
PRODUCCIÓN DE INULINASAS EXTRACELULARES POR EL HONGO *Purpureocillium lilacinum*

EXTRACELLULAR INULINASE PRODUCTION BY THE FUNGUS *Purpureocillium lilacinum*

**Ismael Acosta¹, Lisset Ávila^{1,2}, Adriana Rodríguez², Juan F. Cárdenas²,
Víctor M. Martínez³, Nancy C. Pacheco¹**

- (1) Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Micología Experimental, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, CP 78320 San Luis Potosí, SLP - México
(2) Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media, Carretera Río Verde san Ciró km 4.5, Colonia Puente del Carmen, CP 79617 Río Verde, San Luis Potosí, SL P - México
(3) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Rancho Universitario, Av. Universidad Km. 1 Ex-Hda. de Aquetzalpa, AP 32, (4) CP 43600 Tulancingo, Hidalgo - México
(e-mail: nancy.cecilia.pc@gmail.com)

Recibido: 15/03/2021 - Evaluado: 22/05/2021 - Aceptado: 25/06/2021

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la producción de inulinasa extracelular por el hongo *Purpureocillium lilacinum* en medio de Mathur modificado suplementado con diferentes carbohidratos e inulina comercial como fuente de carbono, a diferentes pH's y fuentes de nitrógeno, determinando los azúcares reductores del hidrolizado por el método de Nelson modificado por Somogy, utilizando como sustrato inulina comercial al 1.0 % (p/v) en regulador de acetatos 50 mM pH= 5.0. Además, se analizaron algunas características bioquímicas, como la estabilidad a 4°C y 28°C, pH y temperatura óptimos, el efecto de la concentración de proteína y sustrato, siendo los mejores inductores inulina de achicoria (AE 14.8), glucosa (AE 5.2) y ácido poligalacturónico, a los de 7 días de incubación y ácido glutámico como fuente de nitrógeno, a un pH de 4.0. Además, la actividad enzimática fue muy estable a 4°C, pH 5.5, y 6 horas de incubación.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the extracellular inulinase production by the fungus *Purpureocillium lilacinum* in modified Mathur's medium supplemented with different carbohydrates and commercial inulin as a carbon source, at different pH's and nitrogen sources, determining the reducing sugars of the hydrolysate by the Nelson method modified by Somogy, using as substrate commercial inulin at 1.0% (w/v) in 50 mM acetate buffer pH= 5.0. In addition, some biochemical characteristics were analyzed, such as stability at 4°C and 28°C, optimum pH and temperature, the effect of protein and substrate concentration, the best inducers being chicory inulin (EA 14.8), glucose (EA 5.2) and polygalacturonic acid, at 7 days of incubation and glutamic acid as a nitrogen source, at pH of 4.0. In addition, the enzymatic activity was very stable at 4°C, pH 5.5, and 6 hours of incubation.

Palabras clave: inducción, inulinasas extracelulares, caracterización, *Purpureocillium lilacinum*
Key words: induction, extracellular inulinases, characterization, *Purpureocillium lilacinum*

INTRODUCCIÓN

Inulina es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas moleculares de fructosa. Es, por lo tanto, un fructosano o fructano, que se encuentra generalmente en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas (achicoria, diente de león, yacón, etc.) como sustancia de reserva, y forma parte de la fibra alimentaria (Singh *et al.*, 2020). El nombre de inulina procede de la primera planta que se aisló en 1804 por el científico Rose, en el helenio (*Inula helenium*). Éstas son polímeros compuestos principalmente por 4 unidades de fructosa, unidas por enlaces glucosídicos β (2 \rightarrow 1) y poseen una glucosa terminal. Las primeras estimaciones sobre su masa molecular proporcionaron valores del orden de 5.000 g/mol (López Castrejón *et al.*, 2020), pero otros estudios han cifrado su valor en torno a 4.600 g/mol (Gennaro *et al.*, 2000). Las inulinas naturales, presentes en las plantas, se encuentran formadas usualmente por entre 60 y 100 unidades de fructosa con moléculas de glucosa en los extremos, y se les considera carbohidratos de cadena corta (Englyst & Hudson, 1996) o de bajo nivel de polimerización, y se pueden obtener de diferentes fuentes como Yacón (*Smallantus sonchifolius*) y la Tuna (*Opuntia ficus-indica*) (Fernández Pérez & Villalobos Saucedo, 2020), de desechos de jicama (*Pachyrhizus erosus*) (Melgoza-Sevilla *et al.*, 2017) y de alcachofa (Fragoso Jarillo, 2016). Además, se ha reportado que la inulina tiene una gran variedad de aplicaciones industriales, comerciales y alimenticias (Mathur & Sadana, 2021), como en la producción de etanol, a partir de hojas de *Agave salmiana* (Silva Mendoza, 2020), sustituto de grasas y aceites en la industria panificadora (Tufiño Quintana 2019). También se ha descrito que tiene usos médicos y terapéuticos, como en el tratamiento de la enfermedad aguda infantil y en especies pecuarias (Ayala-Monter *et al.*, 2018; Játiva-Mariño *et al.*, 2021), así como en el control y pérdida de peso en humanos (Quitral *et al.*, 2018).

Por otra parte, se ha reportado que la inulina (pura o cruda) es el sustrato e inductor más potente para la producción de inulinasas (Singh *et al.*, 2017). Los diferentes microorganismos productores de este polisacárido incluyen bacterias, levaduras y hongos como *Aspergillus*, el cual se ha reportado como uno de los más utilizados para la producción de éstas, considerando su importancia ambiental y económica para la degradación de los residuos agroindustriales, como el bagazo de piña, que es uno de los subproductos agroindustriales más abundantes en el país (Chesini, 2020). Entre los microorganismos que se han reportado como productores de estas enzimas se encuentran: *Aspergillus niger* (Parivuguna *et al.*, 2019; Germec *et al.*, 2020; Silva Mendoza, 2020; Germec & Turhan, 2020), *Saccharomyces paradoxus* (Sandoval-González *et al.*, 2018), *Aspergillus kawachii* IFO 4308 (Chesini, 2020), *Penicillium lanosocoeurelum* (Corrado *et al.*, 2021), *Penicillium amphipolaria* (Das *et al.*, 2020), *Penicillium oxalicum* (Singh *et al.*, 2018), *Sphingobacterium* sp. (He *et al.*, 2020), *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp. (Kim *et al.*, 1997), *Arthrobacter* sp. (Kim *et al.*, 2008), *Staphylococcus* sp., *Xanthomonas* sp., *Kluyveromyces* sp. (Cruz-Guerrero *et al.*, 2007), *Cryptococcus* sp. (Gao *et al.*, 2007), *Pichia* sp., *Sporotrichum* sp., *Candida* sp., *A. niger* (Otha *et al.*, 1993) y *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 (Singh & Chauhan, 2017), por lo que es de gran interés analizar otros microorganismos, de fácil cultivo y que produzcan inulinasas como el hongo *Purpureocillium lilacinum*.

P. lilacinum, es un hongo filamentoso de la familia Ophiocordycipitaceae, el cual se ha aislado de una amplia gama de hábitats, incluidos suelos cultivados y no cultivados, bosques, pastizales, desiertos, sedimentos estuarinos y lodos de aguas residuales e insectos. También se ha encontrado en huevos de nematodos agalladores y ocasionalmente en hembras de nematodos y quistes (Salazar-Moncada *et al.*, 2020). Además, se ha detectado con frecuencia en la rizosfera de muchos cultivos, y puede crecer en un amplio rango de temperaturas, aunque su crecimiento óptimo se encuentra en el rango de 26 a 30°C. Presenta una gran tolerancia al pH, puede crecer en diferentes sustratos, y tiene un gran potencial como agente de control biológico para inhibir el crecimiento de nematodos agalladores destructivos (Toledo-Hernández *et al.*, 2021). Actualmente, se le considera un patógeno emergente (Salazar-González *et al.*, 2020), pues causa una gran variedad de manifestaciones clínicas en individuos inmunocompetentes e inmunodeprimidos, que van desde micosis superficiales hasta infecciones sistémicas potencialmente mortales, teniendo predilección por las estructuras oculares, por lo que la mayoría de las manifestaciones clínicas reportadas con frecuencia en los seres humanos son infecciones como la queratomycosis

en usuarios de lentes de contacto, después de implante de lente intraocular o trauma ocular (López-Medrano *et al.*, 2015). Sin embargo, se le reconoce cada vez más como un agente etiológico de infecciones fúngicas invasivas, entre las que se encuentran: Infecciones del torrente sanguíneo, bursitis, endocarditis, sinusitis invasiva, peritonitis y neumonía (Sprute *et al.*, 2021). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de inulinasas extracelulares del hongo *P. lilacinum*, bajo diferentes condiciones como la presencia de diferentes fuentes de carbono incluyendo inulina comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa utilizada

Se utilizó el hongo contaminante ambiental *P. lilacinum*, resistente a Cr (VI), y que remueve eficientemente As (III), el cual fue aislado del aire de una zona cercana a la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, San Luís Potosí, S.L.P, México, a partir de medios de Agar Extracto de Malta adicionados con 500 ppm de Cr (VI). El aislado fúngico se mantuvo de manera rutinaria en Agar Papa Dextrosa (APD) a 4°C.

Medio de cultivo para la producción de inulinasas

Para la propagación del hongo, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de Mathur modificado: MgSO₄·7H₂O, 2.5 g; KH₂PO₄, 2.72 g (Tu, 1985); suplementado con diferentes fuentes de carbono como: glucosa, xilosa, fructosa, maltosa, sacarosa, lactosa, ácido poligalacturónico e inulina de achicoria (Sigma Aldrich), al 2% (p/v), a excepción de la celulosa que se añadió al 2.5% (p/v), y conteniendo glutamato, cloruro de amonio, urea, asparagina o glutamina (5.28 g) cuando se determinó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad de inulina extracelular, llevando a 1 L con agua destilada, pH final 5.5 (Tu, 1985). Los medios de cultivo ya preparados se inocularon con 1 X 10⁶ esporas/mL a partir de una colonia de 5 días de crecimiento de *P. lilacinum*, incubándose a 28°C, con agitación constante (100 rpm), para posteriormente, determinar los parámetros óptimos de inducción de la actividad de inulinasa fúngica extracelular.

Crecimiento por peso seco

Después de 12 días de incubación a 100 rpm, el sobrenadante del cultivo del hongo se cosechó en un tubo graduado, previamente pesado y se centrifugó a 3000 rpm/10 min, desechando el sobrenadante. El paquete celular se secó a 80°C, durante 24 h, y se pesó el tubo, determinando por diferencia el peso seco de la muestra. Todos los experimentos se realizaron mínimo 3 veces por duplicado.

Determinación de proteína

Ésta se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina de suero bovino como control.

Determinación de la actividad enzimática de inulinasa extracelular.

Para la determinación de la actividad enzimática extracelular de inulinasa del hongo en las condiciones antes mencionadas, se determinaron los azúcares reductores del hidrolizado del polisacárido por el método de Nelson modificado por Somogy (1952), utilizando como sustrato inulina de achicoria al 1.0 % (p/v) en regulador de acetatos 50 mM pH=5.0.

Procedimiento

A 200 µL del extracto enzimático (filtrado del hongo) se le añadió 1.5 mL de inulina al 1.0% (p/v), y se incubó durante 60 minutos a 28°C. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 0.5 mL y se mezclaron inmediatamente con 0.5 mL de reactivo cúprico. Después, los tubos se incubaron en baño María durante 10 min., se enfriaron, y se les añadió 1 mL del reactivo de arsenomolibdato y se incubaron 30 minutos a 28°C. Posteriormente, la mezcla se

centrifugó a 3000 rpm/5min, para remover el precipitado residual del sustrato, leyendo la absorbancia del sobrenadante a 500 nm en un Espectrofotómetro de luz UV-Visible (Shimadzu modelo 160-A), usando como referencia un blanco preparado con agua tridesionizada de acuerdo con el procedimiento anterior, así como un control positivo utilizando inulinasa comercial de *Aspergillus niger* (Sigma Aldich). La actividad de inulinasa se expresa como Actividad Específica (AE) (nanogramos de fructosa/min/mg de proteína). Todos los experimentos se realizaron un mínimo de 2 veces y por duplicado.

Efecto del tiempo de incubación sobre la inducción de las actividades líticas extracelulares

El hongo se inoculó en 13 matraces Erlenmeyer de 250 mL (1 matraz para cada tiempo) conteniendo 50 mL del medio de Mathur modificado, suplementados con el sustrato de inulina comercial al 1.0% (p/v) en regulador de acetatos 50 mM pH= 5.0 y se incubaron a 28°C, con agitación constante a 100 rpm. A diferentes tiempos (3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 días), se cosechó el sobrenadante por filtración, y se les determinó la actividad lítica extracelular, por el método de Nelson modificado por Somogy (1952), así como la proteína extracelular por el método de Lowry (1951) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento, producción de enzimas y producción de proteína extracelular

El hongo se inoculó en 12 matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de Mathur modificado, suplementados con inulina comercial al 1.0% (p/v) como fuente de carbono, al cual se le varió la fuente de nitrógeno, utilizando los siguientes compuestos: glutamato, sulfato de amonio, urea, nitrato de amonio, glutamina y asparagina (5.28 g/L), y se incubaron a 28°C con agitación constante a 100 rpm y a los 7 días, se cosechó el micelio por filtración en papel filtro en un embudo Buchner y se lavó con agua destilada, determinando el crecimiento del hongo por peso seco, y en el filtrado la actividad celulolítica y proteína extracelulares como se describió anteriormente.

Efecto del pH inicial sobre el crecimiento y producción de enzimas celulolíticas

A 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de Mathur modificado, suplementados con inulina comercial al 1.0% (p/v) y glutamina (5.28 g/L), como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y se les modificó el pH inicial (adicionando NaOH 1 N), con valores iniciales de 4.0, 5.0, 5.5, 6.0 y 7.0 (se prepararon dos matraces para cada valor de pH), inoculando 1×10^6 esporas/mL, incubando a 28°C con agitación constante a 100 rpm durante 7 días, después se cosechó el micelio por filtración en papel filtro en un embudo Buchner y se lavó con agua destilada, determinando en el filtrado la actividad celulolítica y la proteína extracelulares como se describió anteriormente.

Análisis de algunas propiedades de la actividad enzimática de inulinasa extracelular

Para estos experimentos, se empleó una muestra de 200 μ L del filtrado del hongo, después de la inducción de la actividad enzimática, incubando en las condiciones adecuadas para los diferentes parámetros a ensayar, tomando alícuotas a diferentes tiempos (10-20 μ g/ensayo), pH's, temperaturas, etc., e incubando durante 60 minutos a 28°C, en presencia de inulina comercial al 1.0% (p/v) en regulador de acetatos 50 mM pH=5.0 como sustrato, determinando la actividad celulolítica y la proteína extracelulares como se describió anteriormente. Los parámetros analizados fueron: Estabilidad, pH, temperatura, tiempo de incubación, concentración de proteína y de inulina.

Análisis estadístico

Las diferencias se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba post hoc de Tukey. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Encontrando en este análisis que no se encuentran diferencias significativas entre los grupos de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se indujo la producción de inulinasas extracelulares encontrando actividad enzimática, principalmente con inulina de achicoria (AE 14.8), seguida de glucosa (AE 5.2), ácido poligalacturónico (AE 3.4) y xilosa (AE 2.23), como única fuente de carbono (Tabla 1), lo cual es relevante, y coincide con algunos reportes de la literatura para diferentes microorganismos como: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Pseudomonas* sp. (Kim et al., 1997), *A. niger* (Otha et al., 1993; Parivuguna et al., 2019; Germec et al., 2020; Silva Mendoza, 2020; Germec & Turhan, 2020), *Staphylococcus* sp., *Xanthomonas* sp., *Kluyveromyces* sp. (Cruz-Guerrero et al., 2007), *Cryptococcus* sp. (Gao et al., 2007), *Arthrobacter* sp. (Kim et al., 2008), *Pichia* sp., *Sporotrichum* sp., *Candida* sp., *K. marxianus* (Cazetta et al., 2010), *S. paradoxus* (Sandoval-González et al., 2018), *P. oxalicum* (Singh et al., 2017), *A. kawachii* IFO 4308 (Chesini, 2020), *P. amphipolaria* (Das et al., 2020), *Sphingobacterium* sp. (He et al., 2020) y *P. lanosocoeurelum* (Corrado et al., 2021). Cabe mencionar que, en presencia de sacarosa como fuente de carbono, se obtuvo un menor crecimiento como peso seco y proteína extracelular, con respecto a otras fuentes analizadas, pero no se observó actividad enzimática de inulinasa, lo cual es diferente a la mayoría de los reportes de la literatura. Los experimentos posteriores se realizaron con inulina comercial como fuente de carbono, variando la fuente de nitrógeno y las otras condiciones analizadas.

Tabla 1: Inducción de Inulinasas extracelulares por *Purpureocillium lilacinum*^a

Fuente de carbono	Crecimiento (mg de peso seco)	Proteína extracelular (µg/mL)	Actividad específica (nanogramos de fructosa/min/mg de proteína)
Glucosa	313	86	5.22
Celulosa	N.D.*	4.0	0.00
Xilosa	96	220	2.23
Fructosa	128	126	0.0
Maltosa	47	258	1.23
Sacarosa	52	70	0.0
Lactosa	4.0	208	0.0
Ácido poligalacturónico	77	80	3.24
Inulina	147	44	14.8

a.- 7 días de incubación a 28°C, 100 rpm. pH 5.5; N. D.* (No Determinado).

– La celulosa remanente en el medio interfiere con la cuantificación del peso seco del hongo.

Posteriormente, se indujo la actividad de inulinasa extracelular a diferentes tiempos, encontrando que la mayor actividad enzimática se presenta a los 7 días de incubación a 28°C y un pH de 5.5 (Figura 1). Al respecto, los datos reportados son diferentes a lo encontrado para *Rhizopus microsporus* 13aIV el cual mostró una máxima actividad de inulinasa extracelular a las 36 horas de incubación (Flores-Gallegos et al., 2015), en *A. fumigatus* SOC-5A y *Thermomyces lanuginosus* fue a las 60 horas (Flores-Gallegos et al., 2015), para *P. subrubescens* y *P. oxalicum* BGPUP-4, fue a los 4 y 5 días de incubación a 28°C y 30°C, respectivamente (Mansouri et al., 2013; Singh & Chauhan, 2017), a los 30 horas de incubación con *A. niger* AM 270052.1 (Parivuguna et al., 2019), un pH de 5.0 para la levadura *Hanseniaspora uvarum* (Silva Mendoza, 2020), y un pH óptimo de 3.0 para la enzima de *A. kawachii* IFO 4308 (Chesini, 2020).

La Tabla 2, nos muestra que la mayor actividad de inulinasa producida por el hongo *P. lilacinum*, exhibió un pH inicial óptimo de 4.0; mientras que un mayor crecimiento (mg de peso seco) se observó a un pH diferente del óptimo inicial. Estos datos son diferentes a lo reportado para *P. oxalicum* BGPUP-4 y *A. niger*, en los cuales se reporta un pH óptimo de inducción a un valor de 5.5 (Singh & Chauhan, 2017; Rocha Flores & González Ponce, 2017), para la bacteria *Marinimicrobium* sp., aislada en el mar de China, se observó una temperatura y pH óptimos de inducción a 55°C y pH de 9.0 (Li et al., 2012). También, en las bacterias *Bacillus stearothermophilus* (Kato et al., 1999), *Bacillus smithii* (Gao et al., 2009) y el actinomiceto marino *Nocardopsis* sp., se ha reportado que

producen inulinasas termoestables (75°C) y un pH de inducción de 4.0 para las bacterias y de 5.0-11.0 para el actinomiceto (Gill *et al.*, 2003), un pH inicial de 6.5 y a 35°C (Dinarvand *et al.*, 2012), para *A. niger* ATCC 20611, *A. kawachiii* y *A. kawachii* IFO 4308, un pH de 3.0, (Chesini *et al.*, 2013; Chesini, 2020), un pH de 4.5 para *A. niger* (Parivuguna *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021), de 7.7 para *S. paradoxus* (Sandoval-González *et al.*, 2018), 5.5 a los 10 días de incubación para *A. niger* A42 (Germec & Turhan, 2020), y un pH de 5.1 para la enzima de *P. lanosocoeurelum* a los 4 días de incubación (Corrado *et al.*, 2021).

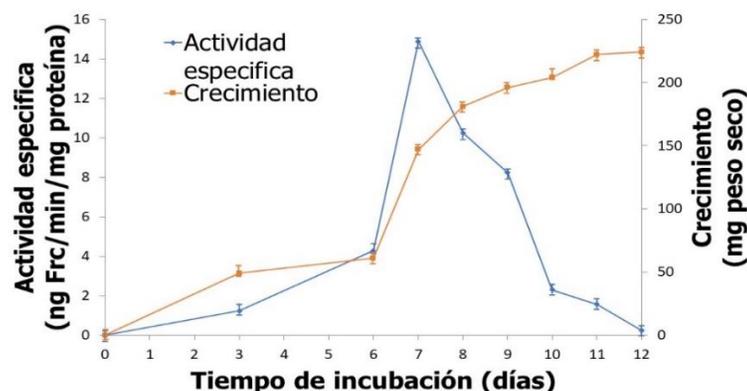


Fig. 1: Cinética de inducción de actividad de inulinasa extracelular por el hongo *Purpureocillium lilacinum*. 28°C, 100 rpm. pH 5.5.

Tabla 2: Efecto del pH inicial sobre el crecimiento y producción de Inulinasas extracelulares por *Purpureocillium lilacinum*^a

pH inicial	Crecimiento en peso seco (mg)	Proteína extracelular (mg/mL)	Actividad específica (nanogramos de fructosa/min/mg de proteína)
4.0	69	1536	32.4
5.0	49	734	24.8
5.5	19	8	14.8
6.0	110	110	12.1
7.0	86	74	10.2
8.0	57	60	4.1

a.- 7 días de incubación a 28°C, 100 rpm

También, la actividad de inulinasa fue notablemente afectada por la fuente de nitrógeno, pues la sustitución de la glutamina por otros sustratos como fuente de nitrógeno, como ácido glutámico y cloruro de amonio, indujo un descenso significativo en el crecimiento y la actividad de la enzima, disminuyendo la actividad específica de 20.0 a 14.8 y 2.9, respectivamente. Otras fuentes de nitrógeno como urea, nitrato de amonio y asparagina, no indujeron la actividad enzimática (Tabla 3). El mayor crecimiento del hongo se obtuvo con ácido glutámico, seguido de asparagina y nitrato de amonio, además de que no se observó una correlación entre el crecimiento y la producción de proteína extracelular. En la literatura, se ha reportado que las fuentes inorgánicas de nitrógeno no tienen efecto sobre la actividad enzimática de los hongos *A. niger* y *A. tamarii*, pero con extractos de carne y levadura se obtiene una buena producción de la enzima (Dinarvand *et al.*, 2012; Saber & El-Naggar, 2009), para la enzima de *P. amphipolaria* KAS 2555, se ha reportado una mayor actividad con sulfato de amonio (Das *et al.*, 2020) y fosfato ácido de sodio al 1%, para *A. niger* (Germec *et al.*, 2020).

Tabla 3: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de Inulinasas extracelulares por *Purpureocillium lilacinum*^a

Fuente de nitrógeno	Crecimiento (mg de peso seco)	Proteína extracelular ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Actividad específica (nanogramos de fructosa/min/mg de proteína)
Nitrato de amonio	25	8	0.0
Cloruro de amonio	6	10	2.9
Urea	2	54	0.0
Asparagina	47	160	0.0
Glutamina	19	8	20
Ácido glutámico	147	44	14.8

a.- 7 días de incubación a 28°C, 100 rpm

Con respecto a la actividad enzimática extracelular obtenida, se encontró que ésta fue muy estable a 0 y 4°C, pues a los 7 días de incubación, se tiene una actividad de 97% y 90%, respectivamente, aunque fue diferente a 28°C y 37°C, debido a que se observó un 70% y 59% de actividad remanente (Figura 2). En comparación a los datos anteriores, se ha reportado que una endo inulinasa de *A. niger*, conserva 90% y 95% a los 60°C a los 5 días de incubación (Nguyen *et al.*, 2011), una inulinasa muy inestable a 70 y 80°C de *A. niger* A42 (Germec & Turhan, 2020), para la inulinasa de la levadura *Hanseniaspora uvarum*, que conserva el 80% de actividad a 30°C a las 24 horas (Silva Mendoza, 2020), la actividad enzimática de *A. niger* ATCC 20611, que conserva un 92% y 53% de actividad remanente a 50°C a los 30 y 180 minutos de incubación, respectivamente (Dinarvand *et al.*, 2012). También, la enzima de *R. microsporus* 13aIV, retiene un 87% de actividad remanente después de 6 horas a 60°C (Flores-Gallegos *et al.*, 2015), para *A. kawachii* IFO 4308, la enzima conserva un 40% de su actividad residual a 65°C durante 180 minutos (Chesini 2020), para el 50% de actividad residual para dos exo inulinasas de *P. oxalicum* (Singh *et al.*, 2018), una enzima similar de *Sphingobacterium* sp., la cual es estable a 60°C durante 5 minutos (He *et al.*, 2020). Asimismo, esta actividad tiene un pH óptimo de 5.5 (Figura 3), lo cual es similar para la actividad enzimática de algunas cepas de *A. niger* (Nguyen *et al.*, 2011; Rocha Flores & González Ponce, 2017; Parivuguna *et al.*, 2019; Germec *et al.*, 2020; Germec & Turhan, 2020) y para una endo inulinasa de *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 (Bao *et al.*, 2019), un pH de 5.0 para dos exo inulinasas de *P. oxalicum* (Singh *et al.*, 2018), y de 5-0-10.0 para la enzima de *Sphingobacterium* sp. (He *et al.*, 2020).

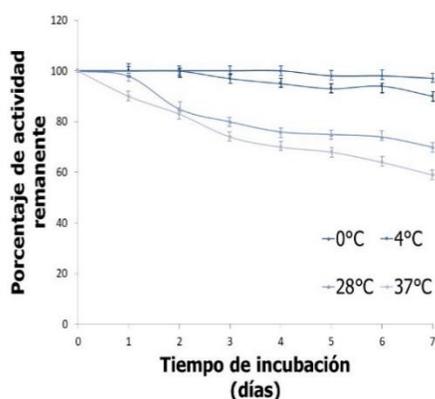


Fig. 2: Estabilidad de la actividad de inulinasa Extracelular de *Purpureocillium lilacinum*.

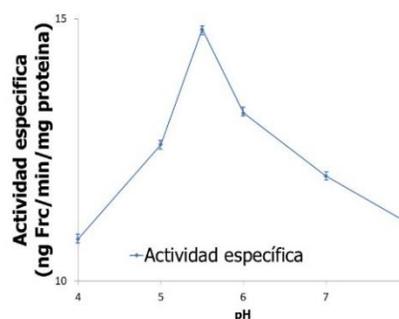


Fig. 3: Efecto del pH sobre la actividad de inulinasa extracelular de *Purpureocillium lilacinum*.

Para la temperatura, la actividad enzimática encontrada en este trabajo es mayor a los 50°C (Figura 4), lo cual es similar para la actividad de inulinasa de *A. niger* ATCC 20611 (Dinarvand *et al.*, 2012). Pero, es diferente a los 45°C reportados para *A. fumigatus* (Gouda, 2002), los 37°C reportados para *A. niveus* Blochwitz 4128 URM (Souza-

Motta *et al.*, 2005), 46°C para *Streptomyces* sp., GNDU1 (Gill *et al.* 2003), 40°C para *A. tamarii* (Saber & El-Naggar, 2009), 70°C para la enzima de *R. microsporus* 13aIV (Flores-Gallegos *et al.*, 2015), para la inulinasa de *A. fumigatus* GNCC 1351, *P. rugulosum* MTCC 3487 y *A. niger* GNCC 2655, se observó una temperatura óptima de 60°C y 65°C, respectivamente (Rawat *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2011), para otras cepas de *A. niger*, se encontró una temperatura de 55°C (Rocha Flores & González Ponce, 2017; Parivuguna *et al.*, 2019), 70°C para una endo inulinasa de *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 (Bao *et al.*, 2019), 55°C para dos exo inulinasas de *P. oxalicum* (Singh *et al.*, 2018) y una temperatura óptima de 45°C para *Sphingobacterium* sp. (He *et al.*, 2020). Mientras que, en relación con la concentración de proteína, se encontró una mayor actividad enzimática con 350 µg/ensayo (Figura 5). Al respecto, para una endo inulinasa de *A. niger*, se ha reportado una concentración de proteína de 2.04% (p/v) (Nguyen *et al.*, 2011), 10 U/g de enzima para el mismo hongo (Li *et al.*, 2021), 0.306-0.545 mg/mL (Germec & Turhan, 2020) 4317 µmoles de proteína para una exoinulinasa de *Kluyveromyces cicerisporus* y de *Aspergillus ficuum*, expresadas en *Pichia pastoris* y *E. coli*, tienen una Km de 0.322 y 7.1 mM, respectivamente (Ma *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013).

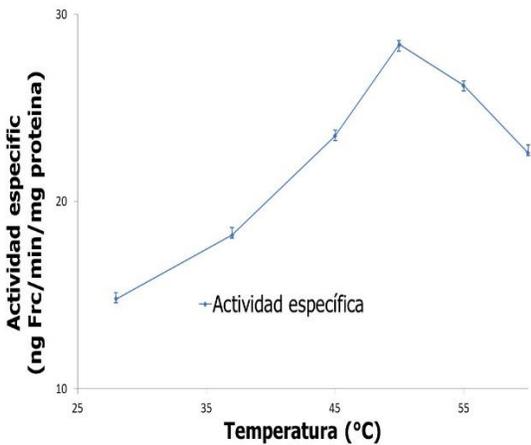


Fig. 4: Efecto de la Temperatura sobre la actividad de la inulinasa extracelular de *Purpureocillium lilacinum*.

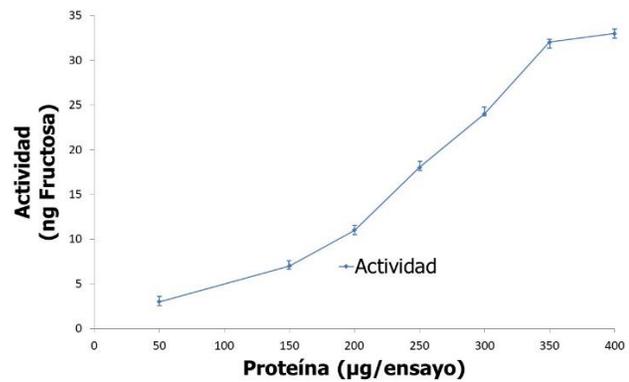


Fig. 5: Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática de *Purpureocillium lilacinum*.

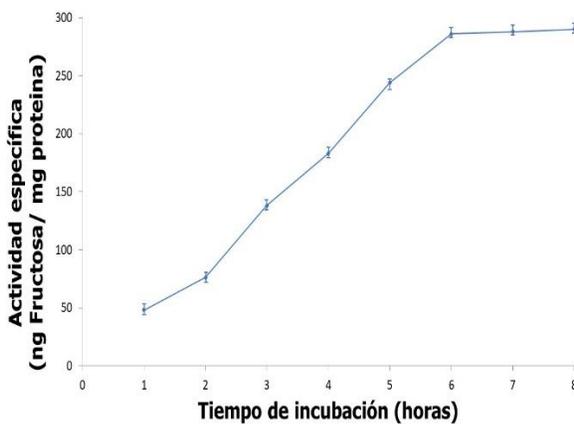


Fig. 6: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática de inulinasa de *Purpureocillium lilacinum*.

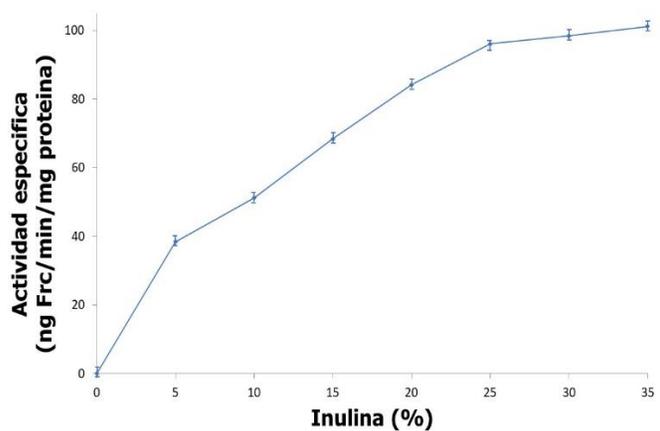


Fig. 7: Efecto de la concentración de inulina sobre la actividad enzimática de inulinasa de *Purpureocillium lilacinum*.

También, la actividad enzimática analizada, presenta un tiempo de incubación óptimo a las 6 horas de incubación, (Figura 6). Estos resultados son similares a lo reportado para una enzima recombinante de *A. kawachii* IFO 4308 (Chesini 2020). Por otro lado, para una endo inulinasa de *A. niger*, se ha reportado una vida media de 10 minutos, 15, 24, 30 horas y 48 días (Germec & Turhan, 2020; Li *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2011; Parivuguna *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021), 7.2 minutos para la enzima de *A. niger* A42 (Germec & Turhan, 2020), y para la concentración de sustrato, se encontró que al 25% (p/v) de inulina comercial, se produce la mayor actividad (Figura 7), y en relación con este parámetro, se ha reportado que para una endo inulinasa de *A. niger*, a una concentración de inulina de 2.19% (p/v), donde se reporta la mayor actividad enzimática (Nguyen *et al.*, 2011), de 50 g/L (Li *et al.*, 2021) y 2% (p/v) (Germec & Turhan, 2020), para la enzima de otras cepas del mismo hongo, aumenta la actividad enzimática al incrementar la concentración de sustrato de 0.1 a 1.0 M (Chesini 2020), y para una exoinulinasa de *K. cicerisporus* expresada en *P. pastoris* se reporta una Km de 0.322 mM y una Vmax of 4317 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando inulina como sustrato (Ma *et al.*, 2015).

Finalmente, la Tabla 4 muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 4: Características cinéticas de las actividades enzimáticas extracelulares de *Purpureocillium lilacinum*

Parámetro	Actividad
Estabilidad a 0°C	97 % /7 días
Estabilidad a 4°C	90% /7 días
Estabilidad a 28°C	70% /7 días
Estabilidad a 37°C	54% /7 días
pH óptimo	5.5
Temperatura óptima	50°C
Concentración saturante de enzima ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	300
Concentración saturante de inulina (%)	25
Tiempo de incubación	6 horas

CONCLUSIONES

En la literatura se ha descrito la importancia de las inulinasas en diferentes sectores de la industria, las cuales se han aislado de diferentes microorganismos, y en este trabajo se analizó la producción de inulinasas extracelulares del hongo *P. lilacinum*, encontrando las siguientes características:

- 1.- El hongo analizado produce actividad de inulinasa extracelular, en presencia de diferentes fuentes de carbono.
- 2.- El tiempo óptimo de inducción fue a los 7 días de incubación, a 28°C, pH de 5.5 y 100 rpm.
- 3.- Los sustratos más efectivos fueron inulina de achicoria y glutamina como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.
- 4.- La actividad de inulinasa es más estable a 0 y 4°C, a los 7 días de incubación, con una actividad remanente de 97% y 90%, mientras que a 28°C y 37°C, se observó un 70% y 59% de actividad remanente.
- 5.- El pH y temperatura óptimos fueron de 5.5 y 50°C.
- 6.- El tiempo de incubación fue de 6 horas.
- 7.- Los datos obtenidos sugieren que esta actividad enzimática puede participar en la degradación del polisacárido.

REFERENCIAS

- Ayala-Monter, M.A., Hernández-Sánchez, D., Pinto-Ruiz, D., González-Muñoz, S.S., Bárcena-Gama, J.R., Hernández-Mendo, O. *et al.* (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 1-16.
- Bao, M., Niu, Ch., Xu, X., Zheng, F., Liu, Ch., Wang, J. *et al.* (2019). Identification, soluble expression, and characterization of a novel endo-inulinase from *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 537-544.

- Cazetta, M.L., Monti, R. & Contiero, J. (2010). Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (3), 701-707.
- Chen, X.M., Xu, X.M., Jin, Z.Y. & Chen, H.Q. (2013). Expression of an exoinulinase gene from *Aspergillus ficuum* in *Escherichia coli* and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 92 (2), 1984-1990.
- Chesini, M., Paola Neila, L.P., Fratebianchi de la Parra, D., Rojas, N.L., Contreras Esquivel, J.C., Cavalitto, S.F. et al. (2013). *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16 (3), 1-13.
- Chesini, M. (2020). *Inulinasa de Aspergillus kawachii IFO 4308: caracterización, clonado, sobreexpresión, y aplicación en procesos biotecnológicos*. Tesis Doctoral. Depto. De Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/112959>
- Corrado, I., Cascelli, N., Ntasi, G., Birolo, L., Sannia, G. & Pezzella, C. (2021). Optimization of inuline hydrolysis by *Penicillium lanoscoeruleum* inulinases and efficient conversión into polyhydroxyalkanoates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 616908.
- Cruz-Guerrero, A.E., Olvera, J.L., García-Garibay, M., & Gómez Ruiz, L. (2007). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp Isolated from aguamiel (*Agave* sp) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 115–117.
- Das, D., Bath, R. & Selvaraj, R. (2020). Optimization of inulinase production by a newly isolated *Penicillium amphipolaria* strain using solid-state fermentation of hardy sugarcane stems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101875
- Dinarvand, M., Ariff, A.B., Moeini, H., Masomian, M., Mousavi, S.S., Nahavandi, R. et al. (2012). Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4 (9), 1-11.
- Englyst, H. & Hudson, G. (1996). The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*, 57, 15-21.
- Fernández Pérez, Y.L. & Villalobos Saucedo, J.E. (2020). *Obtención de inulina en tres formas de presentación a partir del Yacón (Smallanthus sonchifolius) y la Tuna (Opuntia ficus-indica)*. Tesis Licenciatura. Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ciencias de la Tierra. Unidad Estatal Amazónica. Puyo. Ecuador. <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/881>
- Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C., Morlett-Chávez, J.A., Aguilar, C.N. & Rodríguez-Herrera, R. (2015). Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4), 421-426.
- Fragoso Jarillo, L. (2016). *Obtención de inulina y oligosacáridos derivados de la alcachofa*. Tesis Licenciatura. Química. Universidad Autónoma de Madrid. España. <http://hdl.handle.net/10261/176553>
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J. & An, L. (2009). Characterization of a thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. *Applied and Biochemistry and Biotechnology*, 157, 498–506.
- Gao, L.M., Chi, Z.M., Sheng, J., Ni, X.M. & Wang L. (2007). Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 825-832.

- Gennaro, S.D.E., Birch, G.G., Parke, S.A. & Stancher, B. (2000). Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. *Food-Chemistry*, *68* (2), 179-183.
- Germec, M., Gürler, H.N., Ozcan, A., Erkan, S.B., Karahalil, E. & Turhan, I. (2020). Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. *43*, 217-232
- Germec, M. & Turhan, I. (2020). Thermostability of *Aspergillus niger* inulinase from sugar beet molasses in the submerged fermentation and determination of its kinetic and thermodynamic parameters. *Biomass Conversion and Biorefinery*, <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00809-8>.
- Gill, P., Sharma, A., Harchand, R. & Singh, P. (2003). Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource technology*, *87*(3), 359-362.
- Gouda, M. (2002). Some properties of inulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *5*(5), 589-593.
- He, L., Zhang, R., Shen, J., Miao, Y., Tang, X., Wu, Q. *et al.* (2020). Removal of N- terminal tail change the thermostability of the low-temperature-active exoinulase InuAGN25. *Bioengineering* *11* (1), 921-931.
- Játiva-Mariño, E., Manterola, C., Macias, R. & Daniel Narváez, D. (2021). Probióticos y Prebióticos. Rol en la Terapéutica de la Enfermedad Diarreica Aguda Infantil. *International Journal of Morphology*, *39*, 1 294-301.
- Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Mouri, M. & Suzuki, Y. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch/Stärke*, *51*, 253–258.
- Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K. & Yun J.W. (1997). Production of inulooligosaccharides using endo-inulinase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, *19*, 369-371.
- Kim, K.Y., Nascimento, A.S., Golubev, A.M., Polikarpov, I., Kim, C.S., Kang, S. *et al.* (2008). Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp S37. *Biochemical Biophysics Research Communication*, *371*, 600– 605.
- Li, A.X., Guo, L.Z. & Lu, W.D. (2012). Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 81–89.
- Li, X., Zhan, Q., Wang, W. & Yang, S.T. (2021). A novel inulin-mediated ethanol precipitation method for separating endo-inulinase from inulinases for inulooligosaccharides production from inuline. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 1-10.
- López Castrejón, M.L., Bengoechea, G., López Collado, S. & Aguilar, J.M. (2020). Propiedades reológicas y microestructurales de geles prebióticos de inulina. *AFINIDAD*, *LXXVII* (591), 175-181.
- López-Medrano, R., Pérez-Madera, A. Fuster Foz, C. (2015). Infecciones oculares por *Purpureocillium lilacinum*: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Revista Iberoamericana de Micología*, *32* (2) 111-114.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265-275.
- Ma, J., Cao, H., Tan, H., Hu, Z., Liu, W., Du, Y.G. Yin, H. (2016). Cloning, expression, characterization, and mutagenesis of a thermostable exoinulinase from *Kluyveromyces cicerisporus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *187*, 144-158.
- Mansouri, S., Houbraken, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., Christensen, M., Tuthill, D.E. *et al.* (2013). *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase. *Antonie van Leeuwenhoek*, *103*, 1343–1357.

Mathur, A. & Sadana, D. (2021). Inulinase: Microbial origin to food applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10, (4) 36.

Melgoza-Sevilla, O.E., Cázares-Barragán, & Olivarez-Echevarría, E. (2017). Obtención de inulina a partir de desechos de jicama (*Pachyrhizus erosus*) como fuente prebiótica. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 507-512.

Nguyen, Q., Rezessy-Szabo, J.M., Czukor, B. & Hoschke, A. (2011). Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochemistry*, 46 (1) 1298-1303.

Ohta, K., Hamada, S. & Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3), 729-733.

Parivuguna, V., Saravana Kumari, P. & Shanmugham, S. (2019). Characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AM270052.1 and scale up of conditions for mass production. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9 (3), 395-404.

Quitral, V., Torres, M., Velasquez, M. & Bobadilla, M. (2018). Efecto de inulina en la saciedad en humanos. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 20 (1), 79-89.

Rawat, H.K., Ganaie, M.A. & Kango, N. (2015). Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 799-811.

Rocha Flores, E.R. & González Ponce, M.R. (2017). Estudio de la hidrólisis enzimática de inulina de Agave en la producción de jarabe de alta fructosa empleando inulinasa comercial de *Aspergillus niger*. *Jóvenes en la Ciencia. Revista de Investigación Científica*, 3 (2), 46-49.

Saber, W. & El-Naggar, N. (2009). Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. *Biotechnology*, 8 (4), 425-433.

Salazar-González, M.A., Violante-Cumpa, J.R., Alfaro-Rivera, C.G., Villanueva-Lozano, H., Treviño-Rangel, R.J. & González, M. (2020). *Purpureocillium lilacinum* as unusual cause of pulmonary infection in immunocompromised hosts. *Journal of Infection in Developing Countries* 14 (4), 415-419.

Salazar-Moncada, D.A., Morales-Muñoz, J. & Cardona-Bustos, N. (2020). Biological control of symphyliid pests in a commercial chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) crop using the fungus *Purpureocillium lilacinum* strain UdeA0106. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, 73 (1) 9057-9064.

Sandoval-González, R.S., Jiménez-Islas, H. & Navarrete-Bolaño, J.L. (2018). Design of a fermentation process for agave fructooligosaccharides production using endo-inulinases produced in situ by *Saccharomyces paradoxus*. *Carbohydrate Polymers*, 198, 94-100.

Silva Mendoza, J. (2020). *Obtención de enzimas microbianas y su aplicación en la producción de etanol a partir de hojas de Agave salmiana*. Tesis Doctoral. Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/19204>

Singh, R.S., Chauhan, K., Pandey, A. Larroche, Ch., & Kennedy, J.F. (2018). Purification and characterization of two isoforms of exoinulinase from *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 for the preparation of high fructose syrup from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, Part B, 1974-1983.

Singh, R.S., & Chauhan, K. (2017). Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 1-10.

Singh, R.S., Chauhan, K. & Kennedy, J.F. (2017). A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 312–322.

Singh, R.S., Singh, T., Hassan, M. & Kennedy, J.F. (2020). Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164 (1), 193-210.

Somogy, M.J. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.

Souza-Motta C.N., Cavalcanti, M.A.Q., Porto, A.L.F., Moreira K.A. & Lima Filho J.L. (2005). *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: New source for inulinase production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (3), 343-350.

Sprute, R., Salmanton-García, J., Sal, E., Malaj, X., Racil, Z., Ruiz de Alegría Puig, C. *et al.* (2021). Invasive infections with *Purpureocillium lilacinum*: clinical characteristics and outcome of 101 cases from fungiscope® and the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76, 1593-1603.

Toledo-Hernández, R., Toledo, J., Liedo, P., Holguín-Meléndez, F., Valle-Mora, J. & Huerta-Palacios. (2021). Effects of *Purpureocillium lilacinum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) on food consumption and sexual behavior of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. *International Journal of tropical insect Science*, 1-8.

Tu, J.C. (1985). An improved Mathur's medium for growth, sporulation, and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios*, 44, 87-93.

Tufiño Quintana G.D. (2019). *Evaluación de inulina (Orafti GR) como sustituto de grasa y azúcares en la industria panificadora*. Tesis Licenciatura. Ingeniería Agroindustrial y de alimentos. Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Universidad de las Américas. Quito Ecuador. www.bibliotecasdelecuador.com

