

## NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA ENZYME $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE ( $\beta$ -Ffase) TỪ NẤM MỐC *Aspergillus*

Mai Huỳnh Đoan Anh<sup>(1)</sup>, Phạm Thị Ánh Hồng<sup>(1)</sup>, Nguyễn Như Nhứt<sup>(2)</sup>

(1) Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG - HCM

(2) Công ty TNHH Gia Tường

(Bài nhận ngày 08 tháng 11 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 07 tháng 08 năm 2006)

**TÓM TẮT:** Nhằm góp phần vào bước đầu xây dựng mô hình sản xuất enzyme Fructo-Oligosaccharide (FOS) sau này, chúng tôi tiến hành các giai đoạn thí nghiệm sau:

1. Khảo sát khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của một số chủng vi nấm *Aspergillus* được phân lập từ một số sản phẩm nông nghiệp ở Việt Nam và chọn chủng có khả năng tổng hợp cao nhất.

2. Khảo sát một số điều kiện để tổng hợp và thu nhận enzyme  $\beta$ -Ffase.

3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính thủy phân sucrose của enzyme  $\beta$ -Ffase như: pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất, động học thủy phân cơ chất.

### 1. MỞ ĐẦU

$\beta$ -Ffase (EC 3.2.1.26) là một enzyme thuộc họ GH 68 còn được gọi với nhiều tên khác như invertase; invertin; acid invertase; saccharase; glucosucrase;  $\beta$ -fructosidase; sucrase;  $\beta$ -h-fructosidase; fructosylinvertase.  $\beta$ -Ffase được tổng hợp bởi nhiều loài thực vật và vi sinh vật khác nhau với nhiều chức năng sinh học quan trọng như tham gia vào quá trình biến dưỡng và vận chuyển hexose, làm chậm quá trình lão ở thực vật.

$\beta$ -Ffase là một trong những enzyme có ứng dụng quan trọng trong sản xuất các fructo-oligosaccharide (FOS), một thành phần tối cần thiết và hữu ích trong các sản phẩm thực phẩm chức năng.

FOS là một trong hơn 12 loại oligosaccharide đã được thương mại hóa. Ở Hàn Quốc, Bỉ, Pháp, Mỹ và nhất là Nhật Bản, FOS hấp dẫn người tiêu dùng trong những năm gần đây bởi FOS mang nhiều đặc tính chức năng có lợi cho sức khỏe con người như giảm cholesterol và mỡ trong máu, phòng ngừa bệnh tiểu đường và bệnh xơ cứng động mạch, kích thích hoạt động của hệ tiêu hóa, chống béo phì, không gây sâu răng...<sup>(1)</sup>

Hiện nay, một lượng đáng kể FOS trên thế giới được sản xuất bằng enzyme  $\beta$ -Ffase thu nhận từ nấm mốc *Aspergillus*, đặc biệt là các chủng *A. niger*, *A. japonicus*, *A. sydowi*. Tuy nhiên, ở nước ta vẫn chưa có các nghiên cứu ứng dụng nào của  $\beta$ -Ffase vào việc sản xuất FOS. Mục tiêu của đề tài nhằm sàng lọc các chủng *Aspergillus* có khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase cao và một số điều kiện để thu nhận cũng như vài đặc tính của enzyme này.

### 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM:

#### 2.1. Vật liệu:

Chúng tôi sử dụng 8 chủng *Aspergillus* phân lập từ các nguồn khác nhau.

STT	Tên chủng	Ký hiệu	Nguồn phân lập
1	<i>Aspergillus niger</i>	A1	Phân lập từ thức ăn hỗn hợp gà cò
2	<i>Aspergillus niger</i>	A2	Phân lập từ thức ăn hỗn hợp vịt cò
3	<i>Aspergillus niger</i>	A3	Phân lập từ đậu phộng ở Cù Chi
4	<i>Aspergillus niger</i>	A4	Phân lập từ thức ăn hỗn hợp heo Faco



5	<i>Aspergillus sydowi</i>	A5	Phân lập từ tinh bột bắp
6	<i>Aspergillus sydowi</i>	A6	Phân lập từ bột sò
7	<i>Aspergillus foetidus</i>	A7	Phân lập từ tinh bột bắp
8	<i>Aspergillus foetidus</i>	A8	Phân lập từ thức ăn hỗn hợp heo

**2.2. Phương pháp**

**2.2.1. Phương pháp lên men:** nuôi cấy lắc trong môi trường lỏng Hidaka (với 2% sucrose, 1,2% cao nấm men và 0,2% CMC; tất cả được pha trong đệm McIlvaine pH 5,0)<sup>(1)</sup>. Thời gian nuôi là 4 ngày, tốc độ 200 vòng/phút ở 30<sup>o</sup>C với mật độ giống ban đầu 10<sup>5</sup> bào tử/100ml môi trường Hidaka.

**2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -Ffase dựa trên nguyên tắc enzyme  $\beta$ -Ffase** có khả năng cắt liên kết glucoside của sucrose tạo thành sản phẩm glucose và fructose. Do đó, dựa vào hàm lượng glucose sinh ra để xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -Ffase. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dung dịch đệm McIlvaine pH 5,0, 1 ml dung dịch sucrose 25% và 1 ml dịch  $\beta$ -Ffase. Phản ứng được thực hiện ở 40<sup>o</sup>C trong 10 phút và được dừng bằng cách đun sôi cách thủy trong 5 phút<sup>(4)</sup>. Sau đó, xác định hàm lượng đường glucose trong hỗn hợp bằng phương pháp xác định đường khử theo Miller<sup>(7)</sup>. Một đơn vị hoạt tính là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1  $\gamma$  glucose trong một phút.

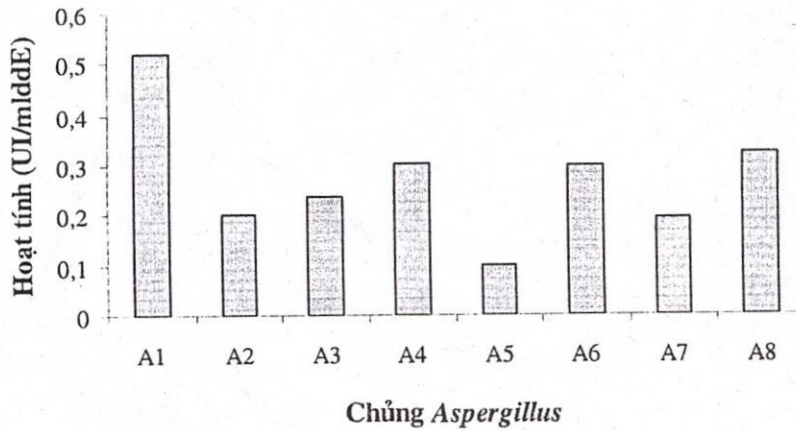
**3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN**

**3.1. Khảo sát chọn chủng *Aspergillus* cho enzyme  $\beta$ -ffase có hoạt tính cao nhất**

Nuôi cấy lắc 8 chủng *Aspergillus* trong môi trường lỏng Hidaka với 10<sup>5</sup> bào tử/100ml môi trường ở nhiệt độ phòng 29<sup>o</sup>C đến 32<sup>o</sup>C, trong 4 ngày. Sau đó thu dịch enzyme ngoại bào thô và tiến hành xác định hoạt tính của dịch enzyme  $\beta$ -Ffase ngoại bào. Dựa vào kết quả hoạt tính của enzyme để chọn chủng *Aspergillus* cho hoạt tính enzyme cao nhất.

**Bảng 1.** Khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của 8 chủng nấm mốc trên môi trường Hidaka

Chủng <i>Aspergillus</i>	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma$ /ml)	Hoạt tính (UI/mlDD.E)
A1	0,406	0,852	0,466	310,7	0,518
A2	0,454	0,636	0,182	121,3	0,202
A3	0,466	0,681	0,215	143,3	0,239
A4	0,483	0,756	0,274	182,7	0,304
A5	0,079	0,169	0,090	60,0	0,100
A6	0,168	0,437	0,269	179,3	0,299
A7	0,082	0,257	0,175	116,7	0,194
A8	0,075	0,369	0,294	196,0	0,327



**Hình 1.** Khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của 8 chủng nấm mốc trên môi trường Hidaka

Kết quả trên cho thấy khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của các chủng nấm mốc rất khác nhau. Trong số 8 chủng được khảo sát thì chủng A1 có khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase cao nhất trên môi trường Hidaka nên được chọn tiếp tục cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.2. Tổng hợp và thu nhận $\beta$ -Ffase

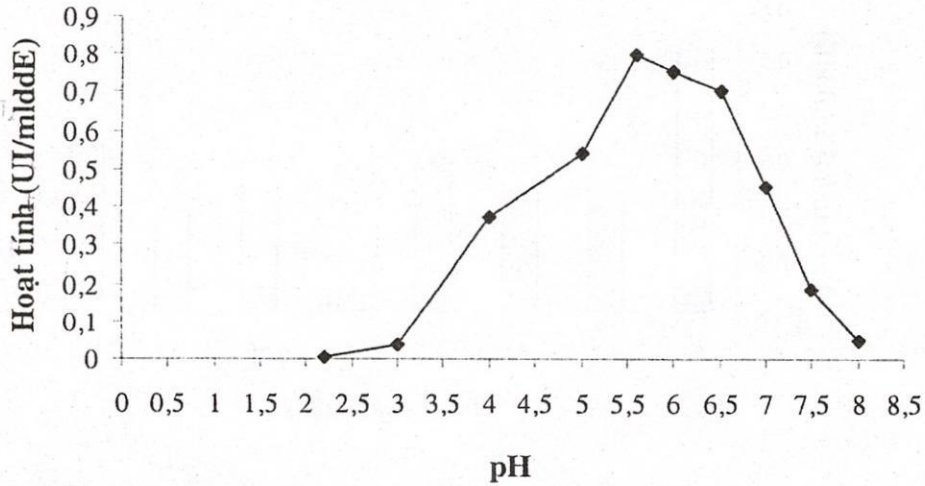
#### 3.2.1. Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự tổng hợp $\beta$ -Ffase của chủng chọn được

Nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* A1 trong môi trường Hidaka có pH thay đổi từ pH2,2- pH8,0. Kết quả kiểm tra hoạt tính được trình bày trong **bảng 2**.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của pH môi trường lên khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của chủng A1

pH	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma/ml$ )	Hoạt tính (UI/mlDD.E)
2,2	0,008	0,012	0,004	2,67	0,004
3,0	0,01	0,045	0,035	23,33	0,038
4,0	0,244	0,574	0,334	222,67	0,371
5,0	0,301	0,790	0,489	326,00	0,543
<b>5,6</b>	<b>0,123</b>	<b>0,846</b>	<b>0,723</b>	<b>482,00</b>	<b>0,803</b>
6,0	0,105	0,785	0,680	453,33	0,756
6,5	0,115	0,752	0,637	424,67	0,707
7,0	0,098	0,506	0,408	272,00	0,453
7,5	0,07	0,237	0,167	111,33	0,185
8,0	0,06	0,106	0,046	30,67	0,051





**Hình 2.** Ảnh hưởng của pH môi trường lên khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase của chủng A1

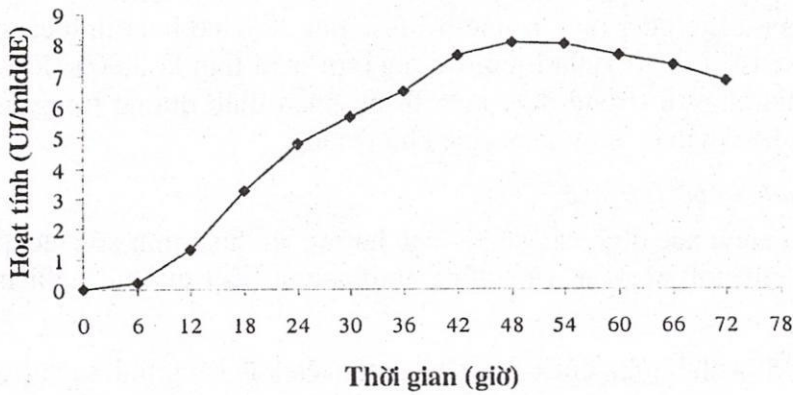
Các kết quả đạt được cho thấy chủng A1 có khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase trong một dãy pH từ 5,0 đến 7,0; tuy nhiên, pH 5,6 là pH tối ưu nhất.

**3.2.2. Thời gian thu nhận  $\beta$ -Ffase**

Nuôi cấy lắc chủng A1 Hidaka có pH<sub>Op</sub> = 5,6 sao cho  $10^5$  bào tử/100ml. Sau mỗi 6 giờ thu dịch enzyme và kiểm tra hoạt tính một lần.

**Bảng 3.** Sự biến thiên hoạt tính  $\beta$ -Ffase theo thời gian nuôi cấy

Thời gian (giờ)	Độ pha loãng (lần)	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma/ml$ )	Hoạt tính (UI/ml dDE)
0	50	0	0	0	0	0
6	50	0,010	0,014	0,004	2,784	0,232
12	50	0,013	0,036	0,023	15,68	1,307
18	50	0,013	0,071	0,058	38,92	3,246
24	50	0,014	0,100	0,086	57,41	4,784
30	50	0,013	0,115	0,102	68,09	5,674
36	50	0,012	0,128	0,116	77,65	6,471
42	50	0,015	0,153	0,138	91,89	7,658
<b>48</b>	<b>50</b>	<b>0,014</b>	<b>0,159</b>	<b>0,145</b>	<b>96,67</b>	<b>8,056</b>
54	50	0,013	0,157	0,144	96,12	8,010
60	50	0,014	0,152	0,138	91,85	7,654
66	50	0,015	0,147	0,132	87,94	7,328
72	50	0,013	0,135	0,122	81,74	6,812



**Hình 3.** Sự biến thiên hoạt tính  $\beta$ -Ffase theo thời gian nuôi cấy

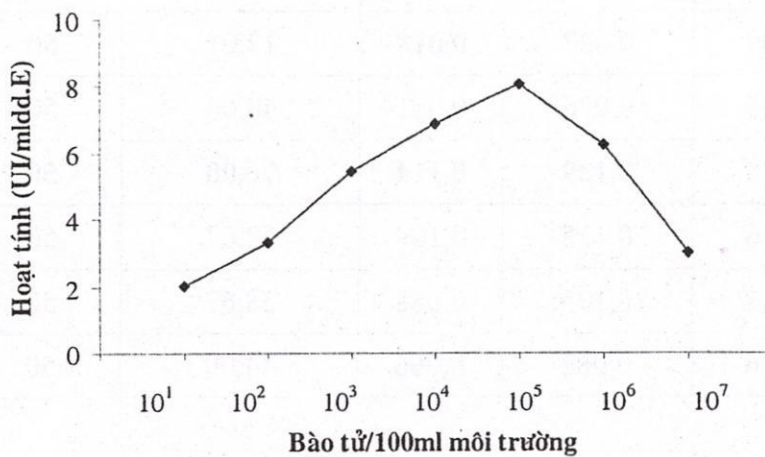
Từ 6 giờ sau khi nuôi cấy, hoạt tính  $\beta$ -Ffase tăng liên tục và tăng chậm ở khoảng 42 đến 48 giờ, sau đó, hoạt tính  $\beta$ -Ffase giảm dần. Do đó, có thể thu nhận enzyme sau 48 giờ nuôi cấy. Thời gian ổn định lâu (từ 48 đến 54 giờ) là ưu điểm cho quá trình thu nhận tiếp theo.

**3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống ban đầu lên sự tổng hợp  $\beta$ -Ffase**

Nuôi cấy chủng A1 theo các điều kiện tối ưu với tỷ lệ giống thay đổi từ  $10^1$  đến  $10^7$  bào tử/100ml môi trường. Kết quả thu được như sau:

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của tỷ lệ giống

Tỷ lệ giống $10^n$ bào tử/100mlMT	Độpha loãng (lần)	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma$ /ml)	Hoạt tính (UI/mldd. E)
$10^1$	50	0,017	0,053	0,036	24,19	2,016
$10^2$	50	0,016	0,076	0,060	40,09	3,341
$10^3$	50	0,017	0,114	0,097	65,07	5,423
$10^4$	50	0,018	0,142	0,124	82,69	6,891
<b><math>10^5</math></b>	<b>50</b>	<b>0,018</b>	<b>0,163</b>	<b>0,145</b>	<b>96,72</b>	<b>8,060</b>
$10^6$	50	0,016	0,128	0,112	74,59	6,216
$10^7$	50	0,018	0,072	0,054	36,19	3,016



**Hình 4.** Ảnh hưởng của tỷ lệ giống



Thông qua các số liệu thí nghiệm ở bảng 4 và đồ thị 3 cho thấy khi tỷ lệ giống bổ sung vào môi trường lên men càng tăng thì enzyme  $\beta$ -Ffase thu được có hoạt tính càng cao. Nhưng chỉ đạt cực đại ở tỷ lệ  $10^5$  bào tử/100ml môi trường (với hoạt tính là 8,060 UI/ml dd.E). Khi tỷ lệ giống vượt quá ngưỡng  $10^5$  trong điều kiện thành phần dinh dưỡng trong môi trường không được bổ sung nên kéo theo hoạt tính enzyme không tăng.

**3.2.4. Tinh sạch sơ bộ  $\beta$ -Ffase**

Trước khi tiến hành xác định các yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính xúc tác,  $\beta$ -Ffase được tinh sạch sơ bộ bằng ethanol, acetone và sulfate ammonium. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 5.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của các tác nhân rửa lên khả năng tinh sạch  $\beta$ -Ffase

Chế phẩm enzyme	Tỷ lệ tác nhân rửa/dd. $\beta$ -Ffase	Hoạt tính chung (UI/gCP.E)	Hoạt tính riêng (UI/mg protein)
CP.E rửa bằng ethanol	1 : 2	736,04	49,61
CP.E rửa bằng acetone	1 : 1,5	724,77	48,43
CP.E rửa bằng $(NH_4)_2SO_4$	60%	418,78	36,61

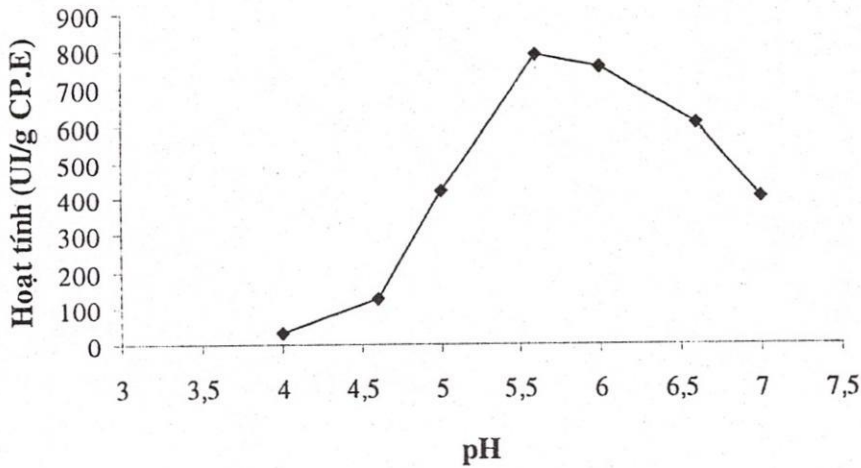
Kết quả trên cho thấy enzyme  $\beta$ -Ffase do chủng A1 tổng hợp thích hợp để tinh sạch bằng các dung môi hữu cơ ethanol và acetone hơn là muối sulfate ammonium. Chế phẩm được rửa bằng ethanol và acetone có hoạt tính gần bằng nhau, cao nhất là chế phẩm được rửa bằng ethanol (49,61 UI/mg protein).

**3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính thủy phân sucrose của  $\beta$ -Ffase**

**3.3.1. Ảnh hưởng của pH**

**Bảng 6.** Ảnh hưởng pH lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

pH	ODTB thử Không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma$ /ml)	Độ pha loãng (lần)	Hoạt tính (UI/gCP.E)
4.0	0,005	0,010	0,005	3,33	50	34,68
4.6	0,009	0,027	0,018	12,01	50	125,10
5.0	0,015	0,076	0,061	40,66	50	423,54
<b>5.6</b>	<b>0,015</b>	<b>0,129</b>	<b>0,114</b>	<b>76,00</b>	<b>50</b>	<b>791,67</b>
6.0	0,016	0,125	0,109	72,67	50	756,98
6.6	0,017	0,105	0,088	58,67	50	611,14
7.0	0,016	0,082	0,066	44,00	50	405,88



**Hình 5.** Ảnh hưởng pH lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

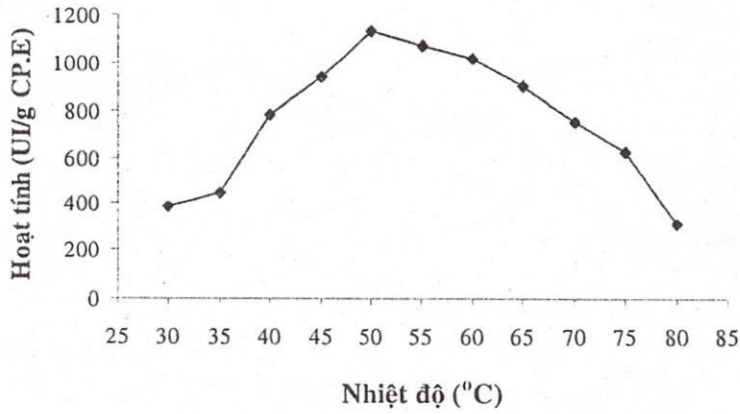
Enzyme  $\beta$ -Ffase do chủng A1 tổng hợp có dãy pH hoạt động trong vùng acid và tối ưu nhất ở pH 5,6. Kết quả này phù hợp với kết quả của Sarote Sirisansaneeyakull và cộng tác viên (2000) khi nghiên cứu  $\beta$ -Ffase của *Aspergillus niger* ATCC 20611 (pHop 5,5) và các nghiên cứu trước đây trên enzyme  $\beta$ -Ffase do nấm men và thực vật tổng hợp.

### 3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

**Bảng 7.** Ảnh hưởng nhiệt độ lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ )	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta\text{OD}_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma/\text{ml}$ )	Độ pha loãng (lần)	Hoạt tính (UI/gCP.E)
30	0,018	0,074	0,056	37,33	50	388,85
35	0,018	0,082	0,064	42,67	50	444,48
40	0,018	0,131	0,113	75,33	50	784,68
45	0,018	0,153	0,135	90,00	50	937,50
<b>50</b>	<b>0,018</b>	<b>0,181</b>	<b>0,163</b>	<b>108,67</b>	<b>50</b>	<b>1131,98</b>
55	0,018	0,173	0,155	103,33	50	1076,35
60	0,018	0,165	0,147	98,00	50	1020,83
65	0,018	0,148	0,130	86,67	50	902,81
70	0,018	0,126	0,108	72,00	50	750,00
75	0,018	0,108	0,090	60,00	50	625,00
80	0,018	0,063	0,045	30,00	50	312,50





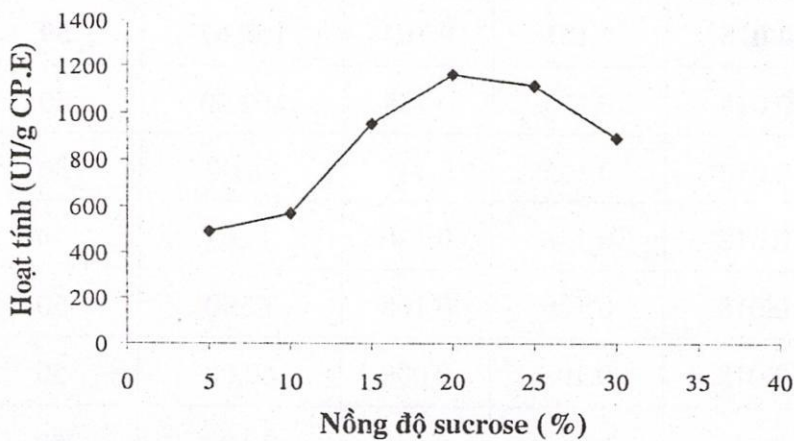
**Hình 6.** Ảnh hưởng nhiệt độ lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

Kết quả **bảng 7** và **hình 6** cho thấy enzyme này có dãy nhiệt độ hoạt động rộng (từ 30 đến 75°C); nhiệt độ tốt nhất cho hoạt tính thủy phân sucrose là 50°C với hoạt tính là 1131,98 UI/g chế phẩm. So với  $\beta$ -Ffase do *Aspergillus niger* ATCC 20611<sup>(1, 2)</sup> tổng hợp (top 40°C) thì enzyme này có mức nhiệt độ tối ưu cao hơn.

**3.3.3. Ảnh hưởng của nồng cơ chất**

**Bảng 8.** Ảnh hưởng nồng độ sucrose lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

Nồng độ Sucrose (%)	ODTB Thử không	ODTB Thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma/ml$ )	Độ pha loãng (lần)	Hoạt tính (UI/gCP.E)
5	0,014	0,085	0,071	47,33	50	493,02
10	0,014	0,096	0,082	54,67	50	569,48
15	0,016	0,153	0,137	91,33	50	951,35
<b>20</b>	<b>0,015</b>	<b>0,182</b>	<b>0,167</b>	<b>111,33</b>	<b>50</b>	<b>1159,69</b>
25	0,017	0,178	0,161	107,33	50	1118,02
30	0,016	0,145	0,129	86,00	50	895,83



**Hình 7.** Ảnh hưởng nồng độ cơ chất lên phản ứng thủy phân của enzyme  $\beta$ -Ffase

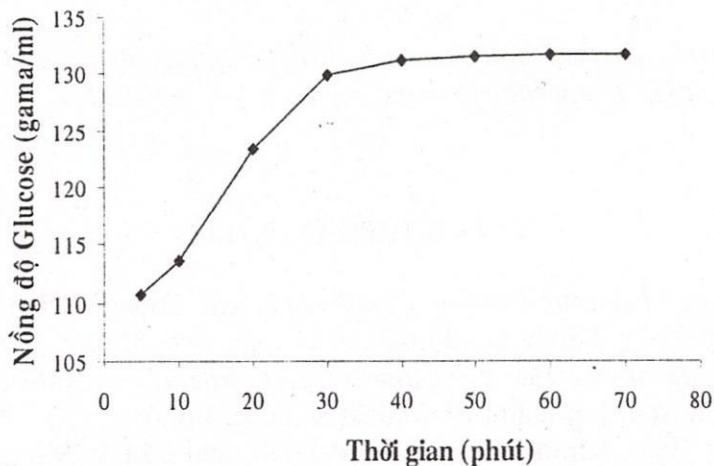


Các số liệu cho thấy hoạt tính  $\beta$ -Ffase cao nhất tại nồng độ sucrose là 20% (1159.69 UI/gCP.E). Khi nồng độ sucrose cao hơn 20% thì hoạt tính  $\beta$ -Ffase giảm dần vì nồng độ sucrose càng cao làm hỗn hợp phản ứng sánh đặc hơn, đồng thời, có thể cùng lúc 2 phân tử sucrose gắn vào trung tâm hoạt động của  $\beta$ -Ffase làm enzyme này bị bất hoạt (Arnd Sturm, 1999).

### 3.3.4. Động học thủy phân

Bảng 9. Động học thủy phân của  $\beta$ -Ffase

Thời gian (phút)	ODTB thử không	ODTB thử thật	$\Delta OD_{575}$	Nồng độ Glucose ( $\gamma/ml$ )
5	0,019	0,185	0,166	110,67
10	0,019	0,190	0,171	113,67
20	0,019	0,204	0,185	123,33
<b>30</b>	<b>0,019</b>	<b>0,213</b>	<b>0,194</b>	<b>129,87</b>
40	0,019	0,215	0,196	131,12
50	0,019	0,216	0,197	131,49
60	0,019	0,217	0,198	131,58
70	0,019	0,217	0,198	131,58



Hình 8. Động học thủy phân sucrose của enzyme  $\beta$ -Ffase

Kết quả cho thấy enzyme  $\beta$ -Ffase do chủng A1 hoạt động tốt nhất kể từ thời điểm 30 phút sau khi tiếp xúc với cơ chất.

## 4. KẾT LUẬN

Thông qua các kết quả thực hiện thí nghiệm, chúng tôi rút ra được một số kết luận sau:

- So sánh khả năng tổng hợp  $\beta$ -Ffase trong 8 chủng *Aspergillus* dùng trong thí nghiệm thì chủng A1 (*Aspergillus niger*) là chủng có khả năng tổng hợp enzyme  $\beta$ -Ffase cao nhất trên môi trường Hidaka.
- Điều kiện thích hợp để tổng hợp và thu nhận  $\beta$ -Ffase từ chủng A1 như sau:
  - pHop: 5,6.
  - Tỷ lệ giống:  $10^5$  bào tử/100ml môi trường Hidaka.
  - Thời gian lên men: 48 giờ.
  - Tinh sạch bằng ethanol với tỷ lệ 1 dịch chiết enzyme : 1 ethanol.
- Điều kiện tối ưu để enzyme  $\beta$ -Ffase hoạt động thủy giải sucrose:

- pH: 5.6
- Nhiệt độ: 50°C
- Nồng độ sucrose: 20%
- Thời gian phản ứng: 30 phút.

## RESEARCH SOME CHARACTERISTICS OF ENZYME $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE ( $\beta$ -Ffase) FROM *Aspergillus*

Mai Huynh Đoàn Anh<sup>(1)</sup>, Phạm Thị Anh Hồng<sup>(1)</sup>, Nguyễn Nhu Nhut<sup>(2)</sup>

(1) University of Natural Sciences, VNU- HCM

(2) Gia Tuong Company

**ABSTRACT:** To construct the manufacturing process of fructo-oligosaccharide enzyme (FOS) in the future, we carried out the following research stages :

1. Studying some types of *Aspergillus* to synthesize enzyme  $\beta$  - Ffase. We separated the types from agricultural products in Viet Nam and chose the types which have the ability to synthesize enzyme  $\beta$  - Ffase with high productivity.
2. Studying some conditions for culturing *Aspergillus* to have high productivity of enzyme  $\beta$  - Ffase.
3. Studying some factors influencing hydrolytic ability enzyme  $\beta$  - Ffase to produce sucrose such as : pH, temperature, concentration of substrates, hydrolytic kinetics of substrates.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Carol Brannon, *Prebiotic: Feeding friendly bacteria*, Today's Dietitian., 2003.
- [2]. Mirza Ahsen Baig, Kiran Shafiq, Sikander Ali, and Shazia Mirza, *Optimization of Cultural Condition for the Biosynthesis of  $\beta$ - fructofuranosidase by *Saccharomyces cerevisiae**, Pakistan Journal of Biological Science, Vol.6, p. 952-954., 2003.
- [3]. Mirza Ahsen Baig, Kiran Shafiq, Sikander Ali, and Shazia Mirza, *Effect of Nitrogen and Phosphate Sources on the Biosynthesis of  $\beta$ - fructofuranosidase*, Online Journal of Biological Science, Vol. 3, p. 519-595., 2003.
- [4]. Sarote Sirisansaneeyakul<sup>1</sup>, Sanya Jitbanjongkit<sup>1</sup>, Nararit Prasomsart<sup>1</sup> and Pairojana Luangpituksa<sup>2</sup>, *Production of  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger**, ATCC 20611. Kasetsart J. (Nat. Sci.), Vol. 34, p. 378-386., 2000.
- [5]. Sarote Sirisansaneeyakul, Sittiwat Lertsiri., *Enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose*, Kasetsart J (Nat. Sci.), Vol. 34, p. 262-269., 2000.
- [6]. Tirso Pons, Daniil G. Naumoff, Carlos Martonez-Fleites,<sup>1</sup> and Lazaro Hernandez., *Three Acidic Residues Are at the Active Site of a Propeller Architecture in Glycoside Hydrolase Families 32, 43, 62, and 68*, Proteins: Structure, Funtion, and Bioinformatics, Vol. 54, p. 424-432., 2004.
- [7]. <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab9d.htm#Method>