

EKSPLORASI BAKTERI POTENSIAL PENDEGRADASI INULIN DARI SUMBER AIR PANAS DI SOLOK SUMATERA BARAT

Minda Azhar*, Budhi Oktavia, Nora Andriani, Boni Risa, Dessy Natalia

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar, Padang

Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar, Padang

Kelompok Riset Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10, Bandung

*Corresponding Author: Minda Azhar, Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Negeri Padang
minda@fmipa.unp.ac.id

ABSTRACT

Inulin degrading thermophilic bacteria is a potential source of inulin degrading thermostable enzymes, an enzyme which convert inulin into fructose and fructooligosaccharides (FOS) prebiotic. The purpose of the study was to find potential inulin degrading bacteria. The methods that used to find inulin degrading bacteria were indirect and direct isolation method using inulin as the sole carbon source. Bacteria was characterized colony morphology and thermotolerant temperature. Inulin degrading bacteria was explored from three hot springs in Solok West Sumatra (Bukik Gadang, Batu Bajanjang and Sapan Maluluang). In the research has been found 8 inulin degrading bacteria isolates namely 3 isolates (BB1, BB2, BB3) from Batu Bajanjang; one isolate (BG1) from Bukik Gadang; 4 isolates from Sapan Maluluang. Four isolates (BB1, BB2, BB3, BG1) were tested termotolerant at room temperature, 40°C, 50°C. and 60°C. Isolates BB1, BB2, BG1 grow at room temperature and 40°C, whereas BB3 grow at room temperature, 40°C and 50°C. Isolates BB1, BB2 and BG1 were classified as mesophilic bacteria, isolates BB3 as thermophilic bacteria. Shape and colour of colonies were circular and white respectively.

Keywords : *Thermophilic Bacteria, Inulin Degrading Bacteria, Thermostable Inulinase, Thermostable Levanase, Inulin, Fructose*

PENDAHULUAN

Dua senyawa yang sangat penting pada industri makanan, minuman dan farmasi adalah fruktosa dan prebiotik FOS Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007; Singh, 2006). Fruktosa dan FOS dapat diperoleh dari hidrolisis inulin menggunakan katalis enzim penghidrolisis inulin. Fruktosa dapat juga diperoleh dari pati. Pembuatan fruktosa dari inulin lebih efisien dan ekonomis dibandingkan dari pati (Zittan, 1981). Oleh sebab itu, enzim yang terlibat pada reaksi hidrolisis inulin yaitu inulinase atau levanase adalah pilihan yang paling tepat untuk memproduksi fruktosa dan FOS dari inulin. Inulinase dan levanase termostabil dari

bakteri termofilik adalah pilihan yang lebih baik untuk mengisolasi enzim tersebut dalam jumlah yang banyak.

Inulinase dan levanase aktif pada substrat inulin dan levan. Inulinase dari *Bacillus polymyxa* dapat menghidrolisis sukrosa, levan, raffinosa and inulin (Kwon *et al.*, 2003). Exoinulinase dari *Aspergillus awamori* dapat menghidrolisis ikatan β 2,1- sebaik β 2,6 pada fructooligosaccharides (inulin dan levan dengan DP 4-7) (Kulminskaya *et al.*, 2003). Levanase dari *Bacillus subtilis* yang diekspresikan dalam *Escherichia coli* aktif pada levan, inulin and sukrosa (Wanker *et al.*, 1995), sementara exolevanase dari *Gluconaceto*

bacter diazotrophicus SRT4 dapat menghidrolisis levan, inulin, dan sukrosa (Menendez *et al.*, 2002).

Tipe aksi levanase dan inulinase pada substrat inulin adalah endo- atau exo-. Tipe aksi enzim ini pada substrat inulin menghasilkan produk yang berbeda. Fruktosa dapat diperoleh dari inulin dengan menggunakan exoinulinase atau exolevanase, sedangkan untuk memperoleh FOS dari inulin digunakan endoinulinase atau endolevanase. Kombinasi endo- dan exo-mempunyai efek sinergik untuk menghasilkan fruktosa dari inulin (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007).

Inulinase dan levanase termotabil dari bakteri termofilik adalah pilihan yang lebih baik untuk mengisolasi enzim tersebut dalam jumlah yang banyak. Hal ini karena inulin lebih larut dalam air pada suhu di atas 50°C (Phelps, 1965). Selain itu, enzim yang diekspresikan bakteri termofilik lebih mudah dimurnikan karena perlakuan panas, bersifat termotabil. Reaksi enzimatik pada suhu tinggi memungkinkan kelarutan substrat dan kecepatan reaksi makin tinggi, memperendah viskositas, dan memperkecil resiko kontaminasi dengan mikroorganisme lain (Vieille, 2001). Allais *et al.* (1987) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik yang mempunyai aktivitas inulinase yang ternyata dimiliki oleh genus *Bacillus*. Kebanyakan bakteri termofilik termasuk genus *Bacillus* (Souza, 2001). Gao *et al.* (2008) menentukan urutan basa nukleotida sebagian gen 16S rRNA bakteri termofilik yang mengekspresikan termotabil endoinulinase yang ternyata diidentifikasi sebagai spesies *Bacillus smithii* T7.

Sumatera Barat mempunyai dua potensi alam yang dapat dikembangkan untuk pembuatan fruktosa dan prebiotik FOS dari inulin yaitu umbi tanaman dahlia dan sumber air panas. Tanaman dahlia banyak tumbuh baik pada daratan tinggi seperti Solok, Padang Panjang, dan Bukittinggi. Pada umbi tanaman dahlia terdapat inulin dalam jumlah besar.

Kelarutan inulin dalam air lebih tinggi pada temperatur air yang lebih tinggi. Oleh sebab itu, enzim pendegradasi inulin termotabil dari bakteri termofilik paling tepat untuk katalis reaksi hidrolisis inulin. Bakteri pendegradasi inulin ini dapat dieksplorasi dari bakteri yang berasal dari sumber air panas di Solok Sumatera Barat.

Bakteri termofilik pendegradasi inulin yang berasal dari sumber air panas Bukik Kili dan Padang Balimbiang di Solok Sumatera Barat telah diidentifikasi secara genotip dan fenotip (Azhar *et al.*, 2013; Azhar dkk 2011), tetapi aktivitas enzim ini kecil. Oleh sebab itu, perlu dilakukan eksplorasi dari sumber air panas lainnya di Solok seperti Bukik Gadang, Batu Bajanjang dan Sapan Maluluang untuk menemukan bakteri pendegradasi inulin yang potensial untuk pembuatan fruktosa dari inulin.

METODA PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan meliputi bakteri, reagen kimia, inulin dari umbi dahlia. Bakteri pendegradasi inulin dieksplorasi dari sumber air panas menggunakan media dengan komposisi sebagai berikut (g/L) ; 2g (NH₄)₂SO₄, 14g KH₂PO₄, 6g K₂HPO₄.3H₂O, 0,2g MgSO₄.7H₂O, 1g trisodium sitrat, inulin atau inulin-RBB, dan agar, (Castro *et al.*, 1995)). Zat untuk ekstraksi inulin adalah etanol, aguaades.

Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia

Ekstraksi inulin dari umbi dahlia dilakukan sesuai prosedur Andyani (2001). Umbi dahlia dibersihkan, dikuliti, dipotong kecil dan ditambah air dengan perbandingan 1:2 (b:v), kemudian diblender. Campuran ini dipanaskan pada penangas air (70-80°C, sekitar 30 menit), kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan etanol 30% sebanyak 40% volume filtrat, didinginkan di dalam freezer selama 18 jam. Campuran dikeluarkan dari freezer dan dibiarkan mencair pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama 15 menit.

Endapan (inulin basah I) ditambah air dengan perbandingan (1:2), kemudian di panaskan di penangas air suhu 70°C selama 30 menit. Ke dalam campuran ditambahkan karbon aktif 1-2% (b/v), kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan kembali etanol 30% sebanyak 40% dari volume filtrat, didinginkan di dalam *freezer* selama 18 jam. Campuran dikeluarkan dari *freezer* dan dicairkan pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama, 15 menit. Endapan putih (inulin basah II) dikeringkan pada suhu 50-60°C selama 6-7 jam, kemudian dihaluskan.

Skrining Bakteri Pendegradasi Inulin

Bakteri pendegradasi inulin berasal dari sumber air panas di Solok. Bakteri pendegradasi inulin diskriming dengan *indirect and direct isolation method* menggunakan media yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon (g/L); 2g (NH₄)₂SO₄, 14g KH₂PO₄, 6g K₂HPO₄ .3H₂O, 0,2g MgSO₄.7H₂O, 1g trisodium sitrat, inulin dan agar (Castro *et al.*, 1995).

Identifikasi Bakteri Pendegradasi Inulin

Identifikasi bakteri pendegradasi inulin dilakukan terhadap morfologi koloni dan uji termotoleran. Uji termotoleran dilakukan pada suhu ruang, 40°C, 50°C, 60°C.

Penyimpanan Bakteri Pada Gliserol

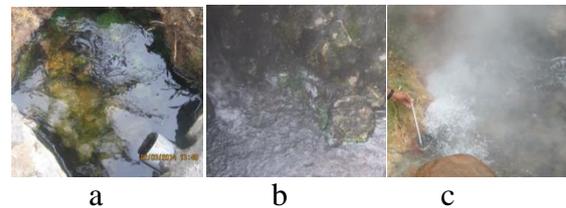
Pembuatan kultur mengandung gliserol sesuai prosedur Sambrook *et al* 2001. Kultur bakteri 1,5 mL ditambahkan 0,5 mL 60% gliserol steril, divorteks dan disimpan pada suhu -20°C atau -70°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksplorasi Bakteri Pendegradasi Inulin

Eksplorasi bakteri pendegradasi inulin dilakukan pada media minimal yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri. Dengan kata lain hanya bakteri yang mengekspresikan enzim pendegradasi inulin yang dapat hidup pada media ini. Bakteri pendegradasi inulin dieksplorasi dari tiga

sumber air panas di Solok Sumatera Barat yaitu Bukik Gadang, Batu Bajanjang dan Sapan Maluluang di Solok (Gambar 1). Pemilihan lokasi sumber air panas berdasarkan suhu yaitu di atas suhu 42°C. Air pada sumber air panas Bukik Gadang dan Batu Bajanjang mempunyai pH 7 tetapi suhu air berbeda yaitu 45°C dan 60°C. Sumber air panas ini diperkirakan berasal dari gunung yang sama yaitu Gunung Talang. Sumber air panas Batu Bajanjang lebih dekat ke Gunung Talang dibandingkan sumber air panas Bukik Gadang. Oleh sebab itu, suhu air pada sumber air panas Batu Bajanjang lebih tinggi dibandingkan suhu air pada sumber air panas Bukik Gadang.



Gambar 1. Sumber Air Panas Di Solok
a. Bukik Gadang,
b. Batu Bajanjang
c. Sapan Maluluang

Sumber air panas Sapan Maluluang diperkirakan berasal dari Gunung Kerinci bukan dari Gunung Talang. Oleh sebab itu, pH air pada sumber air panas Sapan Maluluang berbeda dengan pH air di sumber air panas Bukik Gadang dan Batu Bajanjang. Air pada sumber air panas Sapan Maluluang mempunyai pH dan suhu yang lebih tinggi dibandingkan pH dan suhu air pada sumber air panas Bukik Gadang dan Batu Bajanjang. Suhu air pada sumber air panas Bukik Gadang, Batu Bajanjang dan Sapan Maluluang berturut-turut adalah 45°C, 60°C dan di atas 100°C. Suhu dan pH air ketiga sumber air panas tersebut dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Suhu dan pH Sumber Air Panas

No	Nama sumber air panas	pH	Suhu (°C)
1	Bukik Gadang	7	45
2	Batu Bajanjang	7	60
3	Sapan Maluluang	8	di atas 100

Eksplorasi bakteri pendegradasi inulin dilakukan dengan metoda *direct isolation* dan *undirect isolation*. Media seleksi yang digunakan adalah media cair yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon (Castro *et al.*, 1995). Suhu inkubasi seleksi awal adalah 37°C, 50°C dan 60°C untuk skrining bakteri dari sumber air panas (Tabel 2). Pada metoda *direct isolation*, sampel sumber air panas langsung ditumbuhkan pada media padat yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon (media seleksi padat), kemudian diinkubasi pada suhu seleksi awal selama 18-48 jam. Dengan cara ini tidak berhasil ditemukan bakteri pendegradasi inulin.

Pada metoda *undirect isolation*, kultur bakteri ditumbuhkan pada media cair yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon (media seleksi cair) selama 2 sampai 3 hari pada suhu awal seleksi dengan 2-3 kali pemindahan ke media seleksi cair yang baru, kemudian kultur ditumbuhkan pada media padat yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon (media seleksi padat) selama 18-48 jam. Bakteri pendegradasi inulin pada media seleksi cair ditebar 100 µL dengan *sprider* kaca steril pada permukaan media seleksi padat dengan sederetan seri pengenceran. Selanjutnya dibuat koloni tunggal untuk memperoleh isolat bakteri pendegradasi inulin yang murni (Gambar 3). Kultur isolat bakteri disimpan pada suhu -20°C.

Bakteri yang berasal dari sumber air panas Sapan Maluluang sedikit mengeruhkan media cair yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon pada suhu seleksi 60°C setelah diinkubasi selama 3-4 hari. Kultur ini sebanyak 100 µL (tanpa pengenceran) ditebar pada

permukaan media seleksi padat memlihatkan jumlah koloni yang sangat sedikit (Gambar 5.5b). Hal ini mungkin disebabkan jumlah bakteri sangat sedikit pada media seleksi cair. Selain itu, media seleksi padat pada suhu 60°C cenderung lebih cepat kering, sehingga bakteri tidak dapat berkembang dengan baik. Oleh sebab itu, bakteri ini tidak diteliti lanjut.

Tabel 2. Suhu Inkubasi Seleksi Awal Sampel Pada Media Seleksi Inulin

Sumber bakteri	Sampel	Suhu inkubasi (°C)	Pengamatan
Bukik Gadang	Air	37	tidak keruh
	Air berlumut	37	keruh
	Air	50	tidak keruh
	Air berlumut	50	tidak keruh
Batu Bajanjang	Air	37	tidak keruh
	Air berlumut	37	keruh
	Air	50	tidak keruh
	Air berlumut	50	keruh
	Air berlumut	60	tidak keruh
Sapan Maluluang	Air	60	tidak keruh
	Air berlumut	60	sedikit keruh

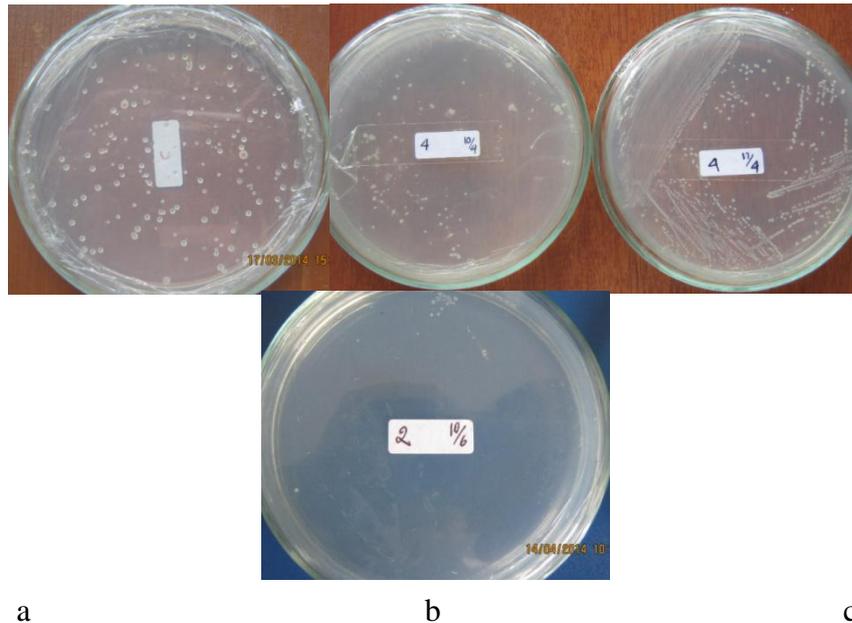
Dengan metoda *undirect isolation* telah berhasil ditemukan 8 isolat bakteri pendegradasi inulin yaitu 3 isolat dari Batu Bajanjang dengan kode isolat BB1, BB2, BB3; satu isolat dari Bukik Gadang dengan kode isolat BG1 serta 4 isolat dari Sapan Maluluang. Isolat BB1, BB2, BG1 tumbuh baik pada suhu ruang dan suhu 40 sedangkan BB3 tumbuh baik pada suhu ruang, 40°C dan 50°C. Dengan demikian, isolat BB1, BB2 dan BG1 dapat dikelompokkan sebagai bakteri mesofilik, sedangkan isolat BB3 dapat dikelompokkan sebagai bakteri termofilik.

Allais *et al.* (1987) telah berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi inulin (aktivitas inulinase) dengan cara *undirect isolation* dari bakteri tanah. Metoda *undirect isolation* juga telah berhasil digunakan untuk mengisolasi bakteri selulase dari sumber air panas Egyptian (Ibrahim dan El-diwany, 2007). Azhar *et al.*, (2013) dan Azhar *et al.*, (2011) telah berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi inulin dari sumber air panas menggunakan metoda *undirect isolation*. Keberhasilan

metoda *undirect isolation* pada isolasi bakteri pendegradasi inulin menandakan bahwa enzim pendegradasi inulin akan diekspresi jika ada inulin. Dengan demikian, gen pengkode enzim pendegradasi inulin diduga termasuk kelompok gen tipe *inducible*.

Bakteri pendegradasi inulin dapat tumbuh pada media yang mengandung

inulin sebagai satu-satunya sumber karbon karena bakteri pendegradasi inulin mengekspresikan enzim pendegradasi inulin ekstraselular. Enzim ekstraselular terutama merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis molekul besar seperti inulin, selulosa, pati, lipid, kasein, gelatin, kitin.



Gambar 3. Bakteri Pendegradasi Inulin dari Sumber Air Panas Batu Bajanjang (Ab) Sapan Maluluang (C)

Identifikasi koloni bakteri

Bakteri pendegradasi inulin yang diperoleh berjumlah 8 isolat. Tiga isolat bakteri berasal dari sumber air panas Batu Bajanjang (diberi kode BB1, BB2, BB3) satu dari Bukik Gadang (diberi kode BG1) dan empat dari Sapan Maluluang. Empat isolat bakteri dari Sapan Maluluang tidak tumbuh subur, oleh sebab itu, isolat ini tidak dipilih untuk diteliti lanjut. Isolat BB1, BB2, BB3 dan BG1 dilakukan uji termotoleran pada suhu ruang, 40°C, 50°C dan 60°C. Isolat BB3 tumbuh subur pada suhu ruang, suhu 40°C dan 50°C. Isolat BB1, BB2 dan BG tumbuh subur pada suhu ruang dan suhu 40°C. Oleh sebab itu isolat BB3 dapat dikelompokkan sebagai bakteri termofilik, sedangkan isolat

BB1, BB2 dan BG sebagai bakteri mesofilik. Bakteri mesofilik dapat tumbuh dengan baik antara suhu 10°C-45°C, sedangkan bakteri termofilik dapat tumbuh dengan baik antara suhu 40°C-70°C (Madigan *et al.*, 2012).

Bentuk koloni pada umumnya sirkular dan berwarna putih (Tabel 3). Dengan demikian isolat bakteri BB3 merupakan isolat yang paling potensial untuk menghasilkan enzim pendegradasi inulin termotabil. Enzim ini paling tepat digunakan untuk reaksi hidrolisis inulin menghasilkan fruktosa dan prebiotik FOS.

Tabel 3. Bentuk Koloni Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin dan Uji Termotoleran

No	Isolat	Bentuk koloni	Uji Termotoleran			
			Suhu ruang	40°C	50°C	60°C
1	BB1	Koloni berbentuk sirkular, dengan tepi koloni halus (entire), elevasi koloni naik, sifat optikal koloni jernih (translucent), koloni agak putih	+	+	-	-
2	BB2	Koloni berbentuk sirkular, dengan tepi koloni berombak (<i>undulate</i>), elevasi koloni naik (<i>raised</i>), sifat optikal koloni tidak tembus cahaya (<i>opaque</i>), koloni krem	+	+	-	-
3	BB3	Koloni berbentuk sirkular, dengan tepi koloni berombak (<i>undulate</i>), elevasi koloni cembung (<i>convex</i>), sifat optikal koloni tidak tembus cahaya (<i>opaque</i>), koloni putih	+	+	+	-
4	GB1	Koloni berbentuk sirkular, dengan tepi koloni berombak (<i>undulate</i>), elevasi koloni naik (<i>raised</i>), sifat optikal koloni tidak tembus cahaya (<i>opaque</i>), koloni putih kecil	+	+	-	-

Keterangan : + artinya tumbuh

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan:

- Bakteri pendegradasi yang diperoleh berjumlah 8 isolat. Tiga isolat bakteri berasal dari sumber air panas Batu Bajanjang (BB1, BB2, BB3), satu dari Bukik Gadang (BG). serta empat dari Sapan Maluluang.
- Bentuk koloni pada umumnya sirkular dan berwarna putih. Isolat BB3 tumbuh subur pada suhu ruang, 40°C dan 50°C, Isolat BB1, BB2 dan BG tumbuh subur pada suhu ruang dan suhu 40°C. Isolat BB3 dapat dikelompokkan sebagai bakteri termofilik, sedangkan isolat BB1, BB2 dan BG sebagai bakteri mesofilik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional melalui Penelitian Fundamental an. Minda Azhar dengan nomor kontrak: 237/UN35.2/PG/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Allais, J.J; Hoyos-Lopez, G; Kammoun,S; Baratti, J.C. (1987). **Isolation and Characterization of the Thermophilic Bacterial Strain with Inulinase Activity.** *Applied and Environmental Microbiology.* Vol.53(5): 942-945.
- Andyani, N.F (2001). **Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin Dahlia Pinata Cav secara Hidrolisis Asam.** Skripsi. Fakultas Teknologi Pangan IPB. Bogor.
- Azhar, M; Syukur, S; Natalia, D; Vovien; Jamsari; Munaf, E. (2013) **Characterization Of Extracellular Enzyme and Identification Of Inulin Degrading Bacteria From Hot Spring West Sumatra.** *International Journal of Chemistry.* Vol.2 (1):33-41.
- Azhar, M; Syukur, S; Natalia, D; Vovien; Jamsari. (2011). **Skrining dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Inulin dari Sumber Air Panas**

- Padang Balimbiang Di Solok.** Jurnal Riset Kimia. Vol.5(1): 32-39.
- Castro, G.R; Baigorff, M.D, Siheriz, F. (1995). **A plate Technique for Screening of Inulin Degrading Microorganism.** Journal of Micro biological Methods 22: 51-56.
- Gao,W; Bao,Y; Liu,Y; Zhang, X. (2008). **Characterization of Thermo-stable Endo-inulinase from a New Strain Bacillus Smithii T7.** Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-008-8313-1.
- Ibrahim, A.S.S and El-diwany A (2007). **Isolation and Identification Of New Cellulases Producing Thermo philic Bacteria an Egyptian Hot Spring And Some Properties Of The Crude Enzyme.** Australian Jurnal of Basic and Applied Sciences (4):473-478.
- Kwon, H.J; Jeon, S.J; You, D.J; Kim, K.H; Jeong, Y.K; Kim, Y.H; Kim, Y.M; Kim, B.W. (2003). **Cloning and Characterization of Exoinulinase from Bacillus Polymyxa.** Biotechno logy Letter, 25:155-159.
- Kulminskaya, A.A; Arand, M; Eneyskaya, E.V; Ivanen, D.R; Shabalin, K.A; Shishlyannikov, S.M; Saveliev, A.N; Korneeva, O.S; Neustroev, K.N. (2003). **Biochemical Charac terization Of Aspergillus Awamori Exoinulinase: Substrate Binding Characteristics and Regio Selectivity Of Hydrolysis.** Bio chimica et Biophysica Acta 1650:22-29.
- Madigan, M.T; Martinko, J.M; Stahl, D.A, Clark, D.P. (2012). **Brock Biology of Microorganisms, 13th ed.** San Francisco: Benjamin Cumming
- Menendez, C; Hernandez, L; Selman, G; Mendoza, M.F; Hevia, P; Sotolongo, M; Arrieta, J.G. (2002) **Molecular Cloning And Expression in Escherichia Coli Of an Exo-Lavanase Gene From The Endophytic Bacterium Glucon aceto-Bacter Diazotrophicus SR T4.** Current Microbiology, 45:5-12
- Phelps,C.F.(1965).**The Physical Properties of Inulin Solution.** Bio chem.J, 95:41-47.
- Sambrook, J; Russell, D.W. (2001). **Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3rd edition.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Singh,P; Gill, P.K. (2006). **Production of Inulinase: Recent Advances.** Food Technol Biotechnol 44(2):151-162.
- Sirisansaneeyakul, S; Worawuthiyanan, N; Vanichsiratana, W; Srinophakum, P; Chisti, Y (2007). **Production of Fructose from Inulin Mixed Inulinases from Aspergillus niger and Candida guilliermondii.** Word J Microbial Biotechnol 23:543-552.
- Souza, A.N; Martins, M.L.L. (2001). **Isolation, Properties, and Kinetics of Growth of a Thermophilic Bacillus.** Brazillian Journal of Microbiology. 32:271-275.
- Vielle, C and Zeikus, G.J. (2001). **Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews.** American Society Microbiology. p.1-43.
- Wanker, E; Huber, A; Schwab, H. (1995). **Purification and Characterization Of Bacillus Subtilis Levanase Produced In Escherichia Coli.** Applied and Environmental Microbiology, 61:1953-1958.
- Zittan, L. (1981). **Enzymatic Hydrolysis of Inulin an Alternative Way to Fructose Production.** Starch, 33:373-377.