دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانيولينيز من عزلة محلية للعفن *Aspergillus niger* J_3

جاسم محمد عودة

قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد – العراق

المستخلص

تم الحصول على أربع عزلات من الأعفان النامية على درنات الالمازة المقطعة في المختبر وأجريت لها عملية غربلة لاختيار العزلة الاكفأ في إنتاج انزيم الانيولينيز Inulinase تبين أن العزلة التي رمز لها بـ J_3 هي الأكثر انتاجاً للانزيم. تم تشخيص هذه العزلة على ضوء الصفات التصنيفية المعتمدة وصنفت على أنها *Aspergillus niger*.درست الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم وبطريقة تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation من العزلة المذكورة أعلاه تمثلت بالمصدر الكاربوني حيث استخدمت أربعة مصادر للكاربون هي الكلوكوز والسكروز والانيولين ومسحوق الالمازة المجففة فتبين أن أعلى انتاجية تحققت باستخدام مسحوق الألمازة المجففة .أما مصدر النتروجين فقد استخدمت نترات الصوديوم وخلاصة الخميرة والببتون ومزيج خلاصة الخميرة ونترات الصوديوم بنسبة 1:1 وأضيفت المصادر المذكورة بتركيز 0.2%. فوجد أن أعلى فعالية وفعالية نوعية هي باستخدام مزيج خلاصة الخميرة ونترات الصوديوم ودرس الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الانزيم ما بين الأرقام الهيدروجينة (4-9) فوجد أن أفضل الرقم الهيدروجيني 5 أعطى أعلى فعالية للانزيم.كما درست حرارة الحضن باستخدام درجات حرارة تراوحت (20-40) م فكانت درجة الحرارة 30م° هي أفضل درجة حرارة حضن الانزيم واما مدد الحضن التي درست عبر (72– 192) ساعة فوجد أن المدة 168 ساعة هي الأفضل للحصول على أعلى انتاجية معبراً عنة بفعالية للاينولينيز .

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (5) : 52-14 (2008) Zangana & Naji

STUDYING OF THE OPTIMUM CONDITIONS TO PRODUCE INULINAS FROM A LOCAL ISOLATE OF *Aspergillus niger* J_3

Jasim M. Awda
Depart. of Food Sci. and Biotechnology
University Of Baghdad

ABSTRACT

Four isolates of fungi grown on Jerusalem artichoke were subjected to screening process for select the highest producer one of the inulinase enzyme. The isolate J_3 was found the highest producer. The isolate J_3 was identified according as *Aspergillus niger*. Result showed that the optimum condition to produce the enzyme by solid state fermentation is by using dried Jerusalem artichoke as carbon source.For nitrogen source we used sodium nitrate, yeast extract, peptone and mixture of yeast extract with sodium nitrate in ratio 1:1 and 0.2% concentration. It has been found that the using mixture of yeast extract and sodium nitrate was given the highest activity of enzyme.Initial pH which was used is between (4-9) and it has been found that the optimum pH for producing of the enzyme was (5).The incubation temp was ranging from 20to 40C° it has been found that 30C° is the best temperature for incubation.Different incubation periods was taken ranging from 72hrs to 192 hr, and the optimum incubation period was found 168hr which given the highest activity of inulinase enzyme.

المقدمـــــة:

يعد انـــزيم الانيـــولينيز E.C 3.2.1.7 1,2-B-D fructan fractanohydrolase من الانزيمات المهمة فـــي الصناعات الغذائية والدوائية لقابليته علـــى تحليـــل الانيـــولين (وهو من الألياف الذائبة عديم الحلاوة) معطـــي شـــراب ذو حلاوة عالية (95% فركتوز ، 5% كلوكوز (9,4).ويتواجـــد الانيولين في العديد من النباتات كالهندباء (9) والبطاطا الحلوة (8) والالمازة وغيرها (14).وعادةً ما ينـــتج مـــن الألمـــازة Jerusalem artichoke التي تحوي انيـــولين بنسبـــة9.6% (3).

اما انزيم الانيولينيز فينـــتج مـــن مختلـــف الأحيـــاء المجهرية. فقد أشار (11) إلى انتاجه من بكتريـــا *Bacillus stearothermophilus* بينما أنتج (17) الانزيم من خميرة *Kluyveromyces marxianus* كمـــا ذكـــر (20) انتـــاج الانزيم من خميرة *Candida kefyr*.

استخلص الانزيم من العديـــد مـــن الاعفـــان مثـــل *Aspergillus niger* (21) ومـــن (13) *Rhizopus sp* ومن *Penicillium janczeuskii* (15) بينما انتج ووصف[4] الانزيم من *Aspergillus awamori* .

يكون الانتاج العالمي للانزيمات بشكل عام من الأحياء المجهرية وذلك لسهولة التعامل معها ووفره الانتاج وقصـــر مدة الحضانة وسهولة استخلاصها (2) ولاسيما من الأعفـــان وذلك ليسر متطلبات الأعفان الغذائية وملائمتهـــا لتخمـــرات الحالة الصـــلبة وامكانيـــة اســـتغلال المخلفـــات الزراعيـــة والصناعية في الانتاج

توجب ان تكون الأحياء المجهرية المستعملة لانتـــاج الانزيمات غير مرضية للانسان وان لا تنتج الذيفانات تحـــت الظروف الاعتيادية للمصنع (1) .

هدفت الدراسة الحالية إلى:

الحصول على عزلة عفنية منتجة للانيولينيز بوفره .

وتشخيص العزلة وفق المفتاح التصنيفي.

وتحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم والمتمثلة بتحديد المصـــدر الكاربوني والمصدر النتروجينـــي الأفضـــل لانتاج الانزيم والحرارة المثلى والـــرقم الهيـــدروجيني الابتدائي الأمثل ومدة التخمر المثلى لانتاج الانزيم.

طريقة العمل:

مصادر العزلات: تم عزل الأعفان النامية على قطـــع الألمازة في المختبر ورمز لها J_1 الى J_4.

الوسط الغـــذائي: اســـتخدم الوســـط Czapek-Dox Agar المحتوي على الانيولين المجهز من شركة (Chemical Ltd BHD) كمصدر للكاربون في عمليات العزل والغربلة.

طريقة التنمية: استخدم نظام تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation لتحديد العزلة الاكفأ في انتـــاج انـــزيم الانيولينيز واستخدمت كوالح الذرة المجروشة المعقمة كمـــادة ساندة Support ومرطبة بالوسط السائل المعقم Czapek-Dox Broth ذي الأس الهيـــدروجيني 6 وبواقـــع 30 مـــل لكل 10 غم كوالح وبحجم لقاح $10x1^6$ بوغ/مل من الوســـط وبدرجة حرارة 30 م.

المادة الأساس: حضر بإذابة 5 غم من الانيولين المختبـــري في 100 مل من محـــول الخـــلات الـــداري وبتركيـــز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 6.

قياس الفعالية:

اســـتخدم الحـــامض 3,5- ثنـــائي نايتروسالســـيلك 3,5 dinitrodalicylic acid (DNSA) وحســـب الطريقـــة الموصـــوفة فـــي (19).لتقـــدير الســـكريات الاحاديـــة (الفركتوز)الناتج عن التحلل الانزيمي وذلك باضافة 0.1 مـــل من المستخلص الانزيمي الى 0.9 مل من المادة الأساس ذي الرقم الهيدروجيني 6 ، وبدرجـــة حـــرارة 45 م° وأســـتمر التفاعل 10 دقائق ثم اضيف (DNSA) 1 مـــل ووضـــعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق ثم بردت مباشرة وأضيف لها 10 مل ماء مقطر وقيست الامتصاصـــية علـــى طول موجي 540 نانوميتر وبـــالرجوع للمنحنـــى القياســـي للفركتوز الذي اعد لهذا الغرض تـــم اســـتخراج الســـكريات المختزلة المتحررة من قبل الانزيم بتحليـــل المـــادة الأســـاس (الانيولين).

عرفت وحدة الفعالية : بأنها كمية الانزيم التي تحـــرر 1 مايكرومول من السكريات المختزلة من الانيولين في دقيقة واحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير البروتين: أتبعت طريقة Bradford (6) فـــي تقدير البروتين وباستخدام محلول البـــومين المصـــل البقـــري

Bovine serum albumin BSA في أعداد المنحنى القياسي وقدرت تراكيز البروتين في النماذج بنقل 0.1 مل من المحلول الانزيمي الى 1 مل من كاشف البروتين (صبغة الكوماسي الزرقاء) ومزجت وتركت 5 دقائق بحرارة 25 م° وقيس الامتصاصية على 595 نانوميتر وقدر تركيز البروتين بالرجوع الى المنحنى القياسي.

أعداد مسحوق الألمازة: اتبعت الطريقة المذكورة (3) في تجفيف درنات الالمازة ومن ثم طحنها لتتحول الى مسحوق الألمازة.

استخلاص الانزيم :

استخلص الانزيم من وسط التنمية بعد انتهاء مدة التخمر المحددة باضافة 60 مل من دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 6، ومزجت المحتويات مع التحريك لمدة 15 دقيقة باستخدام المحرك المغناطيسي. ورشح بعدها المحلول بمنظومة ترشيح معقمة (خلال القطن) اعقبتها خطوة ترشيح باستعمال ورقة ترشيح Whatman No. 1 معقمة وتحت التفريغ ثم تتبع ذلك عملية نبذ مركزي وبسرعة 3000xg لمدة 10 دقائق. أخذ الراشح الذي عد المستخلص الأنزيمي الخام لتقدير حجمه وفعالية الانزيم وتركيز البروتين.

تعيين الظروف المثلى لانتاج الانيولينيز:

تحديد المصدر الكاربوني: اجريت هذه التجربة بطريقة مشابهة لما مذكور في طريقة التنمية واختبر تأثير مصادر كاربون مختلفة في الانتاج تمثلت بالكلوكوز والسكروز والانيولين المختبري ومسحوق الالمازة المجففة وكلها أضيفت بتركيز 3% عدا مسحوق الالمازة الذي تقدر نسبة الانيولين فية 50% لذى أضيف بتركيز 6% وذلك كي تكون نسبة الانيولين في المسحوق مقاربة لـ 3% من الوسط.

تحديد المصدر النتروجيني:

استخدمت أربع مصادر للنتروجين تمثلت بنترات الصوديوم والبيتون وخلاصة الخميرة ونترات الصوديوم بنسبة 1:1 وأضيفت المصادر المذكورة بتركيز 0.2% الى الوسط مع تحديد مصدر الكاربون بمسحوق الالمازة .

تحديد الرقم الهيدروجيني:

حضر الوسط الغذائي بارقام هيدروجينية تراوحت 9- 4 وبفارق درجة واحدة لتحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لانتاج الانزيم مع مراعات نتائج الخطوات السابقة .

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

حضن وسط الانتاج بدرجات حرارة مختلفة تراوحت 20-40 وبفارق 5 درجات حرارية لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيممع الاخذ بعين الاعتبار الظروف المثلى التي تم التوصل اليها من التجارب السابقة .

تحديد زمن التخمر الامثل لانتاج الانزيم:

تمت متابعة انتاج الانزيم في مدد زمنية مختلفة تراوحت بين (72-192) ساعة بفارق 24 ساعة وتحت الظروف المثى للانتاج من التجارب السابقة .

النتائج والمناقشة:

العزلة والغربلة:

بعد إجراء عملية العزل والغربلة تبين أن العزلة التي رمز لها J3 كانت اكفأ تلك العزلات حيث كانت الفعالية والفعالية النوعية للانزيم المنتج 4.18 و 42.65 على التوالي وكما موضح في الجدول. عليه اختيرت هذه العزلة لإكمال البحث.

تشخيص العزلة:

شخصت العزلة وفق المفاتيح التصنيفية المعتمدة (16) والتي تشير الى أن العزلة هي *Aspergillus niger*.

جدول1 غربلة عزلات المختلفة على اساس انتاجيتها من انزيم الانيولينيز بتقدير المستخلص الانزيمي الخام في وسط التنمية .

رمز العزلة	حجم الانتاج	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغ/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)
J_1	27.2	2.81	0.091	30.87
J_2	28.0	3.29	0.101	32.57
J_3	27.8	4.18	0.098	42.65
J_4	26.7	2.11	0.171	12.280

تحديد المصدر الكاربوني الأمثل للانتاج:

وجد أن أفضل مصدر كاربوني لتنمية العزلة *Aspergillus niger* لانتاج انزيم الانيولينيز هو مسحوق درنات الالمازة مقارنة بالكلوكوز والسكروز والانيولين المختبري وكما موضح في شكل 1 . حيث بلغت الفعالية والفعالية النوعية 4.91 وحدة/مل و 51.68 وحدة/ملغ على التوالي يليه الانيولين التجاري ثم السكروز وأخيراً الكلوكوز ويمكن الاستنتاج من هذه التجربة أن الانزيم من النوع المستحث ويتحفز انتاجه بفعل الأنيولين بالدرجة الأساس كما أن مسحوق الالمازة أعطى أعلى نسبة للانزيم مقارنة مع الانيولين التجاري وذلك لاحتوائه على مواد مدعمة لنمو العفن كالمعادن وغيرها الضرورية للنمو.

وهذا يتفق مع ما وجده Cruz (7) حيث استخدم مصادر كاربون متعددة تمثلت بالفركتوز والكلوكوز والسكروز والانيولين المستخلص من البطاطا الحلوة ومستخلص نبات الهندباء والمولاس لانتاج الانيولينيز من *Aspergillus niger* ، فوجد أن أعلى انتاجية للانزيم على اساس الفعالية تحقق باستخدام مستخلص الهندباء وأقلها انتاجية باستخدام مستخلص البطاطا الحلوة.

بينما أشار Kochhar (9) الى استخدام الانيولين وبنسبة 2% لانتاج الانيولينيز من *A. candidus* في حين وجد (13) ان افضل مصدر للكاربون لانتاج الانزيم من *Rhizopus sp,* هو الانيولين المستخلص من نبات الاضالية مقارنة بالمصادر الأخرى والمتضمنة الكلوكوز، الفركتوز، الكزاليوز، اللاكتوز، الارابينوز، الرافينوز، والكالكتوز، السكروز، الدكستران والنشأ. كذلك وجد (15) أن الانيولين افضل من السكروز في حث *Pencillium janczewskii* لانتاج الانيولينيز كما استخدم (18) الانيولين كمصدر للكاربون لانتاج الانزيم من *Saccharomyces fragilis*.

بينما استخدم Luciana (10) السكروز كمصدر للكاربون في انتاج الانزيم من *K. marxianus* وأدخل الباحث (4) تفل القصب (بقايا انتاج السكروز من القصب) كمصدر الكاربون لانتاج الانزيم من *A. awamori*.

تحديد مصدر النتروجين الأمثل لانتاج الانزيم:

اختيرت عدد من المصادر العضوية واللاعضوية ومزيجهما لدرسة تأثيرها على انتاج الانيولينيز من العزلة قيد الدراسة وأضيفت جميع المصادر بتركيز 0.5% فوجد أن أفضل تلك المصادر يتمثل بمزيج خلاصة الخميرة ونترات الصوديوم إذ بلغت الفعالية والفعالية النوعية 5.61 واحدة/مل و 57.24 وحدة/ملغم على التوالي الشكل (2).

تلاه نترات الصوديوم ثم خلاصة الخميرة وأخيراً الببتون ويعزى تفوق الانتاج بهذا المزيج الى أن الأول يعد مصدر للنتروجين فضلاً عن كونه مصدر للفيتامينات (B- B complex) والتي تعد ضرورية لنمو الأحياء المجهرية فضلاً عن كونها عوامل مرافقة Co-factor للعديد من الانزيمات المهمة في مسارات التخليق الحيوي. أما الثاني فيحفز تكوين متطلبات النمو من هذه العوامل حسب حاجة العفن وتختلف الدراسات في تحديد أفضلية المصدر النتروجيني للأحياء المجهرية فقد استخدم (9) مزيج من نترات الصوديوم وفوسفات الامونيوم كمصدر للنتروجين لانتاج الانزيم من *A. candidus* . بينما أدخل (12) نقيع الذرة كمصدر للنتروجين لانتاج الاينولينيز *K. malyxianus* فيما درس (7) تأثير مصادر نتروجين متعددة لانتاج الانزيم من *A. niger* تمثلت أمونيوم فوسفيت والكازيين وطحين فول

الصويا ومستخلص الخميرة واليوريا ومزيج البيتون والكازيين فوجد أن استخدام الكازيين قد أعطى أعلى فعالية بينما انعدمت فعالية الانيولين باستخدام اليوريا واستخدم (11) خليط من نترات الامونيوم وفوسفات الأمونيوم وخلاصة الخميرة كمصدر للنتروجين لانتاج الانيولينيز من *A. niveus*.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم:

أعطت العزلة قيد الدراسة أعلى انتاجية للانزيم على اساس الفعالية والفعالية النوعية للانزيم عند الرقم الهيدروجيني 5 حيث بلغت 5.79 وحدة/مل و 63.62 وحدة/ملغم على التوالي. وأنخفض انتاج الانزيم تدريجياً وبكلا الاتجاهين عن الرقم 5 الشكل (3).

ويعد تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الانتاج عاملاً مهماً لانتاج الانزيمات الميكروبية وفي فعالية هذه الانزيمات لكونها تتأثر بشكل مباشر بتركيز أيونات الهيدروجين لوسط الانتاج ووسط التفاعل والنتائج التي تم التوصل اليها مقاربة لما استخدمه (13) حيث كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 4.8 لانتاج الانيولينيز من عفن *Rhizopus sp*.

بينما كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الذي استخدمة للباحث (11) هو 5.5 لانتاج الانزيم من *A. niveus*.أنتج (10) انزيم الانيولينيز من الخميرة *K. mayxianus* باستخدام الرقم الهيدروجيني ابتدائي 5.

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

كانت الحرارة المثلى لحضن العزلة *A. niger* J_3 30 م° (وهي نفسها التي اعتمدت منذ بداية البحث) حيث بلغت الفعالية والفعالية النوعية 5.81 وحدة/مل و 62.47 وحدة/ملغم على الترتيب وأنخفضت فعالية الانزيم في درجات الحرارة الأخرى (الشكل 4).

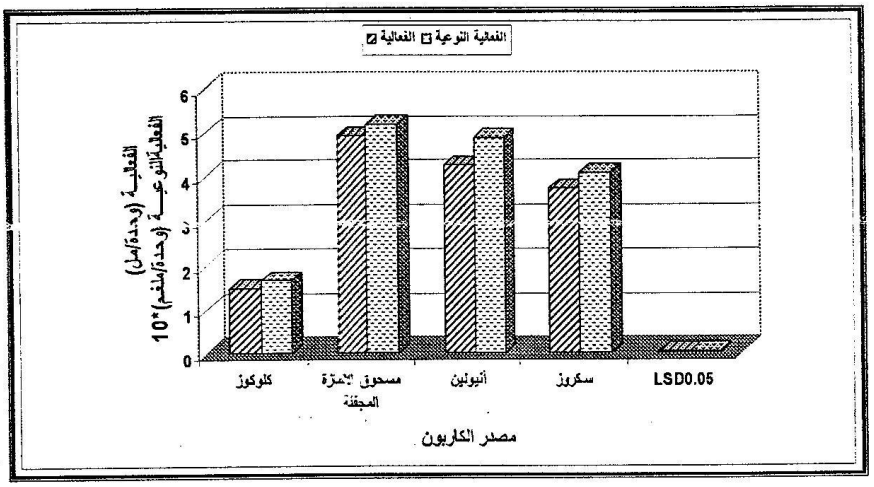
واعتمدت درجة الحرارة 30 من قبل Ohta (13) لانتاج الانيولينيز من *Rhizopus sp* وكذلك (18) استخدم نفس درجة الحرارة 30 م° لانتاج الانزيم من *S. fragilis* بينما كانت درجة حرارة الحضن 32 م° لدى Aynd (4) عندما انتج الانيولينيز من *A. awamori*.

فيما استخدم Cruz (7) درجة حرارة 28 م° لانتاج الانيولينيز من *A. niger* كذلك استخدم نفس الدرجة هذه الباحث (11) لانتاج نفس الانزيم من *A. niveus*.

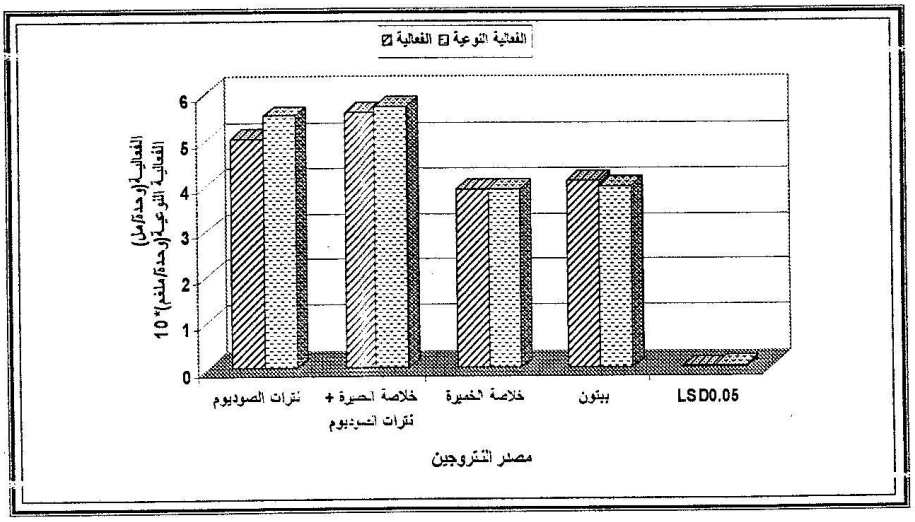
وعادة تترك درجات الحرارة أثرا بارزا في تحديد نشاط وفعالية الأحياء المجهرية المختلفة لما لها من تأثير على كل من معدل النمو والأيض والتركيب الفراغي للمركبات العضوية والمتطلبات التغذوية والصفات الفسلجية للعديد من الأحياء المجهرية.

تحديد زمن التخمر الأمثل لإنتاج الإنزيم:

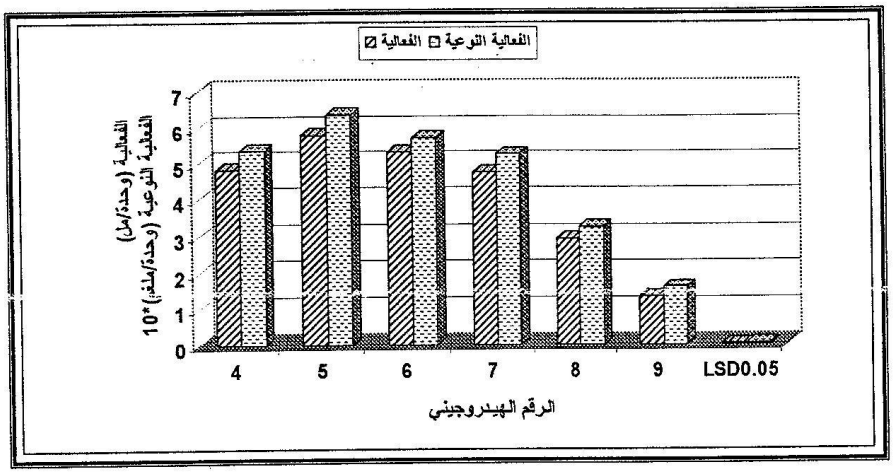
تمت متابعة انتاج انزيم الانيولينيز بفترات مختلفة ولوحظ زيادة الفعالية والفعالية النوعية للانزيم المنتج من العزلة قيد الدراسة حتى الساعة 168 إذ بلغت 5.78 وحدة/مل و 62.82 وحدة/ملغم وانخفضت الفعالية والفعالية النوعية بعد هذه المدة شكل 5 عليه أعتبرت المدة 168 ساعة هي المدة المثلى لانتاج الانزيم وقد أختار الباحثون مدد زمنية مختلفة للحضن فقد استخدم (18) مدة 48 ساعة لانتاج الانيولينيز من *S. fragilis* . بينما كانت مدة الحضن 72 لانتاج الانزيم من *K. mayxianus* (10) . فيما أشار Aynd (4) الى ان مدة الحضن المثلى هي 96 ساعة لانتاج الانزيم من *A. awamori*. أنتج Kochhar (9) الانيولينيز من مصادر مختلفة ووجد أن افضل مدة لانتاج الانزيم من *A. oryzae* هي 144 ساعة ومن (*A. candidus* و *A. chevalieri* و *Fusarium moniliforme*) هي 216 ساعة ومن (*Mucor rouxii* و *Penicillium funculosum*) هي 288 ساعة ومن (*A. terreus* و *Rhizopus oryzae*) هي 360 ساعة ويعد تحديد طور النمو Growth phase الذي يحصل فيه افضل انتاج للمواد الايضية بما في ذلك الانزيمات من العوامل المهمة وفيما يتعلق بالانيولينيز تشير الدراسات الى أن انتاجيتها القصوى تبلغ عند الطور اللوغارتيمي (7 و 11).



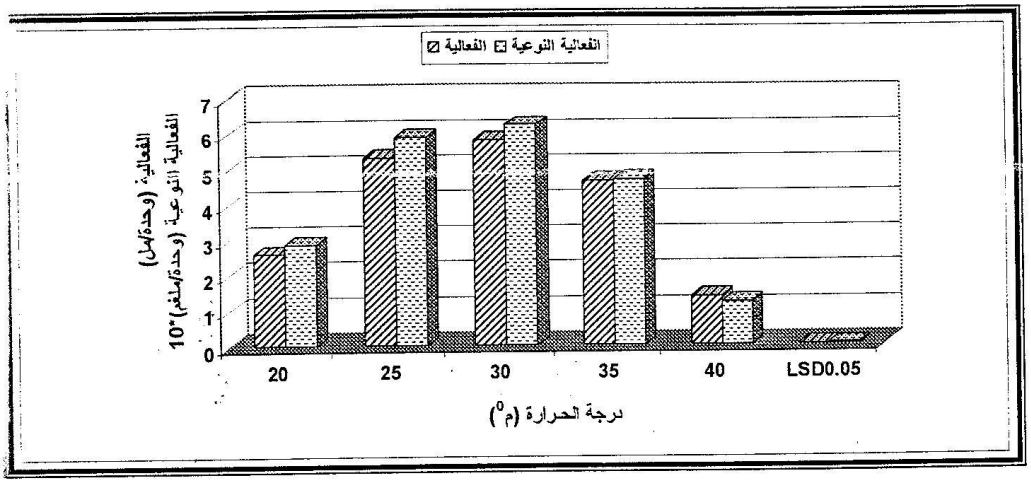
شكل 1. تأثير نوع مصدر الكاربون في انتاج انزيم الانيولينيز من العفن J_3 *Aspergillus niger*.



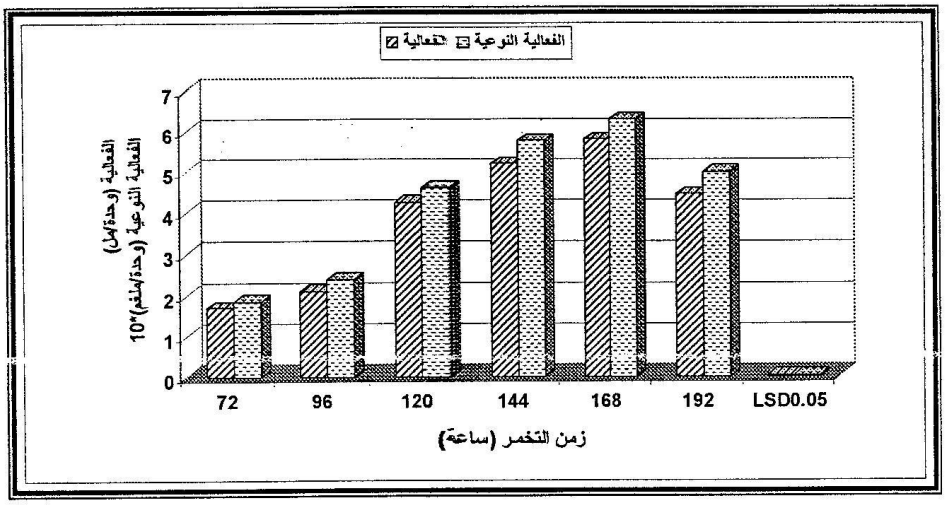
شكل2. تأثير مصدر النتروجين في انتاج انزيم الانيولينيز من العفن J_3 *Aspergillus niger*.



شكل3: تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم الانيولينيز من *Aspergillus niger* J_3.



شكل4. تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيم الانيولينيز من العفن *Aspergillus niger* J_3.



شكل5. تأثير زمن التخمر في انتاج انزيم الانيولينيز من العفن J_3 *Aspergillus niger* .

المصـــــادر

1 الدلالي، باسل كامل. 1963. فهم الانزيمات. مطابع جامعة الموصل. جامعة الموصل.

2 - محي الدين ، محمد عمر ونـزار أدور ناصـر . 1991. التطبيقات الصناعيه لعلـم الأحيـاء المجهريـة . ترجمة مطابع وزارة التعليم العالي والبحـث العلمـي . جامعة صلاح الدين. ص:94 .

3 - الشرفاني، مصطفى عبد المحسن. 2006. استعمال الانيولين المستخلص من درنات الالمازة في تقليل مسـتوى كولسترول الدم وتحسين امتصـاص العناصـر الغذائيـة وكمحفز أولي. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعـة بغداد.ص:32 .

4 - Aynd, M. and A. .Goluber. 2002. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. Biochem. J. 362: 131-135.

5 - Balasundaram, B. and A.B . Pardit,. 2001. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. Biochem. Engin. 8: 251-256.

6 - Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein dye binding. Analytical Bioch. 72: 248-254.

7 - Cruz, D.V.; J.G. Belote. and M.Z Beiline. 1998. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: hydrolysis of inulin from several sources. Rev. Micro. 29 n4: 3714-3734.

8 - Ferreita, M.S.; A. Andrade. and J. Kennedy. 1991. Properties of a thermostable nonspecific fructofulanosidase produced by *Clodosporium cladosporioides* cell for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract. Appl. Bio. Biot. 31(1): 1-9 (Abstract).

9 - Kochhar, A. and A.. Gupta 1999. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. J. Sci. Food. Agric. 79: 549-554.

10- Luciana, M.; R. Monti. and J. Contiero. 2008. Effect of conditioning on the production of inulinase by *Kluyreromyces marxianus var. bulgaricus* through fed-batch fermentation. J. Food. Engi. 4: (Abstract).

11- Maria, C. and M Auxiliadora. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128 URM: New Source for inulinase production. Braz. Arc. Bio. Tech. 48: 343-350.

12- Mazutti, M.; P. Bender. and H Treichel. 2007. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugar cane bagasseas substrate. Curr Opinmicro. 6: 315-319.

13- Ohta, K.; N Suetsugu.; and T. Nakamura. 2002. Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus sp* strain TN-96. J. Bios. Bioen. 94(1): 78-80.

14- Parekh, S.R. and A Margaritis. 1986. Continuous hydrolysis of fructans in Jerusalem artichoke extracts using immobilized nonviable cell of *Kluyveromyces marxianus*. J of Food. Science. 51(3): 854-855 (Abstract).

15- Pessoni, R.A. 2007. Purification and properties of exinulinase from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. Mycologia. Vol. 99: 493-503 (Abstract). Phytochem. 61(6): 605-608.

16- Pitt, J.I. and A.D Hocking. 1997. Fungi And Food Spoilage. Blackie Academic Professional.

17- Sarup, S.R.; R. Dhaliwal. and M. Puri. 2007 Partial purification and characterization of exoinulnase from *Kluyveromyces marxinaus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. J. Micro. Bio. 17(5): 731-738.

18- Snyder, H.E. and H.J. Phaff. 1962. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. J. Biol. Chem. 237: 2438-2441.

19- Whitaker, J.R. 1972. Principles Of Enzymology For The Food Science. Mercel Dekker. Inc. New York. USA.

20- Zambeian, K. and J. Nowak. 2006. Acid and enzymatic hydrolysis of Jerusalem artichoke tubers further ethanol production. EJPAU 9(4).

21- Zhang, L.; C Zhao. and Y. Wang. 2004. Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. Protein. Expr. Purif. 35: 272-278 (Abstract).