المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (7) العدد (2)
لسنة 2015

دراسة الظروف المثلى لانتاج الانيولينيز من عزلة محلية من الخميرة AY2 *Kluyveromyces marxianus*

محمد عمر محي الدين جاسم محمد عودة*
كلية الزراعة/ جامعة بغداد

تأريخ استلام البحث: 2015/5/31 تأريخ قبول النشر: 2015/10/4

الخلاصة

درست الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الأنيولينيز من الخميرة AY2 *Kluyveromyces marxianus* بطريقة المزارع المغمورة وكانت افضل الظروف متمثلة باستعمال الانيولين مصدراً للكاربون بتركيز 2% ومزيج من خلاصة الخميرة وكبريتات الأمونيوم بنسبة (1:1) وبتركيز 1% مصدراً للنتروجين وبرقم هيدروجيني إبتدائي 5.5 ومدة حضن 42 ساعة بدرجة حرارة 30 م إذ بلغت فعالية الأنزيم 3.81 وحدة/مل و8.65 وحدة/ ملغم بدلالية الفعالية والفعالية النوعية على التوالي.

الكلمات المفتاحية: انيولينيز، أنزيم، انيولين.

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (7) العدد (2)
لسنة 2015

Study the optimum conditions for production of inulunase from isolate *Kluyveromyces marxianus* AY2.

Mohammed O. Muhya alddin **Jasm M. Awda**
college of agriculture/ university of Baghdad

Abstract

Results showed that the optimum conditions for production of inulunase from isolate *Kluyveromyces marxianus* AY2 by submerged culture could be achieved by using inulin as carbon source at a concentration of 2% with mixture of yeast extract and ammonium sulphate in a ratio of 1:1 in a concentration of 1% at initial pH 5.5 after incubation for 42 hours at 30°C.

Key word : enzyme, inulinase, inulin.

المقدمة

يعد انزيم الانيولينيز الداخلي β-D-fructan fructanohydrolase :E.C 3.2.1.7 من الانزيمات المهمة في الصناعات الغذائية والدوائية لقابليته في تحليل الانيولين الى شراب ذو حلاوة عالية (95% فرئتوز و 5% كلوكوز) (17)، ويتواجد الانيولين في العديد من النباتات مثل البطاطا الحلوة والهندباء والالمازة *Jerusalem artichoke* والتي تتميز بمحتواها العالي من الانيولين بحدود 10% (20)، ويتميز الانيولين بانه بوليمر من عدد من وحدات الفرئتوز (2-60) وحدة وفي نهاية السلسلة وحدة كلوكوز طرفية. يقوم الانيولينيز الداخلي بكسر الاواصر الداخلية (1-2) β للانيولين ومن مواقع محتلفة للجزئة وكذلك يحلل الأصرة الكلايكوسيدية (6 - 2)β لذلك فإن لهذا الأنزيم القدرة على تحليل الليفان Levan والسكروز والرافينوز كذلك الميليزايتوز Melezitose والجنتيانوز Gentianose والستايكيوز Stachyose كما يتميز الانيولينيز بامتلاكه أقصى فعالية عند درجات حرارة عالية نسبياً، وبثباته الحراري العالي. وهاتان الصفتان هما معياران مهمان لتقرر ملائمة هذا النوع من الأنزيمات في التطبيقات الغذائية، وغالبا ما تتأثر الأنزيمات بدرجات الحرارة المتوسطة إذ يتغير شكلها الفراغي وبالتالي تقل فعاليتها مما يتطلب اضافة كميات اخرى، لذلك يفضل المختصون في مختلف الصناعات التي يدخل في عملها الأنزيمات أن تكون ذات ثبات حراري عالي(18). لذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى تحديد الظروف المثلى لانتاج أنزيم الأنيولينيز من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

المواد وطرق العمل

إنتاج الأنزيم:

استعملت طريقة المزارع المغمورة لإنتاج الأنزيم، إذ لقحت دوارق زجاجية سعة 300 مل حاوية على 100 مل من الوسط Inulin yeast extract- Peptone broth IYP والذي حضر بإذابة 2 غم من الانيولين مع 5 غم من خلاصة الخميرة و5 غم من الببتون في 1000 مل من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 5 ثم عقم بالمؤصدة. لقح بخلايا الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2 10^6 خلية/ مل من الوسط، وحضنت في

حاضنة هزازة بدرجة حرارة 30 م مدة 24 ساعة وبسرعة 150 دورة/ دقيقة. ثم فصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد على سرعة 4000×g مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4م. وأهمل الراسب وعُدّ الراشح المستخلص الخام للأنزيم.

محلول المادة الأساس:

حضر هذا المحلول بتركيز 3% بإذابة 3 غم من الانيولين في كمية قليلة من محلول دارئ الخلات برقم هدروجيني 5 وبتركيز 0.2 مولاري في دورق حجمي سعة 100 مل وأكمل الحجم إلى العلامة بالمحلول الدارئ نفسه، واستعمل مادة أساس لتقديرالفعالية.

تقدير فعالية الإنزيم:

أتبعت الطريقة المذكورة من (20) في تقدير فعالية الأنزيم بطريقة كاشف حامض 5,3 ثنائي نايترو سالسيلك (DNSA) إذ أضيف 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي إلى 0.9 مل من محلول المادة الأساس في حمام مائي بحرارة 30 م وأستمر التفاعل مدة 10 دقائق، بعد ذلك أضيف 1 مل من (DNSA) ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي مدة 10 دقائق. بردت مباشرة بالماء. أضيف 10 مل الماء المقطر وقيست الامتصاصية على 540 نانو وبالرجوع إلى المنحنى القياسي للفركتوز تم أستخراج السكريات المختزلة والمتحررة بفعل الأنزيم على المادة الأساس (الانيولين) ومنها تم تقدير فعالية الإنزيم:

عرفت وحدة الفعالية (Unit): بأنها كمية الإنزيم التي تحرر 1 مايكرومول من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير تركيز البروتين: أتبعت طريقة (2) في تقدير البروتين وباستعمال محلول ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin) ومحلول الصبغة (G–250 brilliant blue Commassie) في اعداد المنحى القياسي وقدرت تركيز البروتين في النماذج بنقل 0.1 مل من المحلول الأنزيمي إلى 1 مل من الصبغة ومزجت جيدا وتركت 5 دقائق بحرارة الغرفة وقيست الإمتصاصية على 595 نانو. قدر تركيز البروتين إعتمادا على المنحنى القياسي الذي تم إعداده كما في الفقرة المذكورة آنفاً. أما محلول الكفء (السيطرة) فحضر بالخطوات نفسها، بإستثناء استعمال الماء المقطر بدلا من المحلول الأنزيمي.

تحديد مصدر الكاربون الأمثل لانتاج الأنزيم:

أختبر تأثير سكريات مختلفة في الإنتاج وذلك باستبدال مصدر الكاربون في الوسط IYP بالمصادر الآتية: الفركتوز والسكروز والانيولين والكلوكوز وخلاصة الالمازة بتركيز 2%.

تحضير خلاصة الألمازة:

تم الحصول على درنات الالمازة من الأسواق المحلية ونظفت جيداً، ثم قطعت 100 غرام منه الى قطع صغيرة، وهرست في خلاط كهربائي مع 100 مل من الماء المقطر المعقم على سرعة متوسطة لمدة 10 دقائق، ورشحت وجففت بوساطة المبخر الدوار بدرجة حرارة 70 م وحفظ المسحوق الناتج في الثلاجة لحين الإستعمال وبتركيز 2% (19).

تحديد مصدر النتروجين الأمثل لانتاج الأنزيم:

لتحديد مصدر النتروجين الأمثل لإنتاج الأنزيم أستبدل مصدر النتروجين في وسط الإنتاج IYP بمصادر نتروجينية عضوية شملت الببتون وخلاصة الخميرة ومصادر لاعضوية شملت فوسفات الأمونيوم الثنائي وكبريتات الأمونيوم، ومزيج من خلاصة الخميرة وكبريتات الأمونيوم، ومزيج من خلاصة الخمير والببتون وبنسبة (1:1) هذا وقد أضيفت المصادر المذكورة بتركيز 1% إلى الوسط.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم:

استعمل الوسط السائل المؤلف من الانيولين بتركيز 2% و(خلاصة الخميرة وكبريتات الأمونيوم) بنسبة (1:1) وبتركيز 1% وسطا للإنتاج في هذه التجربة، والتجارب اللاحقة، بناءً على نتائج تحديد مصدر الكاربون والنتروجين المذكورة آنفا، إذ حضر الوسط بأرقام هيدروجينية تراوحت بين 3-7.5 (وذلك باستعمال NaOH بتركيز 0.1 مولار والحامض HCl بتركيز 0.1 مولار لتعديل الرقم الهيدروجيني) بفارق نصف درجة من وسط لآخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم.

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم:

حضن وسط الإنتاج الملقح بخلايا الخميرة بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20-45م بفارق 5 درجات حرارية من وسط لآخر مدة 24 ساعة لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم.

تحديد زمن التخمر (مدة الحضن) الأمثل لإنتاج الأنزيم:

تمت متابعة إنتاج الأنزيم في مدد زمنية مختلفة تراوحت بين (18–60) ساعة بفارق 6 ساعات وبدرجة حرارة 30م.

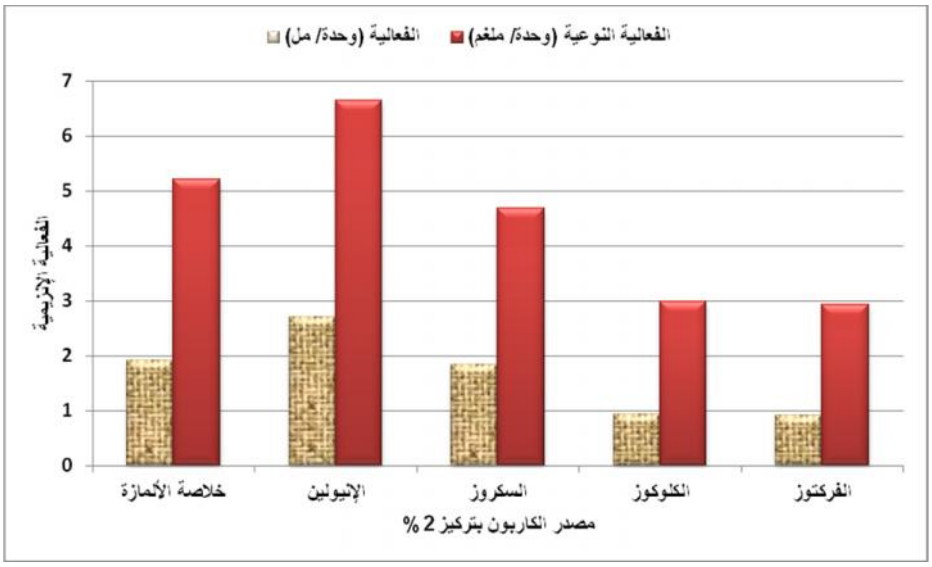
النتائج والمناقشة

تعيين الظروف المثلى لانتاج أنزيم الانيولينيز:

تحديد مصدر الكاربون الأمثل لانتاج الأنزيم:

استعملت خمسة مصادر للكاربون في تنمية خميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2 ودرس تأثيرها في إنتاج الأنزيم تمثلت بالسكروز والكلوكوز والانيولين وخلاصة الالمازة والفرئتوز والتي أضيفت للوسط بتركيز 2% فوجد أن أفضل تلك المصادر هو الانيولين إذ كانت فعالية الأنزيم وفعاليته النوعية 2.70 وحدة/ مل و 6.64 وحدة / ملغم على التوالي (الشكل، 1) يليه خلاصة الالمازة ثم السكروز ثم الكلوكوز وأخيراً الفرئتوز ويمكن الاستنتاج من هذه التجربة أن أنزيم الانيولينيز من النوع المستحث ويتحفز إنتاجه بفعل الانيولين بالدرجة الأساس .وهذه النتيجة تتطابق مع ما وجده (9) الذي قارن إنتاج الانيولينيز من *Kluyveromyces marxianusYX01* بتأثير ثلاثة مصادر للكاربون وهي الكلوكوز والفرئتوز والانيولين وبنسبة 1% فكانت الفعالية 4.3 و4.5 و 6. 6 وحدة/مل على التوالي. في حين درس (7) تأثير 14 مصدراً كاربونياً في إنتاج الانيولينيز من *Penicillum citrinum* فوجد أن مستخلص نبات الاضاليا قد أعطى إنتاجية من الأنزيم بفعالية بلغت 23.9 وحدة/ مل بينما أعطى المالتوز أدني فعالية إذ بلغت 7.1 وحدة/ مل. فيما وجد (12) أن أفضل مصدر للكاربون لإنتاج الانيولينيز من *Streptomyces sp* هو خلاصة الالمازة إذ بلغت الفعالية 0.89 وحدة/ مل بينما كانت الفعالية 0.04 وحدة/ مل عند استعمال السكروز مصدراً للكاربون ودرس (16) تأثير عدد من المصادرالكاربونية وبتركيز 1% في فعالية ألأنيولينيز المنتج من *Aspergillus tamari* تمثلت بالكلوكوز والفرئتوز والمالتوز والسكروز والرافينوز والنشأ والأنيولين ومستخلص الالمازة ومستخلص نبات الديالا ومستخلص الهندباء ومخلفات عصير البرتقال والمولاس فوجد أن مستخلص نبات الديالا أفضل تلك

المصادر بدلالة الفعالية الأنزمية التي بلغت 26.5 وحدة/ مل في حين أن اقل فعالية أنزمية كانت باستعمال المالتوز 7.66 وحدة/ مل.



شكل (1): تأثير مصدر الكاربون في إنتاج أنزم الأنيولينيز من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

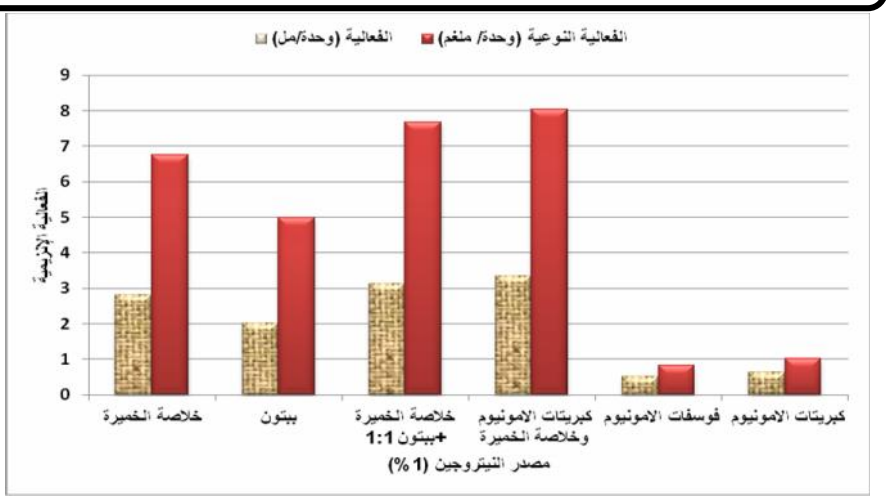
مصدر النتروجين الأمثل لإنتاج الأنزيم:

أختير عدد من المصادر العضوية وأخرى غير عضوية ومزجهما لدراسة تأثيرها على إنتاج أنزم الانيولينيز من الخميرة قيد الدراسة وشملت خلاصة الخميرة والببتون بوصفهما مصادر عضوية، وفوسفات الأمونيوم الثنائية وكبرتات الأمونيوم بوصفهما مصادر لاعضوية، ومزج خلاصة الخميرة وكبرتات الأمونيوم بنسبة 1:1 ومزج خلاصة الخميرة والببتون بنسبة 1:1. اضيفت هذه المصادر بتركيز 1% إلى وسط الإنتاج الحاوي على 2% انيولين (الشكل، 2) فوجد أن أفضل تلك المصادر يتمثل بمزج خلاصة الخميرة وكبرتات الأمونيوم إذ بلغت الفعالية والفعالية النوعية 3.13 وحدة/ مل و 7.97 وحدة/ ملغم على التوالي، تلاه مزج الببتون وخلاصة الخميرة ثم خلاصة الخميرة والببتون كلاً على إنفراد. أما

المصادر غير العضوية فقد تبين مما تتحقق من إنتاجية الأنزيم بوجودها في الوسط كمصدراً للنتروجين كانت متدنية مقارنة بالمصادر العضوية.

وبناء على هذه النتائج استعمل مزيج خلاصة الخميرة وكبريتات الأمونيوم وبنسبة 1:1 وبتركيز 1% في المراحل اللاحقة من تعيين الظروف المثلى ولأنتاج الأنزيم ولعل تفوق الإنتاجية بهذا المزيج يعزى إلى أن الأول يعد مصدراً للنتروجين فضلا عن كونه مصدراً لفيتامينات مجموعة B والتي تعد ضرورية لنمو الخميرة، فضلاً عن كونها عوامل مرافقة Co–Factors لعدد من الأنزيمات المهمة في مسارات التخليق الحيوي (4) أما الثاني فيحفز تكوين متطلبات النمو من هذه العوامل، وحسب حاجة الخميرة. وتختلف الدراسات في تحديد أفضل مصادر النتروجين للأحياء المجهرية المستخدمة باختلاف المصادر نفسها وباختلاف الاحياء المجهرية ايضا.

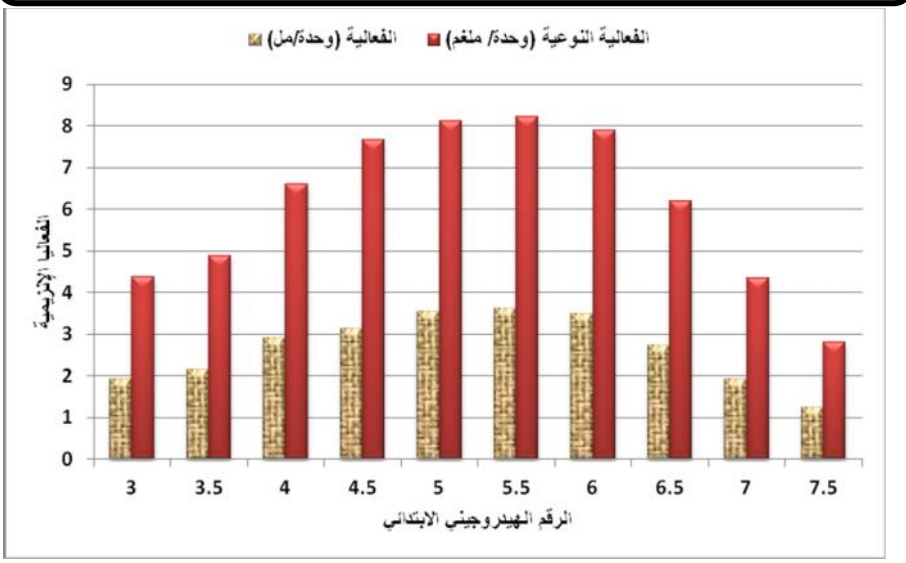
ويذكر في هذا الصدد أن (8) قد قارن بين سبعة مصادر للنتروجين وبنسبة 0.2% لإنتاج الأنزيم من *Ulocladium atrum* فوجد أن نترت الصوديوم يمثل أفضل تلك المصادر إذ أعطت فعالية بلغت 36.5 وحدة/ مل. بينما كانت الفعالية 4.72 وحدة/ مل باستعمال الببتون وبنفس النسبة، في حين لم يلاحظ أية فعالية للأنزيم في وسط الأنتاج الحاوي على اليوريا مصدراً وحيداً للنتروجين. وقارن (13) إنتاج الانيولينيزمن بكتريا *Bacillus cereus* باستعمال عدة مصادر نتروجينية فوجد أن أفضل تلك المصادر هو خلاصة الخميرة التي حققت انتاجية بفعالية مقدارها 96 وحدة/ مل في حين كانت الفعالية 82 و 81 و 74 و 53 وحدة/ مل باستعمال كلٍ من الببتون و خلاصة اللحم ومسحوق فول الصويا ونترات الصوديوم وعلى التوالي. فيما وجد (12) أن أفضل مصدر نتروجيني يمكن استعماله لإنتاج الانيولينيز من *Streptomyces sp* هو الترتون بفعالية بلغت 0.89 وحدة/ مل تليه نترات الصوديوم ومن ثم كبريتات الامونيوم، على أن إنتاجية الأنزيم كانت 0.19 وحدة/ مل باستعمال الببتون. قارن (10) بين ثمانية مصادر للنتروجين فوجد أن خلاصة الخميرة وبتركيز 2% قد اعطت أعلى إنتاجية من الانيولينيز من *Kluyveromyces marxianus*.



شكل (2): تأثير مصدر النتروجين في إنتاج أنزيم الانيولينيز من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج الأنزيم :

درس تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج الذي تراوح ما بين 3–7.5 بفارق نصف درجة من وسط لآخر على انتاج أنزيم الانيولينيز من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2. ويتضح من (الشكل، 3) أن زيادة فعالية الأنزيم وفعاليته النوعية في المستخلص الأنزيمي ازدادت بشكل تدرجي لغاية الرقم الهيدروجيني 5.5 اذ بلغت 3.65 وحدة/مل و8.12 وحدة/ملغم على التوالي ,لوحظ بعدها إنخفاض تدرجي واضح في الفعالية عند الرقم الهيدروجيني المتعادل والقريب من التعادل. ويعد تحديد الرقم الهيدروجيني الإبتدائي للوسط عاملاً مهما لإنتاج الأنزيمات الميكروبية وفي فعالية هذه الأنزيمات، لكونها تتأثر بشكل مباشر بتركيز أيونات الهيدروجين لوسط الإنتاج ومحلول التفاعل. وهذا مقارب لما حصل عليه (3) إذ وجد أن أفضل أنتاجية للانيولينيز من *Kluyveromyces marxianus* تتحقق عند الرقم الهيدروجيني الإبتدائي 5 بفعالية مقدارها 13.1 وحدة/ مل، بينما إنخفضت الفعالية الى 11.75 وحدة/ مل عند الرقم الهيدروجيني 6. وقد درس (7) تأثير الأرقام الهيدروجينية بين 4- 8 في إنتاج الانيولينيز من *Penicillum citrinum* فوجد أن الرقم الهيدروجيني 6 يعد الأفضل في الأنتاج بدلالة الفعالية التي بلغت 37.5 وحدة/ مل.



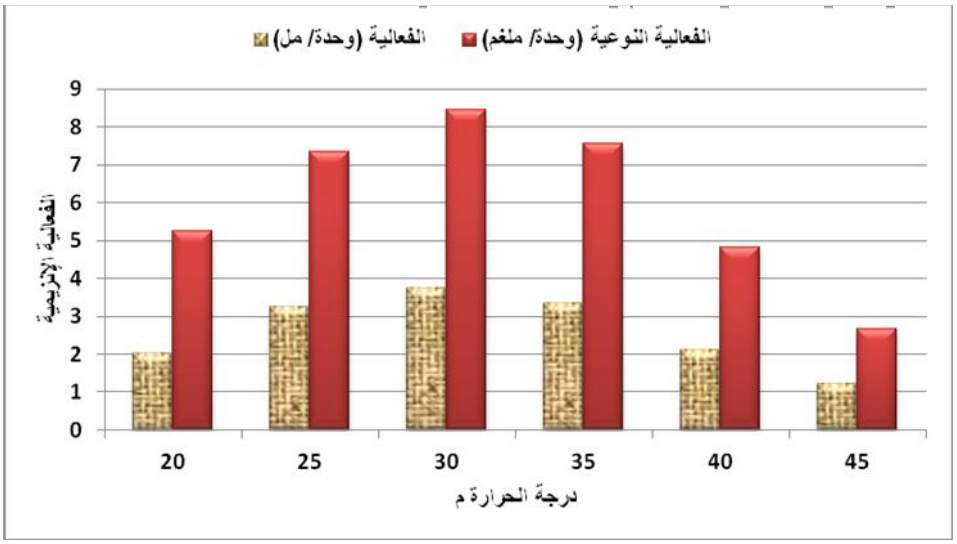
شكل (3): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج أنزيم الانيولينيز المنتج من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

ودرس (16) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج الانيولينيز من *Aspergillus tamari* تراوحت بين 4-8 وبفرق نصف درجة ووجد أن فعالية الانيولينيز تزداد بزيادة الرقم الهيدروجيني لتبلغ اقصاها عند الرقم الهيدروجيني 5.5 إذ بلغت 39.41 وحدة/ مل، إنخفضت الى 10.01 وحدة/ مل عند الرقم الهيدروجيني8 . في حين كان الرقم الهيدروجيني 8 هو الأمثل في إنتاج الانيولينيز من *Bacillus sp*، شهدت الأنتاجية إنخفاضاً بمقدار 58% عند تنمية البكتريا في الرقم الهيدروجيني 6.5 (17) .

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الأنزيم:

تراوحت درجات الحرارة التي درس تأثيرها في إنتاج الأنزيم بين 20-45 م فتبين أن درجة الحرارة المثلى للإنتاج تبلغ 30 م (الشكل، 4) وهي درجة الحرارة نفسها التي أعتمدت منذ بداية دراسة تعيين الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الانيولينيز، إذ بلغت الفعالية والفعالية النوعية 3.62 وحدة/ مل و 8.301 وحدة/ ملغم على التوالي، بينما كانت الإنتاجية في درجة الحرارة 25 م بدلالة الفعالية والفعالية النوعية 3.10 وحدة/ مل و 7.19 وحدة/ ملغم. وهذه النتيجة مقاربة لما توصل الية (1) الذي درس تاثير درجة حرارة الحضن في إنتاج أنزيم

الانيولينيز من *Kluyveromyces marxianus* إذ اختار درجات الحرارة ما بين (25-35) م ووجد أن أفضل درجة الحرارة للأنتاج هي 27 م و بفعالية بلغت 36.8 وحدة/ مل. بينما وجد (11) أن درجة الحرارة 36 م هي المثلى لإنتاج الانيولينيز من *Kluyveromyces* sp. كما وجد (12) أن أفضل درجة حرارة لإنتاج الانيولينيز من *Streptomyces sp* بلغت 30م إذ بلغت الفعالية 1.62 وحدة/ مل بينما كانت الفعالية 0.8 وحدة/ مل عند الدرجة الحرارة 25م. وعادة تترك درجات الحرارة أثراً بارزا في تحديد نشاط وفعالية الأحياء المجهرية المختلفة لما لها من تأثير في كل من معدل النمو والايض والترئيب الكيميائي والمتطلبات التغذوية ومتطلبات البقاء والفعاليات الأنزيمية والصفات الفسلجية لعدد من الخمائر (11).

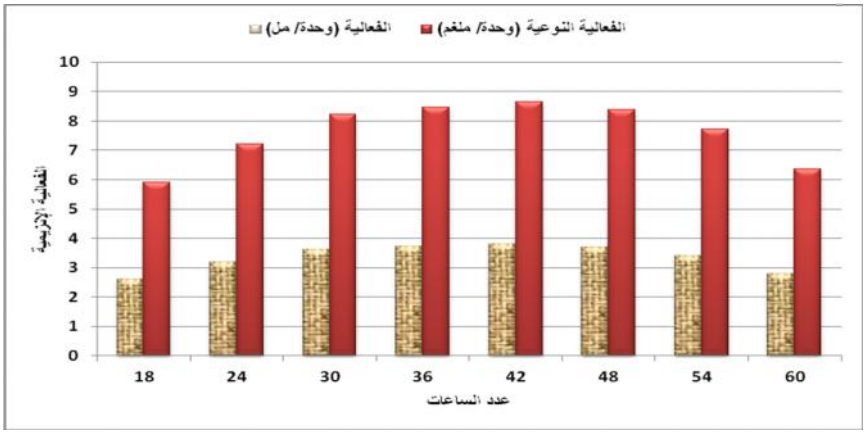


شكل (4): تأثير درجة الحرارة في إنتاج أنزيم الانيولينيز المنتج من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

تحديد زمن التخمير الأمثل لانتاج الأنزيم:

تمت متابعة إنتاج أنزيم الانيولينيز من الخميرة قيد الدراسة في الظروف المثلى التي تم تحديدها في الخطوات السابقة وعلى مدى 60 ساعة من الحضن بدءاً من الساعة الثامنة عشرة للحضن وبفارق ست ساعات (الشكل، 5) ولوحظت زيادة كل من الفعالية والفعالية النوعية للأنزيم المنتج من الخميرة حتى الساعة 42 من الحضن إذ بلغت الفعالية والفعالية

النوعية 3.81 وحدة/مل و 8.64 وحدة/ ملغم على التوالي.إنخفضت كل من الفعالية والفعالية النوعية بعد هذه المدة، عليه عدت مدة الحضانة المثلى لإنتاج الأنزيم من الخميرة هي 42 ساعة. ويعد تحديد طور النمو Growth phase الذي يتحقق فيه أقصى إنتاج للمواد الأيضية بما في ذلك الأنزيمات من العوامل المهمة التي ينبغي تحديدها، وفيما يتعلق بأنزيم الأنيولينيز فالدراسات تشير إلى أن أنتاجية الأنزيم تصل أقصاها في منتصف الطور اللوغارتمي ثم تشهد إنخفاضاً تدريجياً(15) وقد ركزت عدد من الدراسات على هذا الجانب ومنها الدراسة التي أجراها (6) حول أنتاجية الأنزيم من *A. niger* لفترات حضن تراوحت بين 12-168 ساعة ووجد أن أفضل زمن لبلوغ أعلى أنتاجية للأنزيم هو 96 ساعة وبفعالية بلغت 319 وحدا/ مل، بينما إنخفضت الفعالية الى 20 وحدة/ مل بعد 72 ساعة من الإنتاج. ووجد (4) أن أفضل فترة حضن كانت 72 ساعة إذ حصل على اعلى فعالية بلغت 98وحدة\ مل لخميرة *K. marxianus Var bulgaricus*. ودرس (5) تاثير مدة الحضن على انتاج أنزيم الانيولينيز من *Aspergillus kawachii* لغاية 100 ساعة ووجد ان اعلى فعالية تحققت بعد مرور 80 ساعة من الحضن إذ بلغت الفعالية فيها 82 وحدةامل وانخفضت الفعالية الى59.5 وحدامل بعد 100 ساعة من الحضن. كما أن إطالة مدة الحضن تعد عملية غير مجدية اقتصاديا وتؤدي من جهة أخرى إلى انخفاض في إنتاجية الخمائر بسبب التحلل الذاتي للخلايا بفعل نفاذ المغذيات من وسط الإنتاج اللازمة لاستمرار النمو والفعاليات الحيوية للخميرة (14).



شكل (5): تأثير زمن التخمير (مدة الحضانة) في إنتاج أنزيم الانيولينيز المنتج من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2.

المصادر

1. Bedi, G. S.; Bedi, M. K. and Bedi, A (2014) Effect of intermittent dosing on Production of inulinase from dahlia tubers using *Kluyveromyces marxianus*. World Jou of Phar and Pha sciences. 3 (7) 716-723.

2. Bradford, M. M. (1976). Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein dye binding. Analytical. Bioch. (72):248-254.

3. Cazetta, M.; Rubens, M. and Jonas, C. (2010). Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. Braz.arch. biol. technol. 53(3):701-707.

4. Cazetta, M. L.; Monti, R. and Contiero, J.(2008). Effect of conditioning on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus Var.bulgaricus* through fed-batch fermentation. International Journal of Food Engineering: (4): 5-11.

5. Chesini, M.; Neila, P. L.; Parra, D. F.; Rojas, N. L; Esquivel, C. C. and Hours, A. R. (2013). *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. Electro J of Biotech. 16 (3): 717-725.

6. Dinarvand, M.; Arbakaiya; Hassan, B. A. and Malihe, M. (2012) Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. J. Biotechnol 4:203-211

7. El-Hersh, S. M.; saber, W.I.and Noura, E. (2011). Production strategy of inulinase by *penicillium citrinum* AR- IN2 on some Agricultural By Products. Micro J. 1(3): 79-88.

8. El-souod, S. M. A.; Mohamed, T. M.; Enab, M. M. (2014). Partial purification of extracellular exo-inulinase from *Ulocladium atrum*. J of Genetic Engin and Biotech 12 (15): 15-20.

9. Gao, J. Chwn, L. Yuan, W. (2012). Effect of carbon sources, oxygenation and ethanol on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* YX01. J. Biosci. Biotech 1(2): 155-161.

10. Jain, S. C.; jain, P. C. kango, N. (2012). Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. Braz J of Micro. (43): 62-69.

11. Kalil, S. J.; Suzan, R.; Mauqeri, F. and Roodeigous, M. I. (2001). Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using Factorial design. Appl. Biochem. Biotechnol. 94 (3): 257-264.

12. Laowklom, N.; Chantanaphan, R.; and Pinphanichakarn, P. (2012). Production purification and charaterization of inulinase from a newly isolated *streptomyces sp.*CP01. Natural Resourcse. (3): 137-144.

13. Meenakshi, S.; Umayaparvathi, S.; Manivasagan, P.; Arumugam, M.; and Balasubramanian, T. (2013). Purification and characterization of inulinase from marine bacterium *Bacillus cereus* MU- 31. Ind. J. Geo- Marine Sci. 42 (4): 510-515.

14. Ohta, K.; Hamada, S. and Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 729-733.

15. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Selvakumar, P.; Soccol, V.T.; Krieger, N. and Fontana, J. D. (1999) Recent developments in microbial inulinases, Applied Biochemistry and Biotechnology. (81): 35-52.

16. Saber, W. I.; El- Naggar, N. E. (2009). Optimization of fermenation condition for the biosynthesis of inulinase by the New source; *Aspergillus* and hydrolysis of some inulin containing Agro-Wastes. Biotechnology 8 (4): 425-433.

17. Simeon, J. V. I. (2014). Isolation and characteristics of a thermophilic *Bacillus* strain,producer of inulinase. *J. BioSci. Biotech*. (1314): 83-94.

18. Singh, P. and Gill, P. K. (2006). Production of Inulinases Recent Advances. Food Technol. Biotechnol. 44 (2):151-162.

19. Singh, R. S.; Dhaliwal, R. and Puri, M. (2007). Partial purification and characterization of exo inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of High- Fructose Syrup. J. Microbiol. Biotechnol. 17 (5): 733-738.

20. Singh, R. S. and Saini, G. K. (2013). Production of inulinase from eaw Dahlia inulin by *Kluyveromyces marxianus* .J of Scien & Industrial Reseerch. (72): 603-610.