

Fermentación en Medio Sólido de *Neurospora crassa*: Producción de invertasa

Daira Estrella-Rodríguez¹, Ninel Guardado-Gutiérrez¹, Nancy Velasco-Álvarez¹, Luz Tovar-Castro², Antonio Martínez-Ruiz^{1*}

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No.186, Col. Leyes de Reforma 1A sección, Alcaldía Iztapalapa, CP 09310, CDMX, México.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, CP 04960, CDMX, México.

* Autor de correspondencia: mrja@xanum.uam.mx

Resumen

Neurospora crassa es un hongo filamentoso con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo. En este estudio, se evaluó la capacidad de producción de la enzima invertasa a partir de este microorganismo, mediante fermentación en medio sólido (FMS) y agrolita como soporte inerte. Se evaluaron factores de crecimiento y producción enzimática relevantes como el contenido de sustrato, niveles de humedad, temperaturas de incubación y nivel de inóculo. La producción de invertasa se incrementó al incrementar la concentración de sustrato, alcanzando una actividad máxima de 10.69 ± 0.01 U/mL, empleando 90 g/L de sacarosa. De igual manera, la actividad enzimática se vio favorecida al emplear 65 % de humedad inicial en la FMS (44.56 ± 1.76 U/mL), una temperatura de 35 °C (46 ± 1.63 U/mL) y un nivel de inóculo de 1×10^8 esporas/mL (41.38 ± 1.00 U/mL). Además, se observó que la concentración de proteína varió en función de estas condiciones, con un máximo de 0.08 ± 0.01 mg/mL a 65 % de humedad inicial. Estos resultados muestran que *N. crassa* es un buen modelo de estudio para el diseño de estrategias que permitan la elección de las condiciones de cultivo en FMS, para mejorar la producción de enzimas industrialmente importantes, como es el caso de la invertasa.

Palabras Claves: *Neurospora crassa*, Fermentación en medio sólido, invertasa, agrolita.

Abstract

Neurospora crassa is a filamentous fungus with great potential for biotechnological applications due to its rapid growth and easy cultivation. In this study, the production capacity of the invertase enzyme from this microorganism was evaluated by solid media fermentation (SMF) with agrolite as an inert support. Relevant growth and enzyme production factors such as substrate content, humidity levels, incubation temperatures, and inoculum level were assessed. Invertase production increased with increasing substrate concentration, reaching a maximum activity of 10.69 ± 0.01 U/mL, using 90 g/L of sucrose. Similarly, enzymatic activity was enhanced by using 65 % initial humidity in the SMF (44.56 ± 1.76 U/mL), a temperature of 35 °C (46 ± 1.63 U/mL), and an inoculum level of 1×10^8 spores/mL (41.38 ± 1.00 U/mL). Furthermore, it was observed that protein concentration varied depending on these conditions, with a maximum of 0.08 ± 0.01 mg/mL at 65 % initial humidity. These results show that *N. crassa* is a good study model for the design of strategies that allow the choice of culture conditions in SMF to improve the production of industrially important enzymes, such as invertase.

Key Words: *Neurospora crassa*, Solid media fermentation, invertase, agrolita

Introducción

Los hongos filamentosos se han utilizado para la producción industrial de muchas enzimas, entre ellas, amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, celobiosa e invertasa (Machida 2002; Ray & Behera, 2017; Ohara et al., 2015). Las enzimas se emplean en una variedad de sectores industriales, desde la alimentación, cosméticos y biocombustibles, entre otros (Wikandari et al., 2023). Esta producción puede derivar de procesos como la fermentación en estado sólido (FMS) y la fermentación sumergida (FS). La FMS se define como cualquier proceso de fermentación microbiana llevado a cabo sobre materiales insolubles, en la casi ausencia de líquido que fluya libremente. Dichos materiales sirven como fuente de nutrientes y soporte físico (Rodríguez & Sanromán, 2006). Se considera más apropiado cuando se utilizan hongos, porque los sustratos sólidos se asemejan a su hábitat natural, lo que mejora su crecimiento y secreción de una amplia gama de enzimas extracelulares (Castro et al., 2014). Aunque la FS es más común en los bioprocesos, la FMS está emergiendo como una alternativa atractiva debido a beneficios como una mayor productividad y rendimientos, aprovechamiento de numerosos residuos agroindustriales, menor costo de producción y riesgo de contaminación, menor requerimiento de energía y menores costos de energía para la esterilización, entre otros (Oviedo et al., 2014; Chilakamarry et al., 2022; de Castro et al., 2018).

Neurospora crassa es un hongo filamentoso comúnmente llamado moho del pan, que crece en el entorno natural y en materia vegetal muerta (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Se encuentra comúnmente en alimentos ricos en carbohidratos y residuos del procesamiento de la caña de azúcar (Kuo et al., 2014). *Neurospora crassa* tiene un rápido crecimiento a 32 °C, con carbohidratos, nutrientes simples y biotina y sus cultivos vegetativos se reconocen por sus esporas de color naranja (conidios) (Selker, 2017). Se considera que todas estas características le confieren un potencial biotecnológico (Havlik et al., 2017). Diversos estudios han demostrado la producción de distintas enzimas mediante fermentación en medio sólido, utilizando *N. crassa*. Este microorganismo fue capaz de generar altos

rendimientos de celulasa y β -glucosidasa a partir de sustratos sólidos (Macris et al., 1989). En harina de canola extraída con hexano (HECM), exhibió una actividad significativa de β -glucosidasa en FMS (Alhomodi et al., 2022). Así mismo, logró una actividad enzimática de celulasa de 4.72 U/mL cuando se mejoraron los parámetros del proceso de fermentación de *N. crassa* en salvado de trigo (Verma & Kumar, 2020). En el caso de la proteasa, se utilizaron condiciones específicas con okara como sustrato, logrando una actividad significativa tras 72 h de fermentación (Zheng et al., 2020). De igual manera, se reportó la producción de α -amilasa empleando residuos de café y de lipasa con harina de mostaza como sustrato (con una actividad enzimática de 3.88 U/mL) (Murthy et al., 2009; Arooj et al., 2025).

Otra enzima importante es la invertasa (EC 3.2.1.26), la cual ha atraído la atención de diferentes sectores industriales debido a su potencial biotecnológico (Giraldo et al., 2012). Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace β -fructósido en la sacarosa (Toledo et al., 2019) y otros oligosacáridos como la kestosa, rafinosa y la estaquiosa (Andjelkovic & Lah, 2011). Varios estudios han demostrado la producción de invertasa por diferentes microorganismos, especialmente por *Saccharomyces cerevisiae* (Nobre et al., 2016). En el caso de *Aspergillus niger* en FMS, se reportó una productividad de 0.09 U/mL·h utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte (Romero-Gómez et al., 2000). Por otro lado, con *Aspergillus niger* y melaza de soja como soporte, se reportó una actividad de 0.355 U/mL (Kabir et al., 2025). En contraste, *Emmericella nidulans* mostró una mayor actividad invertasa (28.6 U/mL) (Alves et al., 2013).

Diversos parámetros influyen en la producción de enzimas, incluyendo el tipo de microorganismo, la fuente de carbono, el pH inicial, el contenido de humedad, la temperatura de incubación y el tiempo de fermentación. Debido a su importancia, estas variables han sido evaluadas para mejorar la producción enzimática a partir del hongo *Neurospora Crassa* en FMS, empleando agrolita como soporte inerte (Nobre et al., 2016; Boondaeng et al., 2024).

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó el hongo *Neurospora crassa* FGSC#9717 ($\Delta mus-51::bar^+$; *mat A his-3*), el cual fue inoculado en matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían medio Vogels (10X) con sacarosa (1.5 %) como fuente de carbono e inductor para la producción de invertasa y 1.5 % de agar. Los matraces se incubaron a 30 °C por 4 días. Los conidios se recuperaron con 30 mL de Tween 80 estéril al 0.01 % (v/v) y se emplearon 500 mL de la suspensión de conidios para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Vogels (1.5 % de sacarosa y 1.5 % de agar). Después de 4 días a 30 °C, se recolectaron los conidios (inóculo) para las FMS.

Fermentación en Medio Sólido (FMS)

Se utilizó agrolita previamente tamizada (tamaño de partícula de 1.19 – 2.38 mm) y lavada con agua del grifo, seguida de un enjuague con agua destilada. Luego, se secó a 60 °C y se empleó como soporte sólido para la FMS. La composición del medio base fue (g/L): sacarosa, 15; $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$, 30; KH_2PO_4 (anhidro), 50; NH_4NO_3 (anhidro), 20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1. Se adicionó 1 mL de solución de oligoelementos, 0.5 mL de solución de biotina y 1 mL de cloroformo. La agrolita y el medio de cultivo se esterilizaron por separado por 15 min a 121 °C. Se evaluaron concentraciones iniciales de sacarosa de 30-120 g/L.

Se pesaron 10 gramos de agrolita por matraz ErlenMeyer (250 mL) y se humedecieron con 15 ± 1 mL de medio de cultivo inoculado (1×10^7 esporas/mL) para tener una humedad inicial del 60 %. Se hicieron FMS a 30 °C empleando diferentes concentraciones de sacarosa (30, 45, 60, 90 y 120 g/L). Después, se hizo un estudio en FMS a 30 °C y diferentes contenidos de humedad inicial (55 y 65 %), con 15 g/L de sacarosa. Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción enzimática a partir de FMS (15 g/L de sacarosa y 60 % humedad inicial) a 25 y 35 °C. Finalmente, se hicieron FMS a 30 °C (30 g/L de sacarosa, 60 % de humedad inicial) con tres tamaños de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas/mL).

Recuperación de la proteína extracelular

La proteína extracelular se recuperó incorporando 100 mL de agua destilada por matraz, los cuales se agitaron en vórtex por 5

min y después su contenido se filtró al vacío (Whatman 41). La concentración de proteína en los extractos crudos se determinó de acuerdo con lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024). Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de actividad enzimática

Las pruebas enzimáticas se realizaron a partir de los extractos proteicos crudos, midiendo la concentración de azúcares reductores (AR), liberados debido a la actividad enzimática. La mezcla de reacción se preparó con 0.180 mL de sacarosa 0.1 M como sustrato para la reacción, después se adicionaron 0.02 mL de extracto de proteína, se incubó a 50 °C (Guerrero-Urrutia et al., 2021) y la reacción se detuvo adicionando 0.3 mL de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS). Los AR liberados se cuantificaron por el método de Miller (Miller et al., 1960). Una unidad de actividad invertasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de AR por minuto, bajo estas condiciones de ensayo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de azúcares totales, pH y humedad

La concentración de azúcares totales se determinó por el método de fenol-sulfúrico (Bradford, 1976). Los valores de pH se midieron mediante potenciometría (PHS-3BW, BANTE Instruments) y el contenido de humedad se cuantificó con termobalanza (MB45, OHAUS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de invertasa en FMS

La producción de invertasa mediante FMS se evaluó utilizando concentraciones iniciales de sacarosa de 30 a 120 g/L, con tiempos de incubación de 72 y 120 h a 30 °C. Se observó un incremento en la producción de proteína (fig. 1) y de invertasa (fig. 2) hasta 3.09 veces al aumentar la concentración de sacarosa de 30 a 90 g/L, alcanzando una actividad máxima de 10.69 ± 0.01 U/mL a 120 h de cultivo. En esta condición, el consumo de sacarosa fue del 96 %, la concentración de proteína fue de 0.0264 ± 0.002 mg/mL y la actividad específica de 405.00 ± 6.15 U/mg. Este

comportamiento coincide con lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024), para el mismo microorganismo en FMS. La producción de invertasa a la concentración más baja de sustrato fue 2.66 y 6.66 veces más alta (con PUF y aserrín, respectivamente), en comparación con este estudio. Sin embargo, las actividades específicas fueron en promedio 13.5 veces más bajas, en comparación con este estudio. De igual manera, la actividad enzimática obtenida en este estudio fue superior a la reportada por Li et al. (2018), para *Aspergillus foetidus* (5.5 ± 0.1 U/mL) a las 96 h de fermentación. Por otro lado, Nadeem et al. (2015) reportaron una actividad invertasa de 0.350 U/mL en cultivos con *Streptomyces* sp y 30 g/L de sacarosa inicial. La actividad enzimática obtenida en este estudio fue 3.55 veces más baja en comparación con lo reportado por Guerrero-Urrutia et al. (2021) para *A. brasiliensis* en

FMS, utilizando agrolita como soporte y 120 g/L de sacarosa inicial. Bajo estas condiciones de cultivo, no se presentó represión catabólica por sustrato, evidenciando que es posible emplear concentraciones de sustrato altas, pero sobre todo bajas, para obtener enzimas de interés como la invertasa, y abatir costos de producción. Esta producción está directamente relacionada con varios factores como el microorganismo, las condiciones y el tipo de cultivo, así como la fuente de carbono y los soportes empleados. Estos últimos juegan un papel importante en la producción y rendimiento de estas enzimas, lo cual se vio reflejado en la comparación de los títulos de actividad enzimática, en donde sobresale el PUF, el cual presenta ventajas sobre la agrolita al tener una capacidad de retención de agua alta, lo que puede mejorar la productividad enzimática, sin diluir el producto durante la recuperación del mismo.

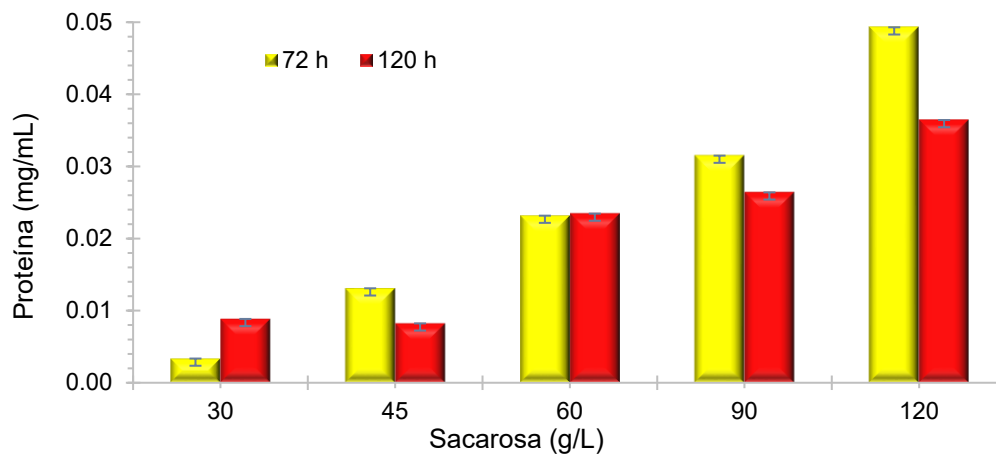


Figura 1. Efecto de la concentración de sacarosa inicial a 72 y 120 h de FMS de *N. crassa*, sobre la producción de proteína extracelular.

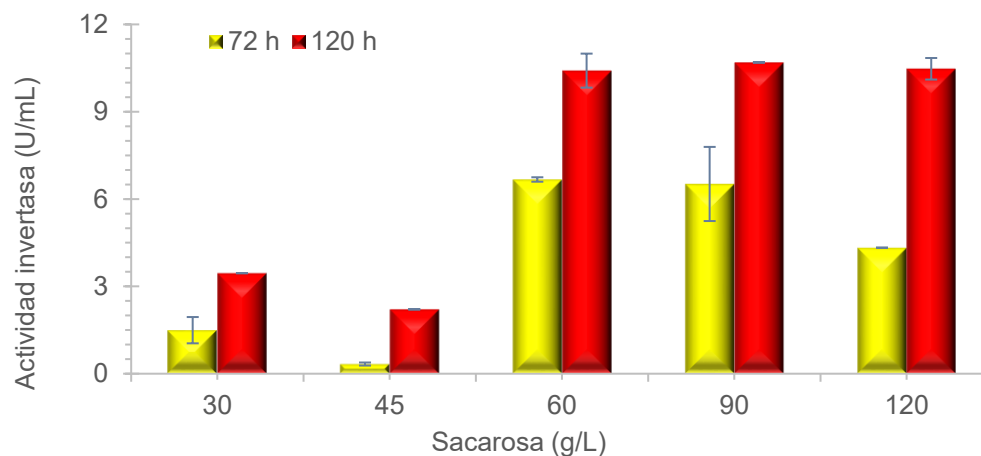


Figura 2. Efecto de la concentración de sacarosa inicial a 72 y 120 h de FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Efecto de los diferentes porcentajes de humedad sobre la producción de invertasa en FMS

La humedad es un factor importante a considerar durante los procesos de FMS, para garantizar un buen crecimiento y producción de metabolitos de interés, como las enzimas. De acuerdo con Montiel-González et al. (2004), niveles muy bajos o muy altos podrían obstaculizar esta producción. Se sabe que una mayor disponibilidad de agua en el sustrato favorece la actividad enzimática, debido a una mejor difusión de nutrientes (Cebrián & Ibarruri, 2023). Por tal motivo, se establecieron dos condiciones de humedad: 55 % y 65 %, con 15 g/L de sacarosa, pH 6.5, tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas/mL, a 30 °C, condiciones similares a lo reportado por Carrillo-Sancén et al. (2016). Al final de las fermentaciones, la humedad disminuyó en promedio 13.87 %, mientras que el consumo de sustrato fue de 83 y 93 %, respectivamente. La actividad invertasa, así como la concentración de proteína (44.56 ± 1.76 U/mL y 0.08 ± 0.01 mg/mL,

respectivamente) fue 1.3 veces mayor cuando la humedad inicial de la FMS fue del 65 % (fig.3). Mientras que a un menor contenido de humedad inicial, la actividad específica fue 2 veces más alta (1140.72 ± 20.05 U/mg). Guerrero-Urrutia et al (2021) reportaron que el contenido de humedad inicial en la FMS no afectó significativamente el crecimiento y la producción de invertasa a partir de *Aspergillus brasiliensis*. Cuando trabajaron con condiciones similares a 20 g/L de sacarosa y un contenido de humedad inicial del 60 %, la actividad enzimática fue la misma (aproximadamente 8 U/mL), mientras que la actividad específica que encontraron fue 21.16 veces más bajas, en comparación con este estudio. Así mismo, Mora et al. (2024) reportaron una actividad enzimática y actividad específica 3.1 y 7.23 veces más baja, a partir de la FMS de *Neurospora crassa* con PUF como soporte, con respecto a este estudio. Mientras que con aserrín la actividad enzimática fue 1.55 veces más alta y la actividad específica fue 17.36 veces más baja, en comparación con este estudio.

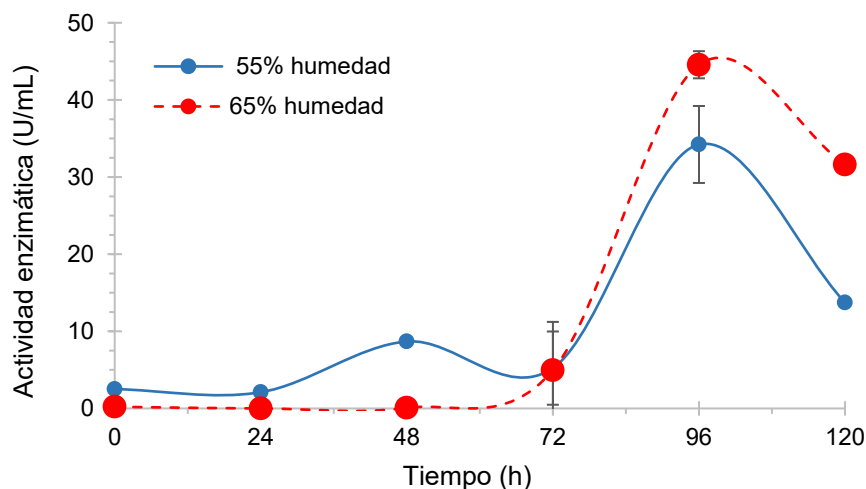


Figura 3. Efecto del porcentaje de humedad inicial (55 y 65%) d la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

El contenido de humedad en los procesos de FMS varía entre 20 y 80 %. Particularmente, para hongos filamentosos, la humedad podría alcanzar entre el 20 y 70 % (Guerrero-Urrutia et al., 2021). Si la humedad es demasiado baja, el crecimiento de hongos disminuye debido a la poca solubilidad de nutrientes y si es muy alta se tienen problemas de transferencia de oxígeno (Cebrián & Ibarruri, 2023). Bajo estas condiciones de humedad inicial, *N. crassa* no presentó estos problemas y fue capaz de mejorar la producción de

invertasa. Es importante considerar estudios adicionales y variables como el crecimiento, para tener un mejor entendimiento del efecto del contenido de humedad sobre este, con la finalidad de mejorar los tiempos de cultivo y maximizar la productividad y el rendimiento de esta enzima en FMS a partir de *N. crassa*.

Efecto de la temperatura sobre la producción de invertasa

La temperatura de un proceso enzimático es un compromiso entre la actividad y la

estabilidad enzimática, porque las altas temperaturas maximizan la actividad; mientras, la estabilidad se puede ver desfavorecida por la inactivación térmica (Illanes, 2008). Es un parámetro crítico que debe controlarse, varía según el organismo y determina el éxito del sistema de optimización (Shankar & Mulimani, 2007). En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de invertasa de *Neurospora crassa* en FMS a 25 y 35 °C (con 15 g/L de sacarosa inicial). En ambas condiciones, la producción de invertasa aumentó hasta un máximo de 20.75 ± 6.67 U/mL y 46 ± 1.63 U/mL, respectivamente (fig. 4). La actividad específica fue 28.87 veces más alta (770.11 ± 26.67 U/mg) con una temperatura de cultivo de 35 °C. Este comportamiento coincidió con Shankar y Mulimani (2007), quienes reportaron una mayor actividad invertasa a 35 °C, a partir de *Aspergillus niger* y *Lactobacillus reuteri*. La

actividad enzimática en este estudio fue 8.15 veces más alta en comparación con lo reportado por Kabir y Ju (2023), con una temperatura de incubación de 40 °C (3.47 ± 0.32 U/mL), utilizando *A. niger* y residuos de cáscara de soja como sustrato, a las 72 h de cultivo. Así mismo, Mora et al. (2024) reportaron una actividad enzimática y actividad específica 5.66 y 14.43 veces más baja con respecto a este estudio, a partir de la FMS de *N. crassa* y 65 h de cultivo, con PUF como soporte. Es importante mencionar que la temperatura más alta provocó una disminución de la concentración de proteína, a las 96 h de cultivo. Esto pudo deberse a un proceso de proteólisis o a la desnaturalización de las proteínas por la temperatura y el tiempo de cultivo. Por ello, es necesario realizar más estudios que confirmen esto, de tal manera que la producción, la actividad y la estabilidad enzimática no se vean afectadas por cambios debidos a la temperatura del cultivo.

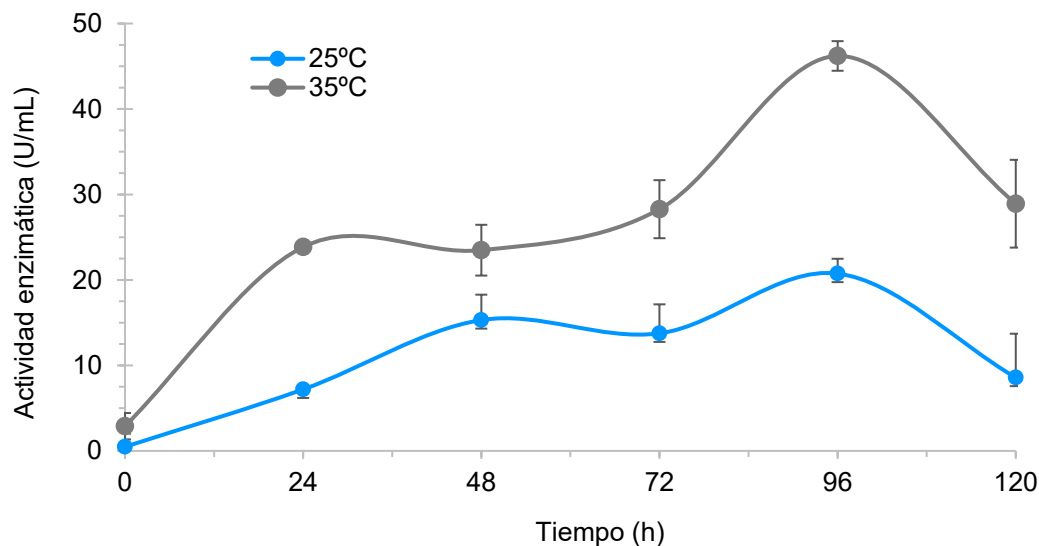


Figura 4. Efecto de la temperatura de la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Efecto del nivel de inóculo sobre la producción de invertasa

El tamaño de inóculo es un factor importante en los procesos microbianos. Niveles inadecuados de este pueden afectar significativamente tanto al crecimiento como a la producción de metabolitos de interés. Por ello, se evaluaron tres tamaños de inóculo: 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas/mL. El nivel de inóculo más grande permitió mantener una actividad promedio de 28.92 U/mL por 72 h y una mayor actividad enzimática al final del

cultivo de 41.38 ± 1.00 U/mL (fig. 5). De igual manera, la actividad específica (1334.80 ± 23.88 U/mg) fue 1.74 y 1.26 veces más alta, en comparación con los niveles de inóculo de 1×10^7 y 1×10^6 esporas/mL, respectivamente (768.18 ± 14.62 y 1060.53 ± 20.82 U/mg, respectivamente). La concentración de proteína fue 1.2 veces más alta (0.07 ± 0.004 mg/mL), pero a las 48 h de cultivo. Estos resultados mostraron un comportamiento similar al reportado para *Aspergillus niger* ATCC20611 en la producción y actividad

inulinasa e invertasa (Dinarvand et al., 2017). De igual manera, se aumentó 5.78 veces la actividad invertasa, en comparación con lo reportado por Mora et al. (2024), empleando

N. crassa en FMS con espuma de poliuretano y 5.95 veces menos de lo reportado empleando *A. niger* LBA 02 a 72 h de cultivo (Ohara et al., 2015).

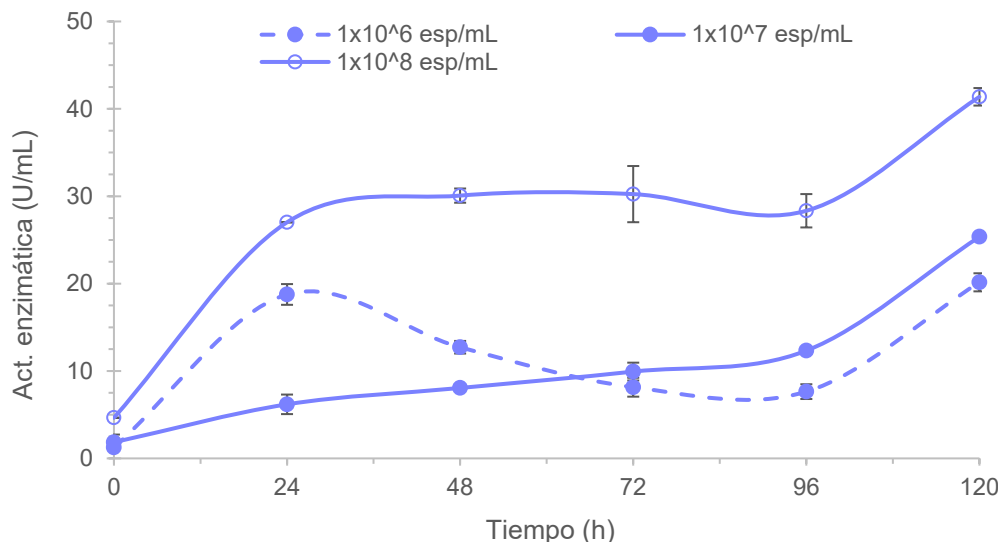


Figura 5. Efecto del nivel de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esp/mL) en la FMS de *N. crassa*, sobre la actividad invertasa.

Conclusiones

Neurospora crassa fue capaz de crecer y producir la enzima invertasa bajo condiciones de FMS, empleando agrolita como soporte natural. La humedad y la temperatura influyeron de manera positiva en la actividad invertasa, mientras que el nivel de inóculo determinó la rapidez y eficiencia del proceso. Además, la disponibilidad del sustrato impactó directamente el rendimiento, mostrando que concentraciones moderadas de éste favorecen la producción y la actividad enzimática, sin generar efectos inhibitorios. Este estudio confirma el potencial de la FMS y de *N. crassa* como un microorganismo prometedor en la biotecnología industrial, abriendo la puerta a futuras investigaciones para optimizar y escalar el proceso, así como evaluar su aplicación en distintos sustratos agroindustriales. Es crucial continuar desarrollando estrategias más eficientes para la producción de enzimas, con el objetivo de fortalecer su uso en la industria biotecnológica y mejorar los procesos productivos.

Referencias

Alhomodi AF, Gibbons WR, Karki B (2022) Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and

submerged state fermentation of raw and processed canola meal. Bioresource Technology Reports 18: 101063. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101063>

Alves JN, Jorge, JA, Guimarães LHS (2013) Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emmericella nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. Advances in Microbiology 3(5): 421-429. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.35057>

Andjelkovic U, Lah J. (2011) Thermodynamics and structural features of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms in guanidinium-chloride solutions. Journal of agricultural and food chemistry 59(2):727-732. <https://doi.org/10.1021/jf103441p>

Arooj S, Iftikhar T, Mustafa S, Ullah N, Sarwar A, Nelofer R, Rahman S, Aziz T, Alharbi M, Alshammari A, Alasmari A (2023) Correction to: Optimization of critical medium components for lipase production by *Neurospora crassa* in solid state fermentation. Biomass Conversion and Biorefinery 15: 3113. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-05178-6>

Boondaeng A, Keabpimai J, Trakunjae C, Vaithanomsat P, Srichola P, Niyomvong N (2024). Producción de celulasa bajo fermentación en estado sólido por *Aspergillus* sp. IN5: Optimización de parámetros y aplicación. *Heliyon* 10(5): e26601. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26601>

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Carrillo-Sancén G, Carrasco-Navarro U, Tomasini-Campocoso A, Corzo G, Pedraza-Escalona MM, Favela-Torres E (2016) Effect of glucose as carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during amylase production by solid-state culture. *Process Biochemistry*, 51(12): 2001-2010 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.001>

Castro RJS, Nishide TG, Sato HH (2014) Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(4): 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.001>

Cebrián M & Ibarruri J (2023) Filamentous fungi processing by solid-state fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery* 251-292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00003-X>

Chilakamaray CR, Sakinah AMM, Zularisam A W, Sirohi R, Khilji IA, Ahmad N, Pandey A (2022) Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 343: 126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>

de Castro AM, dos Santos AF, Kachrimanidou V, Koutinas AA, Freire D MG (2018) Solid-State Fermentation for the Production of

Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 185-210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00010-4>

Dinarvand M, Rezaee M, Foroughi M (2017) Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology* 48(3): 427-441. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.026>

Giraldo, M. A., Silva, T. M., Salvato, F., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2012). Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0837-9>

Guerrero-Urrutia C, Volke-Sepulveda T, Figueroa-Martinez F, Favela-Torres E (2021) Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 108: 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.014>

Havlik D, Brandt U, Bohle K, Fleiner A (2017) Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product. *Microbial Cell Factories* 16(128). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0734-5>

Illanes A (2008) *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>

Toledo LE, García DM, Cruz EP, Intriago LM, Pérez JN, Chanfrau JM (2019). Fructosyltransferases and invertases: useful enzymes in the food and feed industries. *Enzymes in food biotechnology* 1:451-69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00026-8>

Kabir MF & Ju LK (2023) On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry* 130: 734–746.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>

Kabir MF, Bochenek C, Wesdemiotis C, Ju LK (2025) Reaction pathways and integral kinetics for the hydrolysis of soy oligosaccharides by α -galactosidase and invertase. *Process Biochemistry* 150: 357–370.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.01.021>

Kuo H, Hui S, Choi J, Asiegbu FO, Valkonen JPT, Lee YH (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Scientific Reports*, 4(51359).

<https://doi.org/10.1038/srep05135>

Li Q, Loman AA, Callow NV, Islam SMM, Ju LK (2018) Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase, α -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. *Biochemical Engineering Journal*, 137: 247–254.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.008>

Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in Applied Microbiology*, 51: 81-106.

[https://doi.org/10.1016/S0065-164\(02\)51002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-164(02)51002-9)

Macris BJ, Kekos D, Evangelidou X (1989) A simple and inexpensive method for cellulase and β -glucosidase production by *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31(2): 150–151.

<https://doi.org/10.1007/BF00262453>

Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 1(2): 127-132.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)

Montiel-González AM, Viniegra-González G, Fernández FJ, Loera O (2004) Efecto de la actividad del agua en la producción de invertasa en fermentación en estado sólido mediante cepas diploides mejoradas de *Aspergillus niger*. *Bioquímica de procesos* 39: 2085-2090,

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.013>

Mora-Pérez CJ, Sánchez-Ruiz MC, Salgado-Bautista D, Carrasco-Navarro U, Favela-Torres E (2024) Growth and invertase production by *Neurospora crassa* in submerged and solid-state cultures. *Mexican Journal of Biotechnology* 9(3): 20-35.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.3.20>

Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84(8): 1246–1249.

<https://doi.org/10.1002/JCTB.2142>

Nadeem H, Hamid M, Hussnain M, Azeem F, Muzammil S, Rizwan M, Amjad M, Rasul I, Riaz M (2015) Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry* 50(8): 1202–1210,

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.015>.

Nobre C, Castro C, Hantson A-L, Teixeira J, De Weireld G, Rodrigues L (2016) Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydrate polymers*.136:274-281.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.088>

Ohara A, De Castro RJS, Nishide TG, Dias FFG, Bagagli MP, Sato HH (2015) Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(4): 645-652.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.008>

Oviedo JC, Casas AE, Valencia JA, Zapata JE (2014) Analysis of Biomass Measurement in Solid-State Fermentation using Neural Networks and a Logistic Model. *Información tecnológica*, 25(4).

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400016>

Artículos

Ray RC & Behera SS (2017) Solid state fermentation for production of microbial cellulases. En R. C. Ray & Rosell (Eds.) *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (pp. 43–79). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0>

Rodríguez CS & Sanromán MÁ (2006) Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3): 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

Romero-Gómez S, Augur C, Viniegra-González G (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22: 1255–1258, <https://doi.org/10.1023/A:1005659217932>

Saraswathy N & Ramalingam P (2011) Genomas de organismos modelo. En *Conceptos y Técnicas en Genómica y Proteómica* (pp. 29–48). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.29>

Selker EU (2017) *Neurospora crassa*. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 61–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06790-X>

Shankar SK & Mulimani VH (2007) Alpha galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*; 98: 958–961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.013>

Verma N & Kumar V (2020) Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates on cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran-based solid-state fermentation. *Bioresource Technology Reports*, 25, e00416. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>

Wikandari R, Manikhanda Dewanti-Hariyadi R, Taherzadeh MJ (2023) Filamentous fungi for food. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery* (pp. 343–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00007-7>

Zheng L, Yu X, Wei Ch, Qiu L, Yu Ch, Xing Q, Fan Y, Deng Z (2020) Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *LWT* 122: 108990. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108990>