



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00991

(22) Data de depozit: 28/11/2017

(41) Data publicării cererii:
30/07/2019 BOPI nr. 7/2019

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• EREMIA MIHAELA CARMEN,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B6,
SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• PETRESCU MARIA MONICA, STR.OITUZ
NR.5, SIBIU, SB, RO;
• SAVOIU VALERIA GABRIELA,
STR. MOISE NICOARĂ NR. 41, BL. D3,
SC. C, ET. IV, AP. 113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI
NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A INULINAZEI MICROBIENE

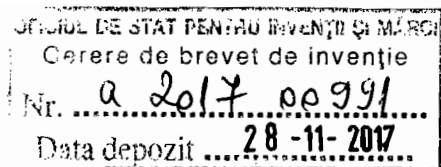
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a inulinazei microbiene, utilizată în industria alimentară și farmaceutică. Procedeu conform invenției constă în cultivarea tulpinii fungice *Aspergillus terreus* ICCF 262 pe un mediu mineral conținând inulină și coji de portocale în concentrație finală de 2%, în mediul de fermentație, în condiții de aerare prin agitare pe un agitator rotativ cu 200 rpm, pH inițial 6,5, după care se centrifughează, și supernatantul rezultat este suspus precipitării fracționate cu sulfat de amoniu, apoi

precipitatul este dializat și purificat prin adsorbție pe o coloană cu schimbători de ioni, preechilibrată cu tampon acetat 50 mM, pH 4,7, iar inulinaza se desoarbe cu o soluție NaCl în gradient de concentrație 0,1...0,6 M în același tampon, cu o viteză de curgere de 60 ml/h, în volume egale, și fracțiunile cu activitate inulinazică sunt reunite.

Revendicări: 1





PROCEDEU DE OBTINERE A INULINAZEI MICROBIENE

Invenția de față se referă la un procedeu de obținere a inulinazei, în cantități și la randamente de interes biotehnologic, cu ajutorul unui microorganism denumit *Aspergillus terreus* ICCF 262.

Inulinazele constituie o clasă importantă de enzime folosite în multe domenii, în special în industria alimentară și farmaceutică, pentru a produce siropuri de fructoză.

Inulinazele caracterizate până în prezent (cinci inulinaze) arată o variabilitate considerabilă în ceea ce privește caracteristicile biofizice și biochimice. Aceste enzime hidrolizează legăturile β -(2,1) în lanțul de inulină pentru a produce unități de fructoză și fructo-oligozaharide (FOS). Ele pot fi desemnate ca fructanohidrolaze 2,1- β -D-fructan și sunt împărțite în endo- și exo-inulinaze, în funcție de modul de acțiune asupra inulinei. Endo-inulinazele (fructano-hidrolaze 2,1- β -D-fructan; EC 3.2.1.7) sunt specifice pentru inulină și o hidrolizează prin ruperea legăturile dintre unitățile de fructoză care se află departe de capetele lanțului polimerului, pentru a produce oligozaharide. Exo-inulinazele (β -D-fructo-hidrolaze; EC 3.2.1.80), scindează unități terminale succesive de la capătul nereducător al moleculei de inulină. Pe lângă inulină, exo-inulinazele hidrolizează și zaharoza și restul de fructoză din rafinoză [1-3].

Inulinazele microbiene joacă un rol important în hidroliza inulinei pentru producerea de siropuri de fructoză și FOS. Aceste enzime sunt produse de diferite tulpini de microorganisme (funghi și drojdii), cum ar fi cele din speciile *Penicillium*, *Kluyveromyces*, *Streptomyces* și *Aspergillus*. Dintre acestea, tulpinile ce aparțin genurilor *Aspergillus* și *Kluyveromyces* sunt cel mai frecvent alese pentru producerea de inulinaze.

Condițiile de cultivare sunt diferite funcție de microorganism și tipul fermentației aplicate, parametrii fermentației variind, și anume: sursele de carbon și azot, pH-ul, temperatura, durata.

Astfel, preparatul de inulinază din *Penicillium restrictum* A191 poate fi obținut prin cultivarea tulpinii într-un mediu de cultură adecvat, [4] de exemplu, mediul MRI, care este compus din peptonă (1%), extract de drojdie (1%) și inulină (1,5%). Alte medii, cum ar fi

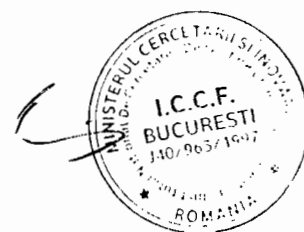


bine-cunoscutul mediu Czapeck, pot fi utilizate în mod corespunzător, cu condiția ca acestea să fie completate cu inulină, ca sursă de carbon. Tulpinile bacteriene sunt utilizate pentru producerea inulinazei, în principal, datorită termostabilității lor. Informațiile privind biosinteza inulinazelor folosind tulpini bacteriene sunt limitate, referindu-se în principal la endo-inulinaze. S-a constatat că *Streptomyces* spp. este un bun producător de inulinaze, de exemplu: Sharma și colab. [5] au obținut o inulinază cu activitate de 524 UI/L utilizând ca substrat usturoi. Bacteriile din genul *Bacillus* sunt de asemenea producători de inulinază extracelulară, de exemplu: utilizând ca substrat sucroza s-a obținut o activitate inulinazică de 42,36 U/ml [6].

Drojdiile sunt utilizate în producția de enzime, deoarece acestea se dezvoltă cu ușurință în comparație cu bacteriile. Dintre drojdii, *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp. și *Candida* spp. au un potențial ridicat de producere a inulinazei cu randamente și activități ridicate. Gao și colab. [7] au efectuat un screening la peste 400 de drojdii marine și au constatat că unele dintre aceste tulpini au capacitatea de a secreta cantități mari de inulinaze. Dintre acestea, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus aureus*, *Yarrowia lipolytica* și *Debaryomyces hansenii* pot secreta peste 40 U/ml de inulinaza extracelulara [7-11].

Tulpinile *Kluyveromyces* spp. sunt cele mai utilizate drojdii pentru obținerea inulinazei. Un număr de cercetatori au optimizat procesul de fermentație prin investigarea factorilor de producție ai inulinazei (agitație, aerare, sursa de carbon, compoziția mediului de fermentație, durata fermentației). Astfel, Santisteban și colab. [12] au studiat efectele surselor de carbon și azot, utilizând ca sursă de carbon, zaharoza în concentrație de 20g/L obținând o activitate inulinazică de 208 UI/ml. Prin folosirea reziduurilor agro-industriale ca sursa de carbon, în urma fermentației și purificării parțiale, Treichel și colab. [13] au obținut o inulinază cu activitate de 1294 U/ml, în timp ce prin dializă și liofilizarea inulinazei extracelulare produsă de *K. Marxianus* [14] rezultă o activitate de 18,743 U/ml.

Dintre cele șaisprezece tulpini fungice *Aspergillus* spp. [15], specie favorită pentru producția de inulinază, cu tulpina *Aspergillus niger* DSM 2466 s-a obținut o activitate maximă de inulinază de 100 U/ml, utilizând ca substrat sucroza S-770 adăugată în mediul de fermentație într-o concentrație de 6 g/l. Tot cu tulpina *Aspergillus niger*, Kumar și colab. [16] au obținut o activitate maximă inulinazică de 176 U/ml utilizând în mediu de fermentație o concentrație de inulină de 5% (g/v). În literatura de specialitate s-au raportat pentru producția de inulinază și alte tulpini de *Aspergillus* spp., cum fi: *A. fumigatus* [17], *A.*



awamori [18], *A. ochraceus* [19], *A. Ficum* [20] și *A. parasiticus* [21]. Peter J. H. Peters și Pieter L. Kerkhofs [22] au obținut un preparat enzimatic cu activitate inulinazică, cu ajutorul tulpinii *Aspergillus phaenic* într-un mediu apos conținând o sursă de azot, carbon și fosfor biologic, precum și inulină, la un pH de cel puțin 4,0 până la aproximativ 7,0 și la o temperatură de până la aproximativ 40°C.

Conform datelor din literatura de specialitate, în cazul utilizării speciilor fungice *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* și *Rhizoctonia solani* [23] inoculul vegetativ a fost preparat prin transferul miceliului pe mediu agar în 200 ml de extract de malt, pH = 5,5 și incubarea timp de 3 zile la 25°C pe un agitator orbital la 100 rpm.

Microorganisme menționate utilizează ca sursă de carbon, substraturi naturale de la inulină pură până la reziduuri agro-industriale, înregistrând activități și proprietăți diferite, funcție de tulpina producătoare și substrat. Inulinele pot fi găsite ca o rezervă de carbohidrați în tuberculi și rădăcini ale plantelor cum ar fi: cicoare, napi, dalie, păpădie, usturoi, ceapă, secar, orz, banane, grâu etc. Inulinaza microbiană fiind o enzimă inductibilă, în procesul de biosinteză se poate utiliza un substrat bogat în inulină rezultat din reziduuri agro-industriale (manioc, știuleți de porumb, ovăz, paie de orez, trestie de zahăr, tărate de grâu), ceea ce conduce la eficientizarea procedurii de biosinteză a enzimei [24].

Inulina este cel mai frecvent utilizată, ca substrat în producerea de inulinază. Inulina este un poliglucid natural al fructozei, cu proprietăți funcționale corelate cu lungimea catenei moleculare și aparține clasei de carbohidrați cunoscută sub denumirea de fructani. Inulina este un termen generic pentru a acoperi toți fructani liniari β (2-1), cu un grad variabil de polimerizare de la 2 la 60. Materiale naturale bogate în inulină sunt preferate ca substraturi pentru obținerea de inulinază, în ultimul timp însă, reziduurile agro-industriale au câștigat atenția cercetătorilor. În natură, inulina poate fi găsită în specii de plante din familiile mono- și dicotiledonate, cum ar fi: *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* și *Compositae* [25]. Exceptând plantele din specia *Gramineae*, inulinele sunt de obicei stocate în bulbi, tuberculi și rădăcini. Napii și cicoarea, care fac parte din familia *Compositae* sunt sursele de carbon cele mai utilizate pentru producția de inulinază, datorită conținutului de peste 50% (substanță uscată) de inulina [25-29]. Napii (*Helianthus tuberosus*) au atras atenția oamenilor de știință datorită disponibilității lor, ei prezintă toleranță la rece și la secetă, toleranță salină, vânt și rezistență la nisip, fecunditatea lor



fiind puternică și sunt rezistente la dăunători și boli [25]. Dintre substraturile pure utilizate pentru producerea de inulinază, inulina și zaharoza au fost sursele de carbon preferate. Substratul pur adăugat suplimentar în mediul de fermentație ar putea avea un impact pozitiv asupra producției de inulinază. Kumar și colab. [16] au suplimentat mediul de fermentație a inulinazei cu zaharoză, glucoză, fructoză, galactoză, maltoză și dextroză observând că mediu suplimentat cu galactoză a dat un randament maxim de inulinază, urmată de maltoză.

Reziduurile agro-industriale și extractele vegetale par a fi o sursă bună pentru producția de inulinază. Făina de manioc, știuleții de porumb, făina de ovăz, paie de orez, trestie de zahăr, tărațe de grâu, glucoza și zaharoza au fost utilizate pentru a stabili influența sursei de carbon în producția de inulinază utilizând tulpina *Aspergillus ochraceus* [19]. Cel mai înalt nivel de activitate inulinazică extracelulară (108 unități de activitate) s-a obținut când s-a folosit ca sursă de carbon trestia de zahăr. Sharma și colab. [5] au folosit diverse substrate pentru producerea de inulinază, și anume: secară, orz, banane, usturoi, grâu, inulină pură, cicoare, ceapă și dalie.

Industria utilizează o cantitate mare de polizaharide naturale, astfel în ultimii ani, atenția cercetătorilor a fost îndreptată spre producerea polizaharidelor prin fermente microbiana. Având în vedere nevoia tot mai mare de siropuri de fructoză pure, producția acestora poate prezenta o alternativă de producere așa-numitelor siropuri ultrapure cu un conținut ridicat de fructoză, din inulină. Fructoza și fructo-oligozaharidele (FOS) pot fi produse din inulină prin hidroliză chimică (pH 1-2 la 8-10°C), dar pH-ul scăzut conduce la degradarea fructozei și formarea de anhidridă a difructozei (DFA), care este un produs secundar colorat, fără capacitate de îndulcire. Pe de altă parte, producția convențională a fructozei din amidon se realizează cu ajutorul a trei enzime (α -amilaza, amiloglucozidaza și glucozoizomeraza) în trei etape, cu un randament de 45% [28]. Prin utilizarea inulinazei microbiene, hidroliza enzimatică a inulinei se realizează într-o etapă și un randament de 95% [29-31]. Acest avantaj justifică cercetările referitoare la optimizarea procedeele de obținere a inulinazei.

O altă utilizare a inulinazelor este producerea de bioetanol. Tehnologiile de conversie biochimică și termo-chimică pot transforma biomasa în biocarburanți, cum ar fi: biodiesel și alte lichide. Materia primă principală pentru producția de etanol la nivel mondial rămâne



zahărul sau amidonul din culturi agricole, utilizat într-un amestec cu benzină de la 5% până la 90% [32].

Până în prezent nu este publicat un brevet referitor la un procedeu de obținere a inulinazei microbiene utilizând tulpina fungică *Aspergillus terreus*.

Prezenta invenție înlătură dezavantajele acestor procedee prin aceea că:

- microorganismul utilizat pentru obținerea inulinazei, *Aspergillus terreus*, aparține Colecției de Microorganisme de Importanță Industrială a Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică, ICCF, sub denumirea de *Aspergillus terreus* ICCF 262. Tulpina microbieniă utilizată a fost cultivată pe medii specifice și menținută la 4°C în conserv vegetativ. Pe parcursul experimentelor s-au realizat pasaje săptămânale/lunare pentru menținerea viabilității acesteia. Mediul optim de întreținere este geloza Cantacuzino (geloza nutritivă), catalog Colecția de Microorganisme de Importanță Industrială a ICCF (CMII) afiliată la World Federation of Culture Collections (WFCC) și înscrisă în Directoriul acestei organizații la nr. 232.

- fermentația se desfășoară într-un mediu de fermentație optim pentru acumularea de inulinază, utilizând ca principală sursă de carbon un amestec de coji de portocale, ca reziduu agroalimentar și inulină pură, astfel încât în mediul de fermentație conținutul sursei de carbon să fie de 2%;

- prelucrarea mediului de fermentație se realizează pentru extracția inulinazei prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu pentru a nu contamina enzima, cu substanțe de balast;

- purificarea inulinazei se realizează prin cromatografie de schimb ionic, pentru creșterea activității specifice, în vederea scindării inulinei cu formarea compușilor utilizabili;

- se obține inulinază cu activitate cuprinsă între 92 - 567U/ml, comparativ cu valorile menționate în literatura de specialitate.

Procedeul conform invenției constă în aceea că: tulpina de *Aspergillus terreus* ICCF 262 este crescută pe mediu de inocul cu următoarea compoziție: 1% glucoză, 0,3% extract de malt, 0,3% extract de drojdie, 0,5% peptonă, timp de 24h și apoi cultivată pentru acumularea de inulinază, pe un mediu cu următoarea compoziție: 2% extract de drojdie, 0,3% NH_4NO_3 , 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% MgSO_4 . Condițiile de fermentație sunt: 28 – 29°C, pH initial de 6,5 , agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentritatea agitatorului, timp de 7 zile.



Mediu de fermentație final se centrifughează la 8000 rpm, 20 minute la 9°C. Supernatantul rezultat se supune precipitării fracționate cu sulfat de amoniu pentru extracția inulinazei. Precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu se realizează prin adăugare a 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, centrifugare și îndepărtarea precipitatului ce conține 80% din proteină care nu interesează; se adaugă în supernatantul de la prima treaptă de fracționare, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până se atinge 80% saturație. Se centrifugează și se reține precipitatul ce conține 95% din inulinază. Precipitatul se dizolvă în apă distilată și se dializează față de apă 24 h, după care se dializează față de tampon acetat 50 mM, pH 4,7 încă 24 h. Purificarea inulinazei se realizează prin cromatografie de schimb ionic. Precipitatul dializat, se adaugă peste o coloana de DEAE-Sephadex A-50, echilibrată cu tampon acetat 50mM, pH 4,7. Enzima se eluează cu o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0,1 – 0,6M în același tampon, cu o viteză de curgere de 60ml/h, în fracții de 5ml, care se analizează din punct de vedere al activității inulinazice și concentrației proteice.

În aceste condiții se realizează:

- ✓ un mediu de fermentație cu un pH final cuprins între 4,5 – 6,4 și biomasă uscată cuprinsă între 30,72 – 63,9g/L;
- ✓ conținut de inulinază de 640 – 686 U/L;
- ✓ activitate specifică 164,6 – 396,4 U/mg proteină.

Procedeul, conform invenției prezintă următoarele avantaje:

1. Procedeul utilizează tulpină din Colecția de Microorganisme de Importanță Industrială a ICCF (CMII)
2. Prin cultivarea tulpinii *Aspergillus terreus* ICCF 262 pe un mediu conținând ca surse de carbon: inulină 2% și/sau coji de portocale 2%, la o temperatură de 28-29°C și aerare prin agitare pe un agitator rotativ cu 220rpm și 2cm excentritatea agitatorului, în decurs de 7 zile de cultivare se obțin rezultate de interes biotehnologic comparative cu cele publicate în literatura de specialitate
3. Procedeul este realizat în condiții optime prin extracția inulinazei din mediul de fermentație folosind metode specifice prelucrării enzimelor, ceea ce a condus la obținerea unei inulinaze cu o activitate comparativă cu literatura de specialitate.

În continuare se vor prezenta exemple de realizare a invenției.



Exemplul 1

Obținerea culturii inocul de *Aspergillus terreus* ICCF 262 s-a realizat folosind un mediu cu următoarea compoziție: 1% glucoză, 0,3% extract de malt, 0,3% extract de drojdie, 0,5% peptonă, sub agitare 220 rpm, timp de 24h.

Pentru fermentație și acumularea de inulinază s-a folosit un mediu cu următoarea compoziție: 2% inulină ca sursă de carbon și energie, 2% extract de drojdie, 0,3% NH_4NO_3 , 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% MgSO_4 . Condițiile de cultivare au fost următoarele: 28 - 29°C, pH initial 6,5 aerarea prin agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentritatea agitatorului. La sfârșitul celor de 7 zile, pH-ul mediului de fermentație este 5,16 și conținutul în inulinază de 5,12 U/ml .

Extracția și purificarea inulinazei din mediu de fermentație s-a realizat după cum urmează:

- centrifugare mediu final de fermentație la 8000 rpm, 20 minute la 9°C pentru separarea biomasei,
- precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adăugat în concentrație de 60%, centrifugare și îndepărtarea precipitatului inactiv inulinazic; se adaugă în supernatantul obținut $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până se atinge 80% saturație,
- centrifugare 20 min, 9°C, 8000 rpm;
- dizolvare în apă distilată și dializare față de apă 24 h, urmată de dializă față de tampon acetat 50mM, pH 4,7 încă 24 h,
- purificarea dializatului prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană de DEAE-Sephadex, preechilibrată cu tampon acetat 50mM, pH 4,7. Ca eluant se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0,1 – 0,6M în același tampon. Desorbția se urmărește prin citirea eluatelor la $\lambda=280\text{nm}$, precum și prin determinarea concentrației proteice și a activității inulinazice a fiecărei fracții
- biomasă uscată = 30,72 g/L (su 4,5 %)
- activitate inulinazică de 5,12 U/ml.

Exemplul 2

Obținerea culturii inocul de *Aspergillus terreus* ICCF 262 s-a realizat în aceleași condiții ca cele prezentate la exemplul 1, iar pentru fermentație și acumularea de inulinază



s-a folosit un mediu de fermentație în care s-a introdus în loc de inulină, 2% coji de potocale uscate și măcinate, ca sursă de carbon și energie. Condițiile de lucru și cultivare au fost identice cu exemplul 1.

La sfârșitul celor 7 zile, pH-ul mediului de fermentație este 4,23 și conținutul în inulinază de 3,6 U/ml .

Izolarea și purificarea biomasei rezultate în urma fermentației s-a realizat urmând aceleasi etape prezentate în exemplul 1, în urma cărora s-au obținut:

- biomasa uscată = 17,535 g/L (su 7,35 %)
- activitate inulinazică de 3,6 U/ml

Exemplul 3

Prin cultivarea tulpinii *Aspergillus terreus* ICCF 262 în aceleași condiții ca în exemplul 1, iar pentru fermentație și acumularea de inulinază s-a folosit un mediu de fermentație în care s-a introdus, ca sursă de carbon și energie, inulină și coji de potocale uscate și măcinate până la concentrație finală în mediu de 2%, la sfârșitul celor 7 zile pH-ul mediului de fermentație este 8,80 și conținutul în inulinază de 8,28 U/ml .

Pentru obținerea inulinazei din mediul de fermentație rezultat în urma fermentației s-au urmat aceleași etape prezentate în exemplul 1, în urma cărora s-au obținut:

- biomasa uscat : 63,94 g/L (su 18,15 %)
- activitate inulinazică de 8,28 U/ml.

BIBLIOGRAFIE

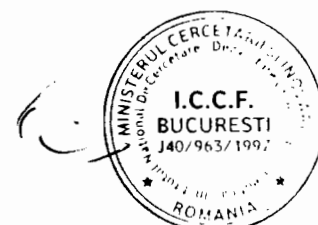
1. Henrissat, B.A., (1991), Classification of glycosyl-hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J., 80: 309-316.
2. Henrissat, B. and A. Bairoch, (1993), New families in the classification of glycosyl-hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J., 293: 781-788.
3. Pons, T., O. Olmea, G. Chinea, A. Beldarrain, G. Marquez, N. Acosta, L. Rodriguez and A. Valencia, (1998), Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. Proteins, 33: 383-395.
4. Jean-Luc Jonniaux, Tienen, Karl Rau, W. Kettenis, Philippe Thonart, La Bruyere, Thierry Dauvin, Couthuin, (2003), Enzyme or Cell Preparation with Inulinase Activity, United States Patent US 6,518,047 B1
5. Sharma A.D., Kainth S., Gill P.K. (2006), Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp., Journal of Food Engineering, 77, 486-491
6. Zharebtsov N.A., Shelamova S.A., Abramova I.N. (2002), Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria, Applied Biochemistry and Microbiology, 38(6), 634-638



7. Gao L., Chi Z., Sheng J., Wang L., Li J., Gong F. (2007), Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes, *Microbial Ecology*, 54, 722-729
8. Gong F., Sheng J., Chi Z., Li J. (2007), Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 179-185.
9. Gong F., Zhang T., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. (2008), Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 533-539.
10. Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J., Wang X. (2009), Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications, *Biotechnology Advances*, 27, 236-255.
11. Sheng, J., Z. Chi, F. Gong and J. Li, (2008), Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified Inulinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 144: 111-121
12. Santisteban B.O.Y.S., Converti A., Filho F.M. (2009), Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152, 249-261
13. Treichel H., Mazutti M.A., Filho F.M., Rodrigues M.I. (2009), Technical viability of the production, partial purification and characterization of inulinase using pre-treated agroindustrial residues, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32, 425-433
14. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. (2000), Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 63-69
15. Gern R.M.M., Furlan S.A., Ninow J.L., Jonas R. (2001), Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 632-635
16. Kumar G.P., Kunamneni A., Prabhakar T., Ellaiah P. (2005), Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1359-1361
17. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. (2006), Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigates* with commercially available (Novozyme) inulinase, *Bioresource Technology*, 97, 355-358
18. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya K.N., Neustroev K.N., Polikarpov I. (2004), Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J.Mol.Biol.*, 344, 471-480
19. Guimaraes L.H.S., Terenzi H.F., Polizeli M.L., Jorge J.A. (2007), Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 52-57
20. Chen H.Q., Chen X.M., Chen T.X., Xu X.M., Jin Z.Y. (2011), Extraction optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, *Carbohydrate Polymers*, 85, 446-451
21. Ertan F., Ekinçi F., Aktac T. (2003b), Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(15), 1332-1335



22. Peter J. H. Peters; Pieter L.Kerkhoofs, (1983), Preparation and Mobilization of Inulinase, United States Patent 4,397,949
23. Bonciu Neagu Camelia, Constantin Oana, Bahrim Gabriela, (2011), Screening of Biotechnological Parameters for Fructofuranosidases Production by a Newly Isolated Fungal Strain Using Plackett-Burman Design, Available online at www.notulaeobotanicae.ro Not Bot Horti Agrobi, 2011, 39(2):271-275
24. Ram S. Singh and Kanika Chauhan, (2016), Production, Purification, Characterization and Applications of Fungal Inulinases, *Current Biotechnology*, Volume 5, No. 3
25. Chi Z.M., Zhang T., Cao T.S., Liu X.Y., Cui W., Zhao C.H. (2011), Biotechnological potential of inulin for bioprocesses, *Bioresource Technology*, 102, 4295-4303
26. Danilcenko, H. et. al. (2008), Quality of Jerusalem artichoke tubers in relation to storage conditions, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 36(2), 23-27.
27. Bekers M., Grube M., et. al. (2008). Inulin syrup from dried Jerusalem artichoke, *LLU Raksti* 21(315), 116-121.
28. Pandey A., Soccol C.R., Selvakumar P., Soccol V.T., Krieger N., Fontana J.D. (1999), Recent developments in microbial inulinases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81, 35-52.
29. Ricca E., Calabro V., Curcio S., Iorio G. (2009), Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: a kinetic study and reaction mechanism, *Process Biochemistry*, 44, 466-470.
30. Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G., Yue L. (2009), Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 211-220
31. Maria Rosa Vela Sebastião Fernandes and Bo Jiang, (2013), Fungal Inulinases as Potential Enzymes for Application in the Food Industry, *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(8): 1031-1042
32. Linxi Yang, Quan Sophia He, Kenneth Corscadden, Chibuike C. Udenigwe (2015), The prospects of Jerusalem artichoke in functional food ingredients and bioenergy production, *Biotechnology Reports* 5, 77-8.



PROCEDEU DE OBTINERE A INULINAZEI MICROBIENE

REVENDICARE

Procedeu de obținere a inulinazei caracterizat prin aceea că, dintr-un mediu mineral care conține inulină și coji de portocale în concentrație finală de 2%, în mediul de fermentație și cu ajutorul microorganismului *Aspergillus terreus* ICCF 262, cultivat în decurs de 7 zile, în condiții de aerare prin agitare, pe un agitator rotativ cu 220 rpm, la o temperatură de 28-29°C și un pH inițial de 6.5, după care se centrifughează și supernatantul rezultat este supus precipitării fracționate cu sulfat de amoniu, apoi precipitatul este dializat și purificat prin adsorbție pe o coloană cu schimbător de ioni, preechilibrată cu tampon acetat 50mM, pH 4,7, iar inulinaza se desoarbe cu o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0,1 – 0,6M în același tampon, cu o viteză de curgere de 60ml/h, în volume egale și fracțiunile cu activitate inulinazică sunt reunite.

