lượng đường khử trong dung dịch phản ứng ngay tại thời điểm đó. Chúng tôi qui ước lượng đường khử ngay tại thời điểm bắt đầu châm cơ chất vào cột tương đương với 100% hoạt tính của invertase cố định. Từ đó, sau khi xác định được hàm lượng đường khử trong mẫu tại những thời điểm xác định, chúng tôi có thể xác định được phần trăm hoạt tính invertase cố định so với hoạt tính ban đầu (chính là hoạt tính của enzyme tại thời điểm bắt đầu châm cơ chất) tại thời điểm đó.

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp quang phổ so màu, sử dụng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid [14].

2.3. Chú thích một số thuật ngữ

2.3.1. Hằng số tốc độ vô hoạt enzyme

Quá trình vô hoạt enzyme dưới tác động của các yếu tố môi trường được biểu diễn bằng phương trình động học bậc một [5]:



Trong đó, E_a: Enzyme hoạt động,

E_i: Enzyme đã bị vô hoạt.

Tốc độ vô hoạt enzyme được tính bằng công thức:

$$V = k \cdot [E_a] \quad (5)$$

Trong đó, V: Tốc độ tức thời của quá trình vô hoạt enzyme tại thời điểm t (g/l.giờ),

k: Hằng số tốc độ vô hoạt enzyme (giờ⁻¹),

E_a: Hàm lượng enzyme chưa bị vô hoạt tại thời điểm t (g/l).

Ý nghĩa của hằng số tốc độ vô hoạt enzyme k: k chính là tốc độ vô hoạt enzyme khi nồng độ enzyme ban đầu tham gia phản ứng là 1g/l. k càng lớn, vận tốc vô hoạt enzyme càng lớn. k được tính bằng đơn vị (1/đơn vị thời gian). Đơn vị thời gian sử dụng có thể là phút, giờ hay ngày...

2.3.2. Thời gian “bán hủy”

Thời gian “bán hủy” $t_{1/2}$ được định nghĩa là thời gian mà tại đó hoạt tính của enzyme giảm đi 50% so với giá trị hoạt tính ban đầu.

2.3.3. Tốc độ pha loãng cơ chất

Tốc độ pha loãng cơ chất được tính bằng tỉ số giữa lưu lượng dòng nhập cơ chất và thể tích dung dịch trong cột phản ứng. Tốc độ pha loãng cho biết % tỉ lệ thể tích của dung dịch cơ chất trong cột phản ứng được “làm mới” trong quá trình thủy phân.

$$D = \frac{F}{V} \quad (6)$$

Trong đó, D: tốc độ pha loãng (giờ^{-1}),

F: Lưu lượng dòng nhập cơ chất (ml/giờ),

V: Thể tích dung dịch trong cột phản ứng (ml).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Hiệu suất cố định enzyme invertase trong gel alginate

Khi cố định enzyme trên một chất mang xác định, sẽ có một phần nhỏ enzyme bị thoát ra ngoài nhất mang trong quá trình cố định. Lượng enzyme bị thoát ra ngoài càng ít thì hiệu quả cố định của phương pháp đó sẽ càng cao và triển vọng ứng dụng của phương pháp đó sẽ lớn hơn.

Khi cố định enzyme invertase trong chất mang alginate bằng phương pháp nhốt trong khuôn gel, hiệu suất cố định enzyme invertase là $79,34 \pm 3,48\%$ (Bảng 1). Khi thực hiện thí nghiệm, chúng tôi thấy rằng phần lớn lượng enzyme bị thoát ra ngoài hạt gel trong quá trình cố định là những phân tử enzyme ở bề mặt hạt. Đó là do khi nhỏ hỗn hợp enzyme-alginate natri vào trong dung dịch CaCl_2 2% để tạo hạt, một số phân tử enzyme nằm tại bề mặt ngoài và vùng biên thoát vào dung dịch CaCl_2 . Số liệu thực nghiệm cho thấy dung dịch CaCl_2 sau quá trình ngâm hạt gel có chứa một lượng enzyme invertase. Ngược lại, hàm lượng invertase trong nước cất sau quá trình rửa là không đáng kể. Như vậy, quá trình rửa các hạt gel chứa enzyme invertase ngay sau khi tạo hạt không làm tổn thất lượng enzyme có trong hạt. Nguyên nhân chính là do cấu trúc lỗ mao quản của mạng gel alginate khá nhỏ so với kích thước phân tử của enzyme invertase nên enzyme không bị khuếch tán ra ngoài trong quá trình rửa.

Bảng 1: Hiệu suất cố định invertase trên gel alginate.

Thí nghiệm	Lượng enzyme ban đầu dùng để cố định A_0 (g)	Lượng enzyme không bị cố định A (g)	Hiệu suất cố định H (%)
1	0,89	0,22	75,66
2	1,25	0,16	79,53
3	1,33	0,29	82,29
Trung bình			$79,34 \pm 3,59$

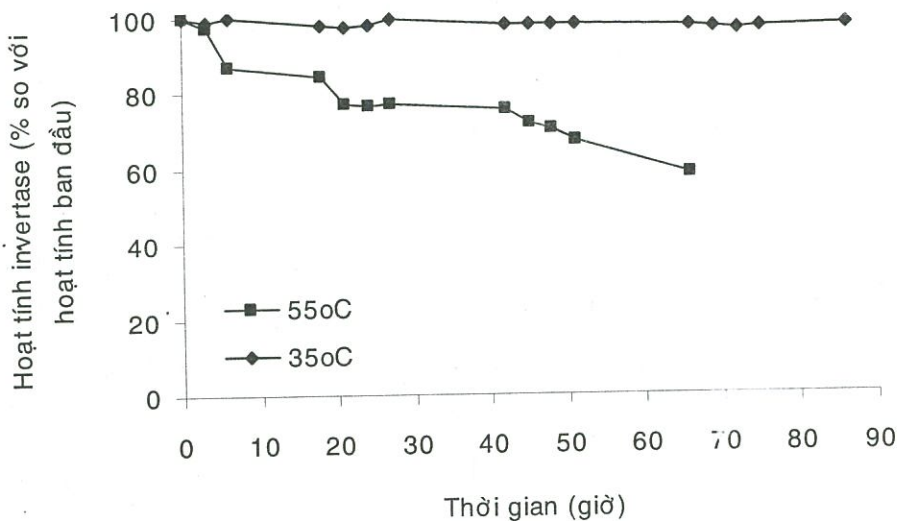
Như vậy, khi so sánh hiệu suất cố định enzyme invertase trong gel alginate với hiệu suất cố định enzyme invertase trên nhiều loại chất mang khác như lectin (hiệu suất cố định là 76%

(Ahman và cộng sự, 2001)) [2], polyacrylamide (hiệu suất cố định là 100% (Abdellah và cộng sự, 1992)) [1] thì hiệu suất cố định enzyme trong gel alginate cũng khá cao.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân saccharose trong thiết bị phản ứng liên tục

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate ở 2 chế độ nhiệt độ là 35 và 55 °C trong 86 giờ. Kết quả thí nghiệm thu được cho thấy:

- Khi vận hành thiết bị ở 55 °C, thời gian lưu cần thiết để hiệu suất thủy phân saccharose đạt 85% trước khi tiến hành châm cơ chất và tháo sản phẩm ra khỏi cột là 5 giờ. Trong khi đó, nếu vận hành thiết bị ở 35 °C thì thời gian lưu kéo dài tới 7 giờ.
- Sau 86 giờ thủy phân, ở 35 °C, hoạt tính enzyme còn 95% so với giá trị hoạt tính ban đầu; trong khi đó, ở 55 °C, hoạt tính enzyme chỉ còn 58% so với giá trị hoạt tính ban đầu (Hình 1).



Hình 1. Độ bền hoạt tính của enzyme invertase cố định trong gel alginate trong suốt quá trình thủy phân saccharose trong thiết bị phản ứng liên tục ở 35 và 55 °C. Cơ chất là dung dịch saccharose có nồng độ 200 g/L, tốc độ pha loãng cơ chất của hệ thống là 0,12 giờ⁻¹.

Như vậy, trong những giờ thủy phân đầu tiên, hoạt tính xúc tác của invertase cố định ở 55 °C cao hơn so với ở 35 °C. Tuy nhiên, trong những giờ thủy phân tiếp theo, việc tăng nhiệt độ làm cho hoạt tính xúc tác của invertase cố định giảm đi nhanh chóng. Nguyên nhân của hiện tượng trên là do enzyme đã bị vô hoạt dưới tác dụng của nhiệt độ [2, 5, 7].

Từ kết quả thí nghiệm trên, chúng tôi tiến hành xác định hằng số tốc độ vô hoạt enzyme k và thời gian "bán hủy" $t_{1/2}$ (Bảng 1). Kết quả thí nghiệm cho thấy hằng số tốc độ vô hoạt enzyme k của enzyme cố định trong trường hợp thủy phân ở 35 °C thấp hơn 20 lần trường hợp thủy phân ở 55 °C. Còn thời gian "bán hủy" trong trường hợp thủy phân ở 35 °C dài hơn 24 lần trường hợp thủy phân ở 55 °C. Như vậy, ở nhiệt độ 35 °C, độ bền hoạt tính của enzyme invertase cố định trong gel alginate khá lớn. Do đó, việc ứng dụng enzyme invertase cố định trong gel alginate vào thực tiễn sản xuất là rất khả thi.

Vấn đề cần được chú ý ở đây là vi sinh vật có thể phát triển trong dung dịch thủy phân khi quá trình được thực hiện ở nhiệt độ 35 °C. Tuy nhiên, điều đó không đáng lo ngại vì đối với một hệ thống thiết bị liên tục khép kín đã được vệ sinh kỹ, dịch cơ chất đầu vào đã được thanh trùng và pH của dung dịch cơ chất có giá trị 4,5 thì nguy cơ nhiễm vi sinh là không lớn. Mặt khác, để hạn chế sự phát triển của vi sinh vật, chúng ta cũng có thể tiến hành sử dụng dung dịch cơ chất có nồng độ cao. Giải pháp này rất có lợi về mặt kinh tế vì sẽ làm giảm kích thước thiết bị sử dụng và tổng chi phí năng lượng cho quá trình thủy phân.

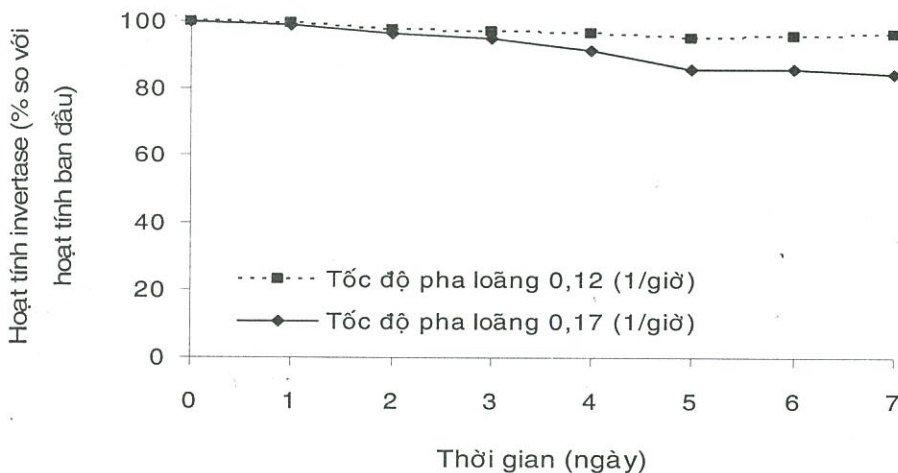
3.3. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ pha loãng đến quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định, sử dụng 2 tốc độ pha loãng cơ chất là 0,12giờ⁻¹ và 0,17giờ⁻¹. Thí nghiệm được tiến hành trong 7 ngày. Nhiệt độ thủy phân là 35°C. Kết quả trên hình 2 cho thấy: Ở tốc độ pha loãng cơ chất 0,12 giờ⁻¹ và 0,17 giờ⁻¹, sau 7 ngày hoạt động, hoạt tính của enzyme invertase cố định còn lại lần lượt là 95% và 84% so với giá trị ban đầu.

Bảng 2. Hằng số tốc độ vô hoạt enzyme k và thời gian “bán hủy” t_{1/2} của enzyme invertase cố định trong gel alginate trong quá trình xúc tác trong thiết bị thủy phân liên tục.

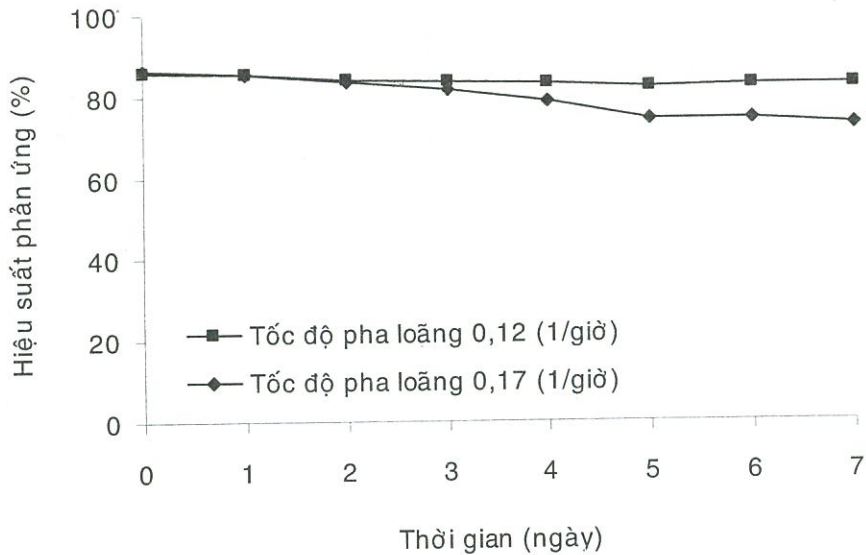
Chế độ vận hành		t _{1/2} (giờ)	k (giờ ⁻¹)
Nhiệt độ (°C)	Tốc độ pha loãng (giờ ⁻¹)		
55	0,12	93	6,9.10 ⁻³
35	0,12	2286	3,0.10 ⁻⁴
35	0,17	612	1,2.10 ⁻³

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy khi vận hành cột ở 35°C, hằng số tốc độ vô hoạt enzyme k của enzyme cố định khi vận hành cột ở tốc độ pha loãng 0,17giờ⁻¹ cao hơn 4 lần so với trường hợp vận hành cột ở tốc độ pha loãng 0,12giờ⁻¹. Thời gian "bán hủy" t_{1/2} trong trường hợp tốc độ pha loãng 0,17 giờ⁻¹ ngắn hơn 3,7 lần so với trường hợp tốc độ pha loãng 0,12giờ⁻¹ (Bảng 1).



Hình 2. Độ bền của enzyme invertase cố định trong gel alginate trong suốt quá trình thủy phân saccharose trong thiết bị phản ứng liên tục ở 2 tốc độ pha loãng cơ chất là 0,12giờ⁻¹ và 0,17giờ⁻¹.

Như vậy, khi tăng tốc độ pha loãng cơ chất của hệ thống liên tục, năng suất hoạt động của hệ thống sẽ tăng, tuy nhiên, hoạt tính của enzyme sẽ giảm nhanh theo thời gian. Nguyên nhân của hiện tượng này không phải là do enzyme bị vô hoạt mà là do khi tốc độ pha loãng của hệ thống quá lớn thì thời gian cơ chất trong cột phản ứng được tiếp xúc với enzyme sẽ giảm, kết quả dẫn đến một phần cơ chất chưa kịp tiếp xúc với enzyme đã bị đẩy ra khỏi hệ thống, làm giảm hiệu suất thủy phân của phản ứng [7]. Kết quả thực nghiệm trên hình 3 cho thấy sau 7 ngày thủy phân, hiệu suất phản ứng ở tốc độ pha loãng $0,17\text{giờ}^{-1}$ luôn thấp hơn so với trường hợp tốc độ pha loãng $0,12\text{giờ}^{-1}$. Trong thực tế sản xuất, để chọn được chế độ vận hành tối ưu, chúng ta nên cân nhắc giữa năng suất và hiệu suất sao cho phù hợp với mục tiêu đã được đề ra.



Hình 3. Hiệu suất quá trình thủy phân liên tục saccharose bằng enzyme invertase cố định trong gel alginate trong suốt quá trình vận hành ở 2 chế độ pha loãng cơ chất là $0,12\text{giờ}^{-1}$ và $0,17\text{giờ}^{-1}$.

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi thấy rằng nhiệt độ và tốc độ pha loãng có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân saccharose trong thiết bị phản ứng liên tục. Khi tăng nhiệt độ từ 35 lên 55°C , hoạt tính của enzyme cố định trong những giờ thủy phân đầu tiên, sẽ tăng; tuy nhiên, hoạt tính của enzyme cố định sẽ giảm nhanh trong những giờ thủy phân tiếp theo. Còn khi tăng tốc độ pha loãng thì năng suất hoạt động của cột phản ứng sẽ tăng, tuy nhiên hiệu suất thủy phân sẽ giảm. Trong thực tế sản xuất, khi sử dụng enzyme cố định trong thiết bị phản ứng liên tục, chúng ta nên cân đối các hàm mục tiêu để chọn chế độ vận hành thiết bị cho phù hợp.

STUDY ON CONTINUOUS HYDROLYSIS OF SUCROSE BY INVERTASE IMMOBILIZED IN ALGINATE GEL

Vu Thi Kim Hanh, Le Van Viet Man
University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT: This research focuses on the continuous hydrolysis of sucrose by invertase immobilized in alginate gel. In the continuous bioreactor, the inversion of saccharose was effected by the reaction temperature and by the dilution rate of the system. Our experimental results show that: During the first hours, the activity of immobilized invertase at high temperature (55 °C) was higher than that of immobilized invertase at low temperature (35 °C). However, the enzyme activity decreased significantly during the following period of hydrolysis. The half-life of immobilized invertase at 55 °C and 35 °C was 4 and 95 days, respectively. Increase in dilution rate of the system raised its productivity but decreased the hydrolytic yield of sucrose inversion. With the dilution rate of system is 0,12 and 0,17 h⁻¹, the hydrolytic yield of sucrose inversion after 7 days was 82 and 72%, respectively.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Abdellah H. A, Baker T. M. A, Shekib L. A, El-Iraqi S. M, Characteristics of invertase immobilized on three different types of supports, *Food Chemistry*, Vol. 43, 369-375 (1992).
- [2]. Ahmad Shama, Anwar Adil, Saleemuddin. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support, *Bioresource Technology*, Vol. 79, 121-127 (2001).
- [3]. Akgul S, Kaçar Y, Denizli A, Arica M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres, *Food Chemistry*, Vol. 74, 281-288 (2001).
- [4]. Arruda L. M. O, Vitolo M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 81, 23-34 (1999).
- [5]. Bailey J. E, Ollis D. F. *Biochemical engineering fundamentals* 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, United States of America, 86-226 (1986).
- [6]. Bayramođlu G, Akgul S, Bulut A, Denizli A. Yakup A. M. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continous flow system, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 14, 117-126 (2003).
- [7]. Bergamasco R, Bassetti F. J, Moraes de F. F, Zanin G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 17, 873-880 (2000).
- [8]. Hradil J, Švec F. Inversion of sucrose in a continuous process with -D-fructofuranosidase (invertase) immobilized on bead DEAHP-cellulose, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 3, 336-340 (1981).
- [9]. Hsieh H. J, Liu P. C, Liao W. J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability, *Biotechnology Letters*, Vol. 22, 1459-1464 (2000).

- [10]. Le Van Viet Man, Duong Thi Thuy Tram. Application of immobilized invertase in invert syrup processing from sucrose, *Proceedings of the 8th Asean Food Conference*, Agriculture publishing house, Hanoi, 435-439 (2003).
- [11]. Mansfeld J, Schellenberger A, Rmbach J. Application of polystyrene-bound invertase to continous sucrose hydrolysis on pilot scale, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 40, 997-1003 (1992).
- [12]. Mansour E. H, Dawoud F. M. Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 83, 446-450 (2003).
- [13]. Melo J. S, D'Souza S. F. Simultaneous filtration and immobilization of cells from a flowing suspension using a bioreactor containing polyethylenimine coated cotton threads: Application in the continuous inversion of concentrated sucrose syrups, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 15, 17-21 (1999).
- [14]. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, 426-429 (1959).
- [15]. Monsan P, Combes D. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 26, 347-351 (1984).