تنقية وتوصيف انزيم الانيولينيز جزئياً المنتج من العزلة المحلية للعفن *Aspergillus niger* J_3

Partial Purification and Characterization of Inulinase Produced from a local isolate of *Aspergillus niger* J_3

جاسم محمد عودة
قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

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

المستخلص

انتج انزيم الانيولينيز من العزلة المحلية للعفن *Aspergillus niger* J_3 وتم تنقيته بخطوتين شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (30 -80)% ومن ثم الترشيح الهلامي في sephadex G100 وبلغت عدد مرات التنقية بعد هذة الخطوات 3.75 مرة وبحصيلة انزيمية مقدارها 33.65% . وقد بينت نتائج توصيف الانزيم بان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم 5.5 وتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين (4.5-6) ووجد ان درجة الحرارة المثلى للفعالية تبلغ 45م واحتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مدة 20 دقيقة في مدى من الدرجات الحرارية تراوح (30 -55)م . ثبط كلوريد الزئبق فعالية الانزيم بالكامل عند التركيز 10 ملي مولاري في حين ثبطت كبريتات النحاس و كلوريد الكالسيوم فعالية الانزيم بنسبة (85 , 7)% على التوالي عند نفس التركيز . تميز مستخلص الانزيم بكفاءة لتحليل محلول الانيولين بتركيز 5% حيث بلغت نسبة التحلل 87% بعد 120 دقيقة من المعاملة الانزيمية وبحرارة 45 م .

Abstract

Inulinase was produced from local isolate of *Aspergillus niger* J_3. The inulinase was purified by two steps included precipitation by amonium sulphate at (30-80) % saturation and gel filtration on sephadex G100. The final purification folds and the yield of the enzyme were 3.15 times and 28.24%, respectively. The purified enzyme has the following characteristics: The optimum pH of the enzyme activity was 5.5. The enzyme was most stable at pH (4.5 - 6). The optimum temperature for its activity was 45c°. The enzyme retained its original activity when incubates at (30-55) c for 20 minutes. Mercury chloride inhibited the enzyme completely at concentration of 10mM, copper sulphate and calcium chloride inhibited the enzyme at concentrations of 85% and 7% respectively. It was revealed that the enzyme had the efficiency to hydrolyze 87% of 5% inulin solution when treated at 45c for 120 min.

المقدمة

يعد الفركتوز من السكريات الاحادية ذات الحلاوة العالية (170 % مقارنة بحلاوة السكروز) . كما انة يتميز بقابلية ذوبان عالية ولزوجة قليلة [1] كما اثبتت الابحاث ان للفركتوز دور في زيادة امتصاص الحديد لدى الاطفال وزيادة قدرة الجسم للتخلص من الايثانول [2] ويمكن الحصول عليه من تحلل النشا ويكون الناتج حاوي على 42% فركتوز و 50% كلوكوز و8% سكريات اخرى [3] . يعتبر الفركتوز وحدة البناء الاساسية في الانيولين وهو من الالياف الذائبة الموجود في العديد من النباتات مثل درنات الالمازة *Jerusalem artichoke* وغيرها [4] والذي يمكن تكسيرة اما بطريقة كيميائية باستخدام الحامض والحرارة فينتج اضافة للفركتوز والكلوكوز مركبات اخرى غير مرغوب بها مثل مركبات الفور فورال وغيرها . او بطريقة انزيمية باستخدام انزيم الانيولينيز 2,1-β-D fructan fructanohydrolase E.C 3.2.1.7 فينتج الفركتوز 95% اضافة للكلوكوز 5% دون اي مركبات اخرى ومن الممكن استخدام ناتج التحلل في العديد من الصناعات الاخرى مثل انتاج الايثانول [5] . واستقطب انتاج الانيولينيز من الاعفان رغم انتاجة من العديد من الاحياء المجهرية [6]

وذلك لسهولة استخلاصه بعد افرازه في بيئة النمو فضلا عن متطلبات الاعفان التغذوية اليسيرة كما ان الاعفان ملائمة لتخمرات الحالة الصلبةSolid state fermentation مقارنتة بالمزارع المغمورة والتي يمكن استغلال المخلفات الزراعية والصناعية في انتاج الانزيمات مما ينعكس على خفض تكاليف الانتاج [7] .

تهدف الدراسه الى تنقية الانزيم جزئيا ودراسة صفاته ومعرفة تاثير بعض العوامل في فعالية الانزيم ودراسة قابلية الانزيم على تحلل الانيولين بفترات زمنية مختلفة .

المواد وطرائق العمل

قياس الفعاليةالانزيمية : استخدم الحامض dinitrodalicylic acid (DNSA) 3,5 وحسب الطريقة الموصوفة في [8، 9] ، لتقدير السكريات الاحادية (الفركتوز)الناتجة عن التحلل الانزيمي وقيست الامتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر وبالرجوع للمنحنى القياسي للفركتوز الذي اعد لهذا الغرض تم استخراج السكريات المختزلة المتحررة من قبل الانزيم بتحليل المادة الأساس (الانيولين) . تعرف وحدة الفعالية بأنها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكريات المختزلة من الانيولين في دقيقة واحدة تحت ظروف التجربة .

تقدير البروتين : أتبعت طريقة Bradford [10] في تقدير البروتين وباستخدام محلول البومين المصل البقري في أعداد المنحنى القياسي .

تنقية الانزيم : بعد انتاج الانزيم وفق الظروف المثلى المتمثلة باستخدام مسحوق الالمازة المجففة ومزيج خلاصة الخميرة ونترات الصوديوم وبرقم هيدروجيني 5 وبفترة حضن 168 ساعة على حرارة 30 م استخلاص الانزيم باضافة دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 6 وبعد الترشيح والنبذ المركزي عد الراشح المستخلص الانزيمي الخام [6] جرت عملية التنقية للانزيم بواسطة استخدام كبريتات الامونيوم ثم الترشيح الهلامي وكما يلي :

1. **التركيز بكبريتات الأمونيوم:** أجريت عملية التركيز باستخدام كبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع تقع بين (30-80) % وتمت الإضافة في حمام ثلجي مع مزيج مستمر وتركت لليوم التالي بعد ذلك أجريت عملية النبذ المركزي بسرعة g× 10000 لمدة 30 دقيقة ثم أجريت عملية الديلزة تجاه الماء المقطر . قدر حجم المحلول وفعالية الإنزيم وتركيز البروتينات فيه .
2. **تحضير هلام السيفادكس Sephadex G100 :** حضر هلام السيفادكس Sephadex G100 وفقا لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) وعلق بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ تركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 وعبأ في العمود ليعطي هلاما بأبعاد (1.5×35) سم واجريت موازنة العمود بمحلول الفوسفات الدارئ .

إضافة النموذج والاسترداد : مرر المحلول الإنزيمي المركز من خطوة كبريتات الامونيوم على عمود الترشيح الهلامي واجريت عملية الموازنة والاسترداد بوساطة محلول الفوسفات الدارئ بسرعة جريان مقدارها 26 مل / ساعة وتمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة على الطول الموجي 280 نانوميتر فضلا عن تقدير فعالية الإنزيم .

توصيف الإنزيم

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم: حضرت محاليل المادة الأساس بأرقام هيدروجينية (4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 ،6.5 ، 7 ،7.5) بتركيز 0.2 مولار وقدرت فعالية الإنزيم في المحاليل ورسمت العلاقة بين قيم الأرقام الهيدروجينية المختلفة مقابل فعالية الإنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم : مزجت حجوم متساوية من محلول الإنزيم مع المحلول الدارئ بأرقام هيدروجينية (3.5 ، 4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6.5 ، 7 ،7.5 ،8) بتركيز 0.2 مولار حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 40 م مدة 20 دقيقة وقدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية ورسمت العلاقة بين قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة مقابل النسبة المئوية للفعالية المتبقية للإنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم : قدرت فعالية الإنزيم على مدى درجات الحرارة تراوح بين (30-65) م ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة مقابل فعالية الإنزيم .

تعيين الثبات الحراري للإنزيم : حضن 1 مل من المحلول الإنزيمي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (30-70) م بفارق 5 درجات مئوية بين محلول واخر على الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم مدة 20 دقيقة بردت الأنابيب مباشرة ثم قدرت فعالية الإنزيم .

دراسة تاثير بعض العوامل على فعالية الانزيم : استخدم كل من كلوريد الزئبق وكبريتات النحاس وكلوريد الكالسيوم وبتركيز 10 ملي مولاري لمعرفة مقدار التاثير على فعالية الانزيم .

قابلية الإنزيم على تحليل الانيولين : أضيف 1 مل من المحلول الإنزيمي بفعالية مقدارها 4.93 وحدة / مل إلى 10 مل من محلول الانيولين بتركيز 5% المحضر في محلول الخلات الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 5.5، حضن المزيج بدرجة حرارة 45 م وتمت متابعة تحلل السكروز على مدد زمنية مختلفة وذلك من خلال سحب كمية من محلول التفاعل ومعاملتها حراريا في حمام مغلي لمدة 10 دقيقة لغرض إيقاف فعالية الإنزيم ثم قدرت كمية السكريات المتحررة .

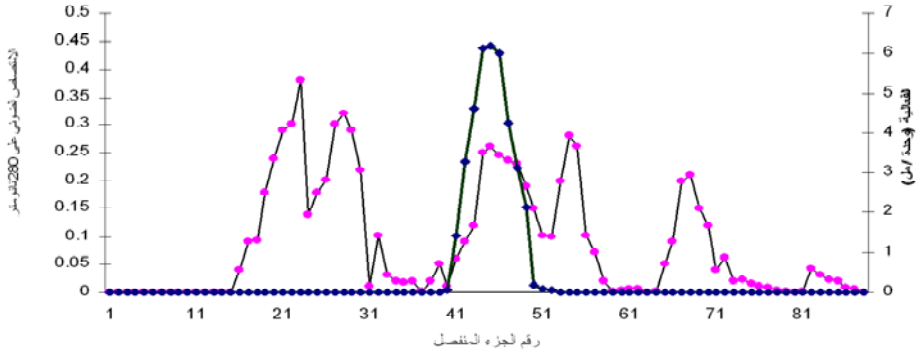
النتائج والناقشة

تركيز الإنزيم : اخضع المستخلص الإنزيمي الخام لخطوتين من التنقية تمثلت الأولى بتركيز الإنزيم للتخلص من نسبة كبيرة من الماء باستخدام ملح كبريتات الأمونيوم ويحدث الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين حيث يؤدي ذلك إلى ما تعرف بـ Salting out [11] أضيفت كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (30-80) % وجمع الراسب الناتج من النبذ المركزي واذيب في محلول الفوسفات الدارئ وتم ديلزته تجاه الماء المقطر وقيس حجمه وفعالية الانزيم وتركيز البروتين فيه وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للإنزيم بلغت 1.54 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 74.75 % وكما موضح في جدول (1) .

جدول (1): خطوات تنقية إنزيم الانيولينيز جزئياً المنتج من *Aspergillus niger* J_3

الخطوة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام	60	4.849	0.093	52.139	290.94	1	100
التركيز بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 30-80%	15	14.50	0.18	80.555	217.5	1.545	74.757
الترشيح الهلامي Sephadex G100	20	4.896	0.025	195.84	97.92	3.756	33.656

استكملت التنقية بخطوة أخرى هي خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G100 ارتفع عدد مرات التنقية اثر هذه الخطوة إلى 3.75 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 33.65% الشكل (1) .



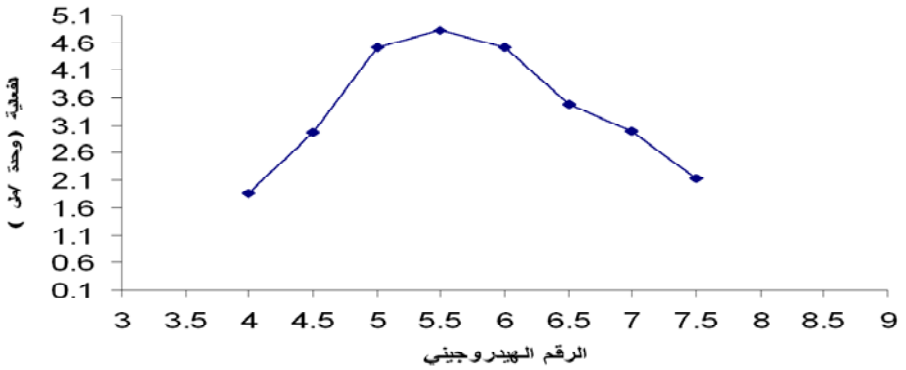
شكل (1): كروموتوغرافي الترشيح الهلامي للانيولينيز المنتج من Aspergillus niger j3 بأستخدام عمود من هلام Sephadex G-100 ، سرعة الجريان 26 مل/ ساعة بحجم 2.5 مل للجزء الواحد

ويذكر إن الخطوات المستخدمة لتنقية الإنزيم في المراجع العلمية على درجات عالية من التنوع فقد استخدم [5] التركيز بكبريتات الامونيوم لتنقية الانزيم المنتج من *Aspergillus niveus* ومن ثم عمود DE-52 وبعد ذلك sephadex G-75 وكان عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوات 34.65 وبحصيلة انزيمية 53.63% كذلك اخذ [1] كبريتات الامونيوم بالخطوة الاولى ومن ثم عمود DEAEcellulose واخيرا sephadex-

G150 لتنقية الانيولنيز من *Aspergillus candidus* بينما نقى [13] الانزيم الناتج من *Rhizopus sp* بثلاث خطوات الاولى باستخدام الترشيح الفائق والثانية بواسطة DEAE cellulofine A50 وبعد ذلك ephacryls-200HR وكان عدد مرات التنقية التي امكن الحصول عليها بعد هذة الخطوات 12 مرة وبحصيلة انزيمية 0.57% .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

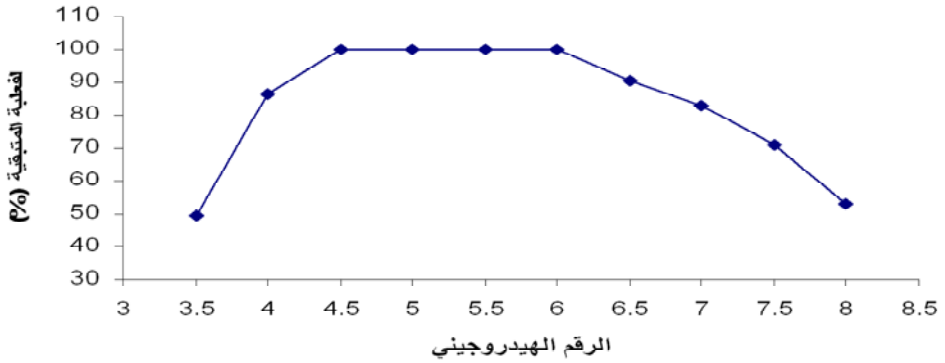
قدر الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم المنتج من العفن *Aspergillus niger* J_3 بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوح بين(4 -7.5) وبينت النتائج الموضحة في شكل (2) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم هو 5.5 وانخفضت الفعالية بانخفاض الرقم الهيدروجيني عن 5وبزيادته عن 6 يأتي هذا الانخفاض في الفعالية نتيجة تأثر الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في مجاميع معينة قابلة للتأين والموجودة ضمن تركيب الإنزيم وفي مواد الأساس وفي معقد الإنزيم – المادة الأساس (ES) ومعقد الإنزيم الناتج (EP) [11] وقد وجد [14] ان الرقم الهيدروجيني الامثل 4-4.5 لانزيم الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* فيما وجد [12] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل انزيم الانيولينيز المنتج من *Rhizopus* sp هو (6) . اما الانيولينيز المنتج من خميرة *Kluyveromyces marxianus* فقد وجد الباحث [15] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لة هو (5) .



شكل (2) الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانيولينيز المنتج من العزلة *Aspergillus niger* J_3

الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم

تم تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الانيولينيز من *Aspergillus niger* J_3 وذلك بحضنه مدة 20 دقيقة في محاليل دارئة تراوحت أرقامها الهيدروجينية بين (3.5-8) واظهرت النتائج المبينة في شكل (3) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم يتراوح بين (4.5-6) ولوحظ احتفاظ الإنزيم بـ 49% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 3.5 في حين احتفظ الإنزيم بما يقارب على 53% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 8 وقد يعزى هذا الانخفاض إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في تغيير التركيب الثانوي والثالثي لجريئة الإنزيم وتغير هيئة الموقع الفعال [11] . إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم والذي يعد معيارا مهما لتحديد ظروف تنقية الإنزيم وخزنه يتوقف على عدة عوامل منها نوع الإنزيم ومصدره [16] .

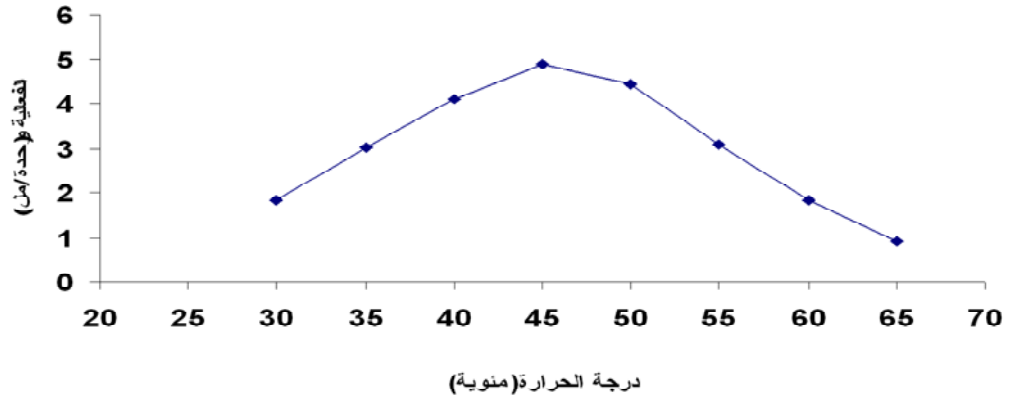


الشكل (3) : الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الانيولينيز المنتج من العزلة *Aspergillus niger* J3

وهذا قريب مما ذكرة [2] من ان الرقم الهيدروجيني لثبات الانيولينيز (4.5-6.5) المنقى من *Kluyveromyces marxianus* بينما وجد [14] ان الرقم الهيدروجيني لثبات الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* تراوح بين3.5- 7 . فيما ذكر [13] ان الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم 5-8 المنتج من *Rhizopus sp* .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

اظهرت النتائج المبينة في شكل (4) ازدياد فعالية الإنزيم مع زيادة درجة الحرارة وبلغت أقصاها عند درجة الحرارة 45 م ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارة . ويعزى سبب زيادة سرعة التفاعلات الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة لحد معين إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم والمادة الأساس نتيجة لزيادة الطاقة الحركية للجزيئات بتأثير زيادة درجة الحرارة فيما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاضا في فعالية الإنزيم بسبب تأثيرها على مسخ الإنزيم نتيجة تأثير الحرارة في تركيب الإنزيم وتغير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي إلى فقدان فعاليته [16] وتتباين درجة الحرارة المثلى لعمل الايولينيز باختلاف مصدرة .



الشكل (4): درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* J3

فقد وجد [13] ان الحرارة المثلى 40 م لعمل الانيولينيز المستخلص من *Rhizopus sp* بينما وجد [14] ان الحرارة المثلى لعمل الانيولينيز المستخلص من *Aspergillus niger* هي 60 م . كذلك اوضح [17] ان درجة حرارة60 م هي المثلى لعمل انزيم الانيولينيز المستخلص من *Penicillum janczewskii* .

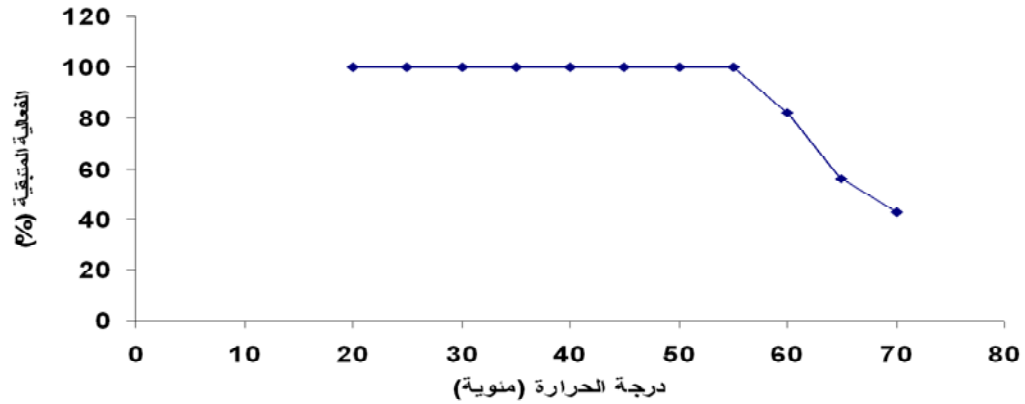
تعيين الثبات الحراري للإنزيم

تم حضن إنزيم الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* J_3 بدرجات حرارية تراوحت بين (30-70) م مدة 20 دقيقة وبرقم هيدروجيني (5) ويظهر شكل (5) إن الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته لغاية درجة الحرارة 55 م أخذت بعدها الفعالية بالانخفاض تدريجيا عند رفع درجة الحرارة إلى60 م احتفظ الإنزيم بحوالي 82% من فعاليته عند هذه الدرجة وعند 70 م فقد الإنزيم بما يربو على 57% من فعاليته .

وقد وجد [2] الذي درس انزيم الانيولينيز المنقى من *Kluyveromyces marxianus* ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه على حرارة 50 م لمدة ثلاث ساعات وفقد 50% من فعاليته بعد نصف ساعة من حضنه على حرارة 60 م و85% بعد نص ساعة من حضنه على حرارة 70 م . فيما وجد [18] ان الانزيم المنقى من *Aspergillus awamori* احتفظ ب 90% من فعاليته بعد 24 ساعة من حضنه على حرارة 50 م بينما اشار [13] ان الانزيم المنتج من *Rhizopus* sp احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه على حرارة 30م مدة 30 دقيقة وفقد كامل الفعالية عند حضنه المدة نفسها على حرارة 60 م .

تاثير بعض الايونات الفلزية في فعالية الانزيم

تبين النتائج الموضحة في جدول (2) ان تاثير الايونات يختلف باختلاف نوعها حيث لوحظ انعدام فعالية الانزيم جراء حضنه مع كلوريد الزئبق بتركيز 10 ملي مولاري فيما تبطت كبريتات النحاس فعالية الانزيم بنسبة 85 % اما كلوريد الكالسيوم فقد ثبط فعالية الانزيم 7% وبنفس التركيز .



شكل (5): الثبات الحراري لانزيم الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* J3

جدول (2) : تاثير الفلزات في فعالية انزيم الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* J_3

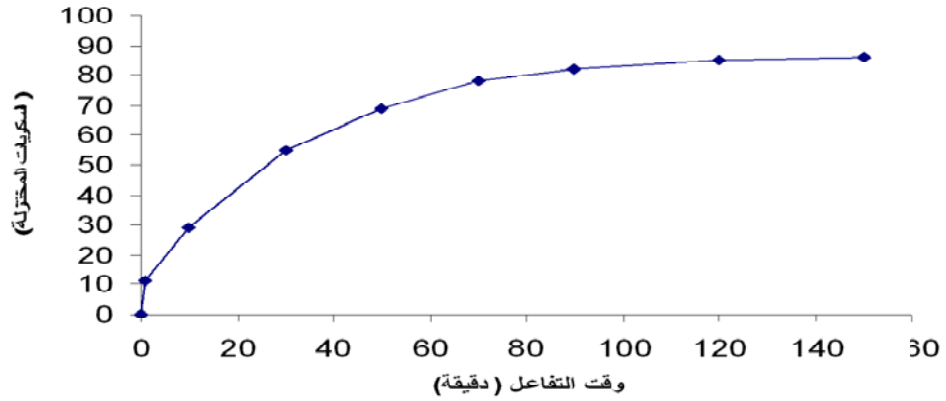
نوع المعاملة	التركيز (ملي مولاري)	الفعالية النسبية المتبقية
انزيم غير معامل	-	100
كلوريد الزئبق Hgcl2	10	صفر
كبريتات النحاس Cuso4	10	15
كلوريد الكالسيوم Cacl2	10	93

وقد وجد [12] الذي درس الانزيم المنتج من *Aspergillus candida* ان تركيز 5 ملي مولاري من كل من كلوريد الكالسيوم وكلوريد المنغنيز وكلوريد المغنيسيوم وكلوريد الزئبق قد ثبطت انزيم الانيولينيز بنسب (6،54 ،88، 5) % على التوالي .

فيما ذكر [2] ان كل من كلوريد الكالسيوم وكبريتات المنغنيز قد زادت من فعالية الانيولينيز المنتج من *Kluyveromyces marxianus* اما نترات الفضة وكلوريد الزئبق فقد ثبطت الانزيم بالكامل عند التركيز 1 ملي مولاري , فيما تبطت كل من كبريتات الحديد وكبريتات النحاس و EDTA الانزيم بنسب (50، 47، 38) على التوالي وبالتركيز نفسه . ان ايونات المعادن التي تثبط الانزيم توثر في تركيب الانزيم او في موقعة الفعال من جهه وفي المادة الاساس من جهه اخرى بتكوين معقدات تعيق ارتباط الانزيم بالمادة الاساس .

قابلية الانزيم على تحلل الانيولين

تمت متابعة تحلل 5% انيولين في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 5.5 بعد حضنه بحرارة 45م مدة زمنية تراوحت (1-150) دقيقة ويتضح من شكل (6) قدرة انزيم الانيولينيز الناتج من *Aspergillus niger* J_3 على تحليل الانيولين من الدقيقة الاولى حيث بلغت 11% وبعد 120 دقيقة كانت 85% مما يشير لسرعة عمل الانزيم .



الشكل (6) : تحلل محلول 5%انيولين بفعل انزيم الانيولينيز المنتج من العزلة *Aspergillus niger* J3

وقد وجد [19] ان انزيم الانيولينيز المنتج من *Cludosporium cladosporioides* قد حلل الانيولين بالكامل بعد 150 دقيقة من حضنه على حرارة 60 م .

بينما ذكر [20] ان الانيولين قد انتج فركتوز بنسبة 90% بعد حضنه مع الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* مدة 6 ساعات ، فيما وجد [14] ان الانيولين قد تحلل بنسبة 88% بعد حضنه مع الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* مدة 3 ساعات .

بينما كانت نسبة التحلل للانيولين بواسطة الانيولينيز المنتج من *Aspergillus niger* 84% بعد حضنة 72 ساعة بحرارة 30م [9] واشار [2] ان الانيولين قد تحلل بنسبة 87% بعد حضنه مع الانيولينيز المنتج من *Kluyveromyces marxianus* مدة 360 دقيقة .

المصادر

1. السعيدي،جاسم محمد. 2003 . تنقية وتوصيف انزيم الانفرتيز المنتج من العزلة المحلية للخميرة *Saccharomyces cerevisiae* FY3 . رسالة ماجستير –كلية الزراعة – جامعة بغداد .
2. Sarup, S.R.; R. Dhaliwal. and M. Puri. 2007. Partial purification of exoinulnase from *Kluyveromyces marxinaus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. J. Micro. Bio. 17(5): 731-738.
3. Mazutti, M.; P. Bender. and H Treichel. 2007. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugar cane bagasseas substrate. Curr Opin-micro. 6: 315-319.
4. Parekh, S.R. and Margaritis A. 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).
5. Maria, C. and M Auxiliadora. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128 URM: New Source for inulinase production. Braz. Arc. Bio. Tech. 48: 343-350.
6. عودة ، جاسم محمد . 2008 . دراسة الظروف المثلى لانتاج الانيولينيز من عزلة محلية للعفن *Aspergillus niger* J_3 . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 39(5) : 52-60 .
7. الراوي ،رشا محمد. 2004 . انتاج الانفرتيز من العفن *Aspergillus terreus* بواسطة تخمرات الحالة الصلبة . رسالة ماجستير –كلية الزراعة –جامعة بغداد .
8. Balasundaram, B. and Pardit, A.B. 2001. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. Biochem. Engin. 8: 251-256.
9. Zambeian, K. and Nowak. J. 2006. Acid and enzymatic hydrolysis of Jerusalem artichoke tubers further ethanol production. EJPAU 9(4).
10. 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.
11. Whitaker, J.R. 1972. Principles of Enzymology For The Food Science. Mercel Dekker. Inc. New York. USA.
12. Kochhar, A. and Gupta A.. 1999. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. J. Sci. Food. Agric. 79: 549-554.
13. Ohta, K.; Suetsugu. N; and Nakamura. T. 2002. Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus sp* strain TN-96. J. Bios. Bioen. 94(1): 78-80.

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

15. 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).

16. Segel, I.H.(1976).Biochimical Calculation ,John Wiley & Sons,Inc.New York .

17. 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.

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

19. Ferreita, M.S.; Andrade A.. and Kennedy. J. 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).

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