

Producción de invertasa por *Neurospora crassa* en fermentación en estado sólido con aserrín de pino como soporte natural

Ninel Guardado-Gutiérrez¹, Daira Estrella-Rodríguez¹, Nancy Velasco-Alvarez¹, 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, Mexico.

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

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

Resumen

La fermentación en estado sólido (FES) se ha consolidado como una estrategia biotecnológica sostenible y económicamente viable para la producción de enzimas de alto valor agregado. En este estudio se evaluó la producción de invertasa por *Neurospora crassa*, utilizando aserrín de pino como soporte natural en condiciones de FES. Se analizaron parámetros fisicoquímicos como la concentración de sacarosa como sustrato, el contenido de humedad, la temperatura de incubación, el tamaño de inóculo y la ausencia de sacarosa, sobre la producción de invertasa. *N. crassa* fue capaz de asimilar concentraciones altas de sacarosa (30-120 g/L), con una mayor producción de invertasa (29.59 ± 0.04 U/mL) a 30 g/L. La humedad inicial del cultivo a 65 % y la temperatura de incubación de 35 °C, afectaron de manera positiva la producción de la enzima invertasa (64.03 ± 5.70 U/mL y 168.23 ± 1.05 U/mL, respectivamente). Además, una concentración de inóculo de 1×10^7 conidios/mL permitió tener títulos enzimáticos de 146.14 ± 11.45 U/mL. Por último, *N. crassa* fue capaz de utilizar el aserrín como soporte natural y sustrato para la FES, con una producción enzimática de 142.37 ± 0.11 U/mL, lo que sugiere que la composición química del aserrín proporciona una fuente alternativa de carbono suficiente para sustentar el metabolismo fúngico. Estos hallazgos destacan el potencial de la FES como una plataforma biotecnológica ecológica y económicamente ventajosa para la biosíntesis de enzimas, contribuyendo a la valorización de residuos agroindustriales lignocelulósicos, y a la optimización de los costos de producción en la industria enzimática.

Palabras Claves: Fermentación en estado sólido, *Neurospora crassa*, invertasa, aserrín de pino, sacarosa.

Abstract

Solid state fermentation (SSF) has been consolidated as a sustainable and economically viable biotechnological strategy for the production of high value-added enzymes. In this study, the production of invertase by *Neurospora crassa* was evaluated, using pine sawdust as a natural support under SSF conditions. Physicochemical parameters such as sucrose concentration as substrate, moisture content, incubation temperature, inoculum size and absence of sucrose were analyzed on the production of invertase. *N. crassa* was able to assimilate high sucrose concentrations (30-120 g/L), with higher invertase production (29.59 ± 0.04 U/mL), at 30 g/L. Initial culture humidity at 65 % and incubation temperature of 35 °C positively affected invertase enzyme production (64.03 ± 5.70 and 168.23 ± 1.05 U/mL, respectively). Furthermore, an inoculum concentration of 1×10^7 conidios/mL resulted in enzyme titers of 146.14 ± 11.45 U/mL. Finally, *N. crassa* was able to utilize sawdust as a natural support and substrate for SSF, with an enzyme production of 142.37 ± 0.11 U/mL, suggesting that the chemical composition of sawdust provides an alternative carbon source sufficient to sustain fungal metabolism. These findings highlight the potential of SSF as an environmentally friendly and economically advantageous biotechnological platform for enzyme biosynthesis, contributing to the valorization of lignocellulosic agroindustrial residues and optimizing production costs in the enzyme industry.

Key Words: Solid state fermentation, *Neurospora crassa*, invertase, pine sawdust, saccharose

Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) se define como el crecimiento de microorganismos en ausencia de una fase acuosa libre. Este proceso representa una alternativa eficiente a la fermentación en estado líquido (FEL) para la síntesis de productos de alto valor agregado, ya que ofrece algunas ventajas sobre la FEL. Estas ventajas incluyen una menor represión catabólica e inhibición por sustrato (Aguilar et al., 2001; Salgado-Bautista et al., 2020), la cantidad de agua disponible en el sistema, menor proteólisis, mayores rendimientos enzimáticos y productividades volumétricas así como productos más estables y bajos costos de producción (Viniestra-González et al., 2003; Volke-Sepúlveda et al., 2016; Dobrev et al., 2018). Tanto bacterias como hongos pueden desarrollarse en sustratos sólidos, aunque los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados a este tipo de cultivo. Estos microorganismos son usados para producir algunas proteínas y enzimas industriales como celulasas, pectinasas, proteasas, lipasas, inulinasa e invertasa, entre otras (Aguilar et al., 2002; Alves et al., 2013; Guerrero-Urrutia et al., 2021; Singh et al., 2021; Kumar et al., 2023; Zheng et al., 2020), así como metabolitos secundarios incluidos la penicilina y la cefalosporina (Fierro et al., 2022). En particular, *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso de rápido crecimiento, cuyo micelio puede expandirse a una velocidad de 4 mm/h a temperaturas de 30 a 32 °C, y ha cobrado interés por su capacidad para crecer tanto en FEL como en FES. Se ha reportado la relación de enzimas y genes de *N. crassa* (Beadle & Tatum, 1941), así como su capacidad de producir diversas enzimas hidrolíticas en FES como; amilasas a partir de residuos de café (Murthy et al., 2009), celulasas y hemicelulasas a partir de paja y salvado de trigo (Dogaris et al., 2009), proteasas a partir de pulpa de soja (Volke-Sepúlveda et al., 2016) y lipasas a partir de harina de mostaza (Arooj et al., 2023). Alhomodi et al. (2022), demostraron que la producción de β -glucosidasa y celulasa con *N. crassa* cultivado en FES con semilla de canola fue mayor que la obtenida en FEL.

Entre las enzimas producidas por *Neurospora crassa* se encuentra la invertasa (EC 3.2.1.26), la cual cataliza la hidrólisis de la

sacarosa en glucosa y fructosa (Nadeem et al., 2015). Su uso es ampliamente reconocido en las industrias farmacéutica y alimentaria, especialmente en la producción de confitería, incluyendo chocolates, bombones, miel sintética, mermeladas y otros productos similares (Ashokkumar et al., 2001). Asimismo, la invertasa es utilizada en la fabricación de edulcorantes artificiales y en la industria cervecera (Manoochchri et al., 2020). Algunas invertasas con actividad fructosiltransferasa pueden aplicarse en la producción de fructooligosacáridos (FOS), azúcares con propiedades prebióticas. La invertasa también se utiliza en la producción de miel artificial, agentes plastificantes utilizados en cosméticos, medicamentos y la industria papelera. Recientemente, la enzima también ha encontrado aplicación en la construcción de electrodos para la detección de niveles de sacarosa (Lazar et al., 2011) y en la conversión de celulosa a ácido itacónico (Zhao et al., 2018). En general, las invertasas fúngicas han atraído la atención de diferentes sectores industriales debido a su potencial biotecnológico (Alhomodi et al., 2022; Roche et al., 2014).

La fermentación en estado sólido ha cobrado gran relevancia en la producción de enzimas debido a sus ventajas propias, tales como un menor costo y un mayor rendimiento en comparación con los métodos convencionales (Ohara et al., 2015). En particular, el uso de residuos agroindustriales como sustrato ha despertado un gran interés debido a su disponibilidad y bajo costo. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la producción de invertasa por *Neurospora crassa* bajo diferentes condiciones de cultivo sólido, utilizando aserrín como soporte natural.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó el microorganismo *Neurospora crassa* FGSC#9717 ($\Delta mus-51::bar^+$; *mat A his-3*), el cual se inoculó 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 cultivos se incubaron a 30 °C por 4 días. Los conidios se recuperaron con 30 mL de Tween 80 estéril al 0.01 % (v/v). Posteriormente, se utilizaron 500 mL de la suspensión de conidios para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL

Artículos

que contenían 50 mL de medio Vogels con 1.5 % de sacarosa y 1.5 % de agar. Después de 4 días a 30 °C, se recolectaron los conidios que fueron utilizados como inóculo para los cultivos en la fermentación en estado sólido (FES).

Fermentación en Estado Sólido (FES)

Se utilizó aserrín de pino (tamaño de partícula de 2.38–1.19 mm) el cual se lavó dos veces con agua caliente de grifo, seguido de dos enjuagues con agua destilada. Posteriormente, se secó a 60 °C y se empleó como soporte sólido para la FES. La composición del medio base fue (g/L): sacarosa, 15; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30; KH_2PO_4 (anhidro), 50; NH_4NO_3 (anhidro), 20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1. Además, se añadió 1 mL de solución de elementos traza, 0.5 mL de solución de biotina y 1 mL de cloroformo. Tanto el soporte como el medio de cultivo se esterilizaron durante 15 min a 121 °C. Los matraces Erlenmeyer (250 mL) con 10

g de aserrín seco se humedecieron con 15 ± 1 mL de medio de cultivo inoculado (1×10^7 conidios por mL), obteniendo un contenido de humedad inicial del 60 %. Se hizo un estudio para FES (Fig. 1) a 30 °C con sacarosa a 30, 45, 60, 90 y 120 g/L. Después, se hicieron cultivos con 15 g/L de sacarosa y se evaluaron condiciones de humedad inicial de 55 y 65 %, con una temperatura de cultivo de 30 °C. Así mismo, cultivos con 30 g/L de sacarosa y un contenido de humedad inicial de 60 % fueron incubados a 25 y 35 °C, evaluando así el efecto de la temperatura sobre la producción enzimática. Posteriormente, se hicieron FES con 30 g/L de sacarosa y tres niveles de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios por mL), con una humedad inicial del 60 % y una temperatura de cultivo de 30 °C. Finalmente, se llevó a cabo un estudio comparativo empleando el medio de cultivo con (15 g/L) y sin sacarosa, para evaluar su impacto sobre el crecimiento y la producción de invertasa.



Figura 1. FES de *Neurospora crassa*.

Recuperación de la proteína extracelular

La proteína extracelular se recuperó adicionando 100 mL de agua destilada a cada matraz, enseguida se agitó en vórtex por 5 min y después el contenido de cada matraz 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 proteicos 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 sobre los extractos proteicos crudos. La mezcla de reacción contenía 0.02 mL de extracto de

proteína y 0.180 mL de sacarosa 0.1 M. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 15 min (Guerrero-Urrutia et al., 2021) y la reacción se detuvo añadiendo 0.3 mL de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS). Los azúcares reductores (AR) liberados se cuantificaron de acuerdo con Miller et al. (1960). Una unidad de actividad invertasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de AR por minuto, bajo estas condiciones de estudio. 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 DuBois (1956).

Los valores de pH se midieron mediante potenciometría (PHS-3BW, BANTE Instruments) y el contenido de humedad (datos no mostrados) se cuantificó con una termobalanza (MB45, OHAUS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de sustrato en la FES sobre la producción enzimática

La producción de invertasa por fermentación en medio sólido fue evaluada utilizando *Neurospora crassa* en presencia de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa y un tiempo de cultivo de 120 h. Bajo estas condiciones de estudio, se presentó un consumo de sustrato de entre 72 y 88 %. Los

mejores títulos de actividad enzimática se obtuvieron a concentraciones extremas de sacarosa de 30 y 120 g/L, con valores de 29.59 ± 0.04 y 23.92 ± 0.31 U/mL de extracto enzimático (Fig. 2) y una actividad específica de 739.67 ± 0.02 y 598.06 ± 0.16 U/mg, respectivamente. Este comportamiento podría sugerir que la producción de invertasa en *Neurospora crassa* bajo condiciones de fermentación en medio sólido responde a la disponibilidad de sustrato de manera dual: a bajas concentraciones de sacarosa, el hongo incrementa la síntesis de invertasa para facilitar el acceso a la fuente de carbono; mientras que, a concentraciones elevadas, la elevada presencia del sustrato podría inducir una producción adicional de la enzima para gestionar eficientemente su metabolismo.

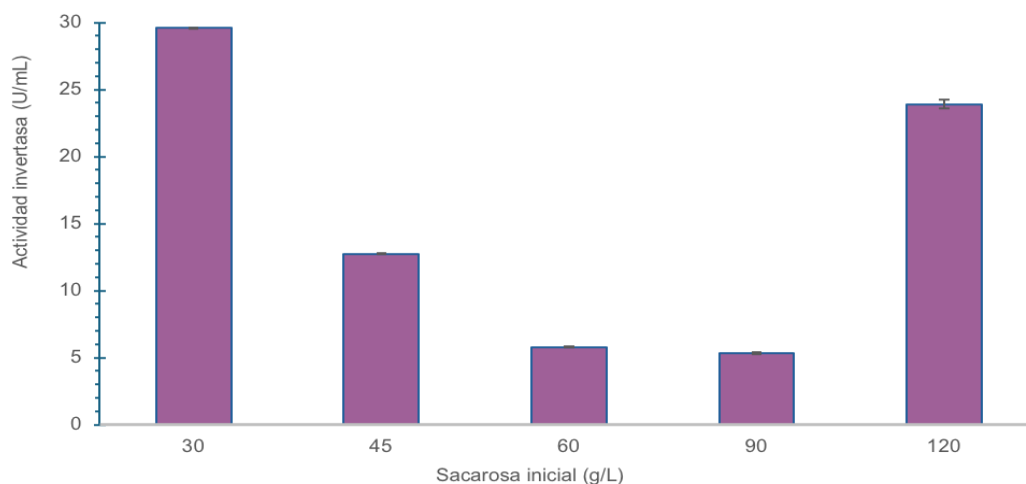


Figura 2. Producción de invertasa de *N. crassa* cultivada en condiciones de FES a diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Mora-Pérez et al. (2024), empleando el mismo microorganismo, sustrato y soporte en FES, se observó una diferencia importante en la actividad enzimática en función de la concentración de sacarosa y del tiempo de cultivo. De acuerdo con dicho estudio, al emplear una concentración de sacarosa del 3 % obtuvieron una actividad enzimática de 10 U/mL, la cual se incrementó a 14 U/mL con 5 % de sacarosa, pero en un menor tiempo de cultivo (30-35 h). En contraste, en este estudio, al aumentar la concentración de sustrato a 4.5 %, la actividad disminuyó a 12.74 ± 0.05 U/mL, lo que difiere del patrón observado en el estudio de Mora-Pérez et al. (2024), pero no así en los títulos de actividad invertasa. Este patrón contrasta también con lo reportado

para otros hongos filamentosos, como por ejemplo en un estudio empleando *Aspergillus brasiliensis* (Guerrero-Urrutia et al., 2021) en FES se observó que al aumentar la concentración de sacarosa de 20 a 210 g/L en el medio de cultivo, la actividad invertasa también aumentó de manera proporcional (41.69 ± 3.6 U/mL), lo cual concuerda con la evidencia de que la FES reduce la represión de catabolitos y la inhibición de sustrato, permitiendo una mayor producción de enzimas en comparación con la FEL (Aguilar et al., 2002). Esta diferencia podría atribuirse a particularidades metabólicas y regulatorias propias de *N. crassa*, incluyendo mecanismos específicos de detección y utilización de carbohidratos, así como su fisiología asociada al crecimiento en medios sólidos. Estudios adicionales enfocados en la regulación génica

y la cinética metabólica de *N. crassa* en sistemas de FES, permitirían esclarecer estos mecanismos y optimizar las condiciones de fermentación para maximizar la producción de invertasa.

Efecto del contenido de humedad inicial sobre la producción enzimática

El contenido de humedad del sustrato es esencial para el crecimiento de microorganismos durante el proceso de FES. El nivel de humedad en los procesos fermentativos cumple funciones muy importantes, como disolver homogéneamente los nutrientes del medio y facilitar su acceso a la célula, además de disolver los productos del metabolismo cuando se excretan al medio (Carrasco et al., 2003). Un menor contenido de humedad reduce la solubilidad del sustrato y los nutrientes, mientras que la aglomeración de partículas ocurre con un mayor contenido de humedad, lo que reduce aún más la transferencia de oxígeno (Ohara et al., 2015). Cuando el contenido de humedad es muy alto, disminuye la porosidad del sustrato y el volumen de gas entre las partículas, lo que dificulta su efecto intercambiante y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana (Carrasco et al., 2003). Típicamente, la humedad óptima para el crecimiento de cepas de hongos en FES está en el intervalo de 50-70 % p/p (Dobrev et al., 2018). Por tal motivo, se establecieron dos condiciones de humedad: 55 % y 65 %, empleando sacarosa como sustrato al 1.5 %, un inóculo de 1×10^7 esporas/mL de medio de cultivo, a un pH de 6 y una temperatura de incubación de 30 °C. Al final de las FES, el contenido de humedad para ambas condiciones disminuyó en promedio un 20 %, mientras que la actividad enzimática aumentó en ambos casos, como se observa en la Figura 3. En esta condición (55 % humedad), tras 96 h de fermentación se

consumió el 78.36 ± 1.14 % del sustrato inicial, obteniendo 0.07 ± 0.01 mg/mL de proteína extracelular, una máxima actividad enzimática de 43.39 ± 2.62 U/mL y una actividad específica de 619.87 ± 1.32 U/mg. Mientras que para un 65 % de humedad inicial en la FES, el sustrato consumido fue del 93.1 ± 0.67 %, con una concentración de proteína extracelular de 0.12 ± 0.01 mg/mL, una actividad enzimática de 64.03 ± 5.70 U/mL y con una actividad específica de 533.61 ± 2.86 U/mg. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Guerrero-Urrutia et al. (2021), en donde observaron que los cambios iniciales en el contenido de humedad no afectaron de manera negativa el crecimiento fúngico ni la producción de enzimas. En contraste, cuando se presenta un aumento en la humedad con respecto a la inicial, se generan condiciones desfavorables, como es el caso de un estudio con *Trichoderma viride* (Carrasco et al., 2003), en donde la humedad inicial (70 %) se elevó debido a la condensación dentro del biorreactor. Como resultado, la producción de las enzimas endo y exo 1,4- β -glucanasa a las 72 h de cultivo disminuyó (3.5077 y 0.6067 U/mL, respectivamente). Esto indica que cada microorganismo tiene un intervalo óptimo de humedad, y sobrepasarlo puede afectar negativamente el crecimiento y la producción de enzimas. Es importante resaltar que en los procesos de FES la concentración de producto basado en la masa del soporte inerte puede ser un criterio de diseño y sólo ocurre con soportes con una alta relación de capacidad de retención de agua y contenido de humedad crítica (WHC/CMC) (Mora-Pérez et al., 2024) y el aserrín, a diferencia de la espuma de poliuretano (PUF) por ejemplo, tiene una CMC baja.

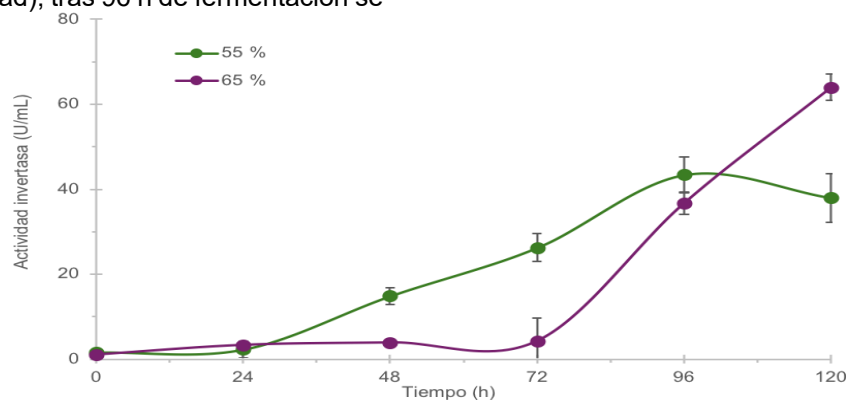


Figura 3. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES a diferentes porcentajes de humedad inicial.

Efecto de la temperatura de la FES sobre la producción de invertasa

La temperatura es un factor importante que rige el crecimiento microbiano. Cada microorganismo crece en un intervalo de temperatura particular, produciendo metabolitos secundarios y enzimas (Perwez & Asheh, 2024). En este sentido, se evaluó el efecto de la temperatura de cultivo (25 y 35 °C) sobre la producción de invertasa en FES. Independientemente de la temperatura, la producción de invertasa aumentó (Figura 4) hasta alcanzar un valor máximo de 96.58 ± 10.24 U/mL al cabo de 96 h, con una concentración de proteína extracelular de 0.07 ± 0.03 mg/mL y una actividad específica de 1379.75 ± 5.14 U/mg, para la temperatura de cultivo de 25 °C. Mientras que, cuando la temperatura de cultivo fue de 35 °C se presentó una producción enzimática de 168.23 ± 1.05 U/mL a las 72 h, con una concentración de proteína extracelular de

0.06 ± 0.009 y una actividad específica de 18692.60 ± 0.53 U/mg. Mora et al en 2024 llevó a cabo un estudio con *Neurospora crassa* bajo las mismas condiciones a una temperatura de cultivo de 30 °C y 25 h de cultivo y reportaron una producción de invertasa de 1.89 y 2.79 veces más baja que lo encontrado en este estudio a 24 h de cultivo. Este comportamiento coincide también con lo observado por Rodríguez et al. (2012), quienes encontraron que la producción de lipasas por *Rhizopus microsporus* aumentó al aumentar la temperatura de cultivo hasta 35 °C. En otro estudio en condiciones similares empleando *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 y agrolita como soporte (Guerrero-Urrutia et al., 2021), se reportó una producción de invertasa de 41.69 ± 3.60 U/mL. Esto evidencia que la regulación térmica juega un papel determinante en la actividad metabólica de los hongos.

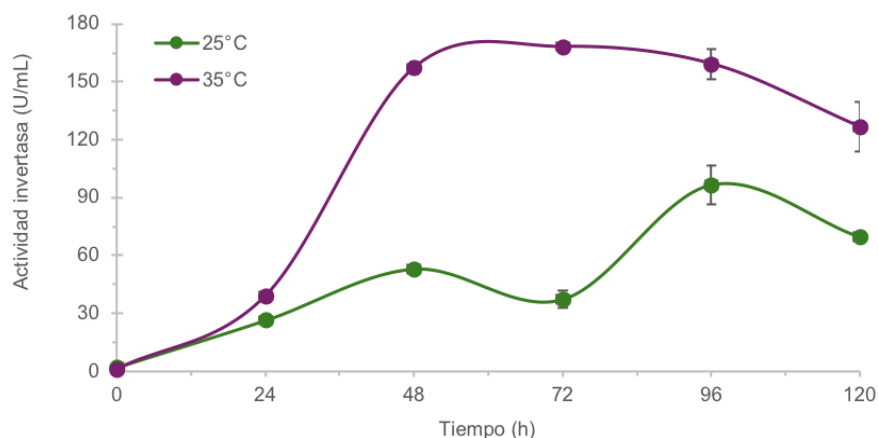


Figura 4. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES a diferentes temperaturas de cultivo.

Efecto del tamaño de inóculo sobre la producción de invertasa

Otro factor determinante en los procesos de fermentación en estado sólido es el tipo y tamaño de inóculo, así como la estrategia de inoculación utilizada (Perwez & Asheh, 2024). En este estudio, se evaluaron tres niveles de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL). Para el nivel más bajo de inóculo, la máxima actividad enzimática fue de 77.72 ± 3.23 U/mL (Fig. 5) con una concentración de proteína extracelular de 0.058 ± 0.0015 mg/mL y una actividad específica de 1340.01 ± 1.62 U/mg. Mientras que, con los dos niveles de inóculo más altos, la producción enzimática aumentó 2 veces (146.14 ± 11.45 y 143.74 ± 5.91 U/mL, respectivamente) así como la concentración

de proteína extracelular (0.079 ± 0.0092 y 0.109 ± 0.0126 mg/mL, respectivamente) y la actividad específica (1849.84 ± 5.73 y 1084.34 ± 2.96 U/mg, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, donde se ha observado que un tamaño de inóculo pequeño conduce a una menor densidad celular inicial, lo que retrasa el aprovechamiento eficiente del sustrato y, por lo tanto, la producción del metabolito de interés. Por el contrario, al aumentar el tamaño del inóculo, se favorece una colonización más rápida. Sin embargo, cuando el inóculo excede cierto umbral, pueden presentarse limitaciones en la transferencia de masa y una reducción en la actividad metabólica, lo cual explica por qué el

mayor nivel de inóculo no generó un aumento en la producción enzimática (Perwez & Asheh, 2024). Así mismo, en este estudio se logró aumentar 29.23 veces la producción de invertasa por *Neurospora crassa*, en comparación con un reporte con el mismo microorganismo empleando PUF (5 U/mL) (Mora-Pérez et al., 2024). En condiciones similares, un estudio sobre la producción de invertasa con *Aspergillus niger* LBA 02 (Ohara et al., 2015) reportó una actividad enzimática de 59.04 ± 6.21 U/mL a las 72 h de cultivo, con 50 % de humedad inicial, 30 °C y un nivel de inóculo de 1×10^7 esporas/gmsi (equivalente a 1.5×10^7 esporas/gmsi en este estudio). En

contraste, en el presente estudio, se obtuvo una producción de invertasa 2.14 veces mayor a las 72 h de cultivo, lo que indica una mejora en las condiciones de producción. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un aumento en el tamaño del inóculo puede reducir la actividad metabólica, lo que sugiere que 1×10^7 esporas/mL es un tamaño adecuado para una mayor producción de invertasa, no solo para *N. crassa*, sino también para *A. niger*. Estos resultados resaltan la importancia de un adecuado ajuste del inóculo para maximizar la producción enzimática en distintos sistemas de fermentación.

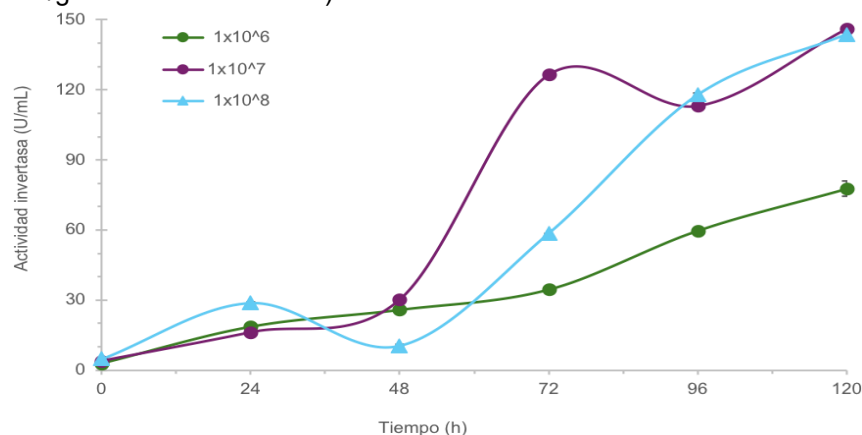


Figura 5. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES con diferentes concentraciones de inóculo.

Efecto del soporte natural en la FES sobre la producción de invertasa

Se evaluó el efecto del aserrín como soporte natural en FES sobre la producción de invertasa, sin interferencias debidas a inductores como la sacarosa. Para ello se hicieron FES con y sin sacarosa en el medio de cultivo. La producción de invertasa (Fig. 6), así como la concentración de proteína y la actividad específica (142.37 ± 0.11 U/mL, 3.31 ± 0.04 mg/mL y 42.96 ± 0.07 U/mg, respectivamente) se vieron favorecidas por la ausencia de sacarosa en el medio de cultivo. Mientras que, en presencia de sacarosa, tanto la actividad enzimática como la actividad específica disminuyeron 1.58 y 1.8 veces, respectivamente. Sin embargo, la producción de invertasa a las 24 h de cultivo con sacarosa fue 5.2 y 23.4 veces más alta que lo reportado por Mora-Pérez et al. (2024), usando aserrín de pino y PUF, respectivamente. El aserrín de pino puede ser un modelo de soporte natural para la producción de enzimas, ofreciendo una solución al problema de la disposición

final de estos residuos para minimizar el impacto negativo al medio ambiente. En la literatura se destaca que los residuos agroindustriales poseen características fisicoquímicas adecuadas para ser utilizados como sustratos en bioprocesos de fermentación en estado sólido. Su composición química, caracterizada por la presencia de polisacáridos, constituye una fuente de carbono clave para el desarrollo microbiano (Machado & Brieva, 2014). La información disponible sobre este tema resalta la necesidad de realizar más estudios para profundizar en el conocimiento de este fenómeno. Hasta donde sabemos, no existen reportes sobre la producción de invertasa en FES empleando aserrín de pino como soporte natural, sin sacarosa como inductor. Por ello, es recomendable continuar con investigaciones adicionales que permitan comprender mejor los mecanismos involucrados y mejorar las condiciones para su aplicación en distintos contextos.

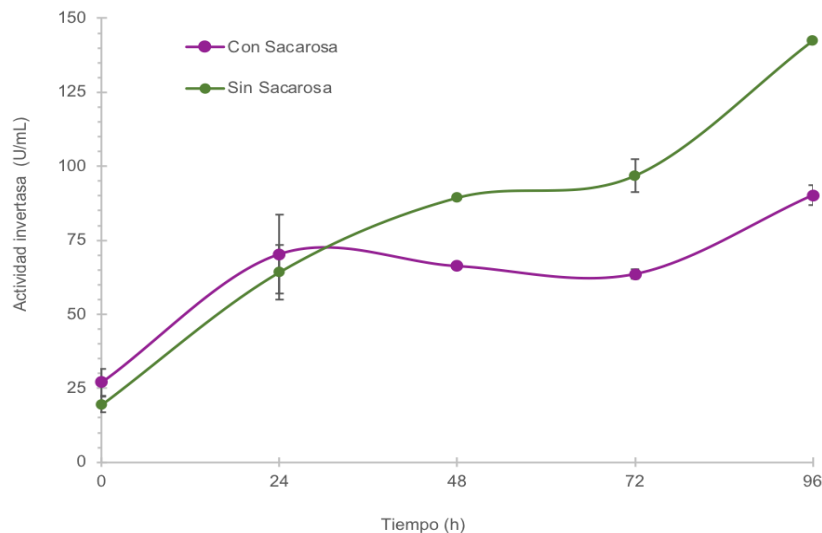


Figura 6. Cinética enzimática de *N. crassa* cultivada en FES con aserrín de pino en presencia y ausencia de sacarosa.

Conclusiones

Neurospora crassa produce invertasa en FES a diferentes concentraciones de sacarosa. El aumento en el contenido de humedad inicial, en la temperatura del cultivo así como en el tamaño de inóculo, promueve una mayor producción de invertasa. La ausencia de sacarosa exógena no afecta negativamente la biosíntesis enzimática; por el contrario, se proporciona evidencia de que la FES constituye una estrategia altamente eficaz para la producción de invertasa por *N. crassa*, aprovechando el aserrín de pino como soporte natural. Esta investigación resalta la relevancia industrial de la FES como una alternativa escalable y sostenible a la SmF. La reutilización de residuos agroindustriales como sustratos en la producción enzimática no solo reduce los costos de fabricación, sino que también se alinea con los principios de la bioeconomía circular y la valorización de desechos. Es necesario enfocarse en el estudio de los mecanismos moleculares y regulatorios subyacentes a la biosíntesis de invertasa en *N. crassa* bajo condiciones de FES, así como en la mejora del proceso a través de la ingeniería metabólica y el diseño de biorreactores. Estos avances podrían potenciar aún más la eficiencia y la aplicabilidad de las enzimas producidas mediante FES en la industria alimentaria, farmacéutica y de biocombustibles.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Referencias

- Aguilar CN, Augur C, Favela-Torres E, Viniegra-González G (2001) Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36(6): 565-570.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00251-X)
- Aguilar, CN, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Augur C (2002) Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102: 407-414.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:407>
- 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 (*Emericella nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. *Advances in Microbiology* 3(5): 421-429.

<http://doi.org/10.4236/aim.2013.35057>

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>

Ashokkumar B, Nagarajan K, Paramasamy G (2001) Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 37(4): 331-338.

DOI: [10.1016/S0032-9592\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00204-7)

Beadle GW, Tatum EL (1941) Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 27(11): 499-506.

<https://doi.org/10.1073/pnas.27.11.499>

Carrasco T, Valiño E, Ibarra A, García Y, Pérez T (2003) Efecto negativo de la humedad en la fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37(1): 37-41.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018072006>

Dobrev G, Strinska H, Hambarliiska A, Zhekova B, Dobrova V (2018) Optimization of Lipase Production in Solid-State Fermentation by *Rhizopus arrhizus* in Nutrient Medium Containing Agroindustrial Wastes. *The Open Biotechnology Journal* 12(1), 189-203.

<https://doi.org/10.2174/1874070701812010189>

Dogaris I, Vakontios G, Kalogeris E, Mamma D, Kekos D (2009) Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of

sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products* 29(2-3): 404-411.

<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2008.07.008>

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Roberts PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.

<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Fierro F, Vaca I, Castillo NI, García-Rico RO, Chávez R (2022) *Penicillium chrysogenum*, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology. *Microorganisms*. 10(3): 573.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030573>

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>

Kumar A, Verma V, Dubey VK, Srivastava A, Garg SK, Singh VP, Arora PK (2023) Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in Microbiology* 14:1142536.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142536>

Lazar Z, Walczak E, Robak M (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresource Technology*, 102(13): 6982-6989.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.032>

Machado GJ & Brieva JL (2014) Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales.

<https://revistas.fondoeeditorial.uru.edu/index.php/tecnocientificauru/article/view/ferremachadobrievan7a14>

Manoochchhri H, Hosseini N, Saidijam M, Taheri M, Rezaee H, Nouri F (2020) A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 25, 101599.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>

Artículos

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)

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: 1202–1210,

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

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>

Perwez M, & Asheh SA (2024) Valorization of Agro-Industrial waste through Solid-State Fermentation: Mini Review. *Biotechnology Reports* 45: e00873.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>

Roche CM, Glass NL, Blanch HW, Clark DS (2014) Engineering the filamentous fungus *Neurospora crassa* for lipid production from lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 111(6): 1097–1107.

<https://doi.org/10.1002/bit.25211>

Rodríguez BEH (2012) Caracterización bioquímica de lipasas producidas por hongos termotolerantes en fermentación en medio sólido. Tesis Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. CDMX, México.

<https://doi.org/10.24275/uami.6q182k19f>

Salgado Bautista D, Volke-Sepúlveda T, Figueroa-Martínez F, Carrasco-Navarro U, Chagolla-López A, Favela-Torres E (2020) Solid-state fermentation increases secretome complexity in *Aspergillus brasiliensis*. *Fungal Biology* 124(8): 723-734.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.006>

Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D (2021) An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports* 14: 100652.

<https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100652>

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez S, Díaz Godínez G, Augur C (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13(2–3): 157–167.

[https://doi.org/10.1016/S1369-](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)

[703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)

Volke-Sepulveda T, Salgado-Bautista D, Bergmann C, Wells L, Gutierrez- Sanchez G, Favela-Torres E (2016) Secretomic insight into glucose metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation. *Journal of Proteome Research* 15(10): 3856-3871.

[https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b0066](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00663)

[3](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00663)

Zhao C, Chen S, Fang H (2018) Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to itaconic acid by metabolically engineering *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(22): 9577–9584.

<https://doi.org/10.1007/S00253-018-936>

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>