SCIENTIA FUNGORUM

DOI: 10.33885/sf.2026.57.1499
(2026) Vol. 57: e1499

Producción de lacasa por *Lasiodiplodia theobromae* y *Bipolaris oryzae* en fermentación sumergida y su optimización a través de un diseño Box-Behnken

Laccase production by *Lasiodiplodia theobromae* and *Bipolaris oryzae* in submerged fermentation and its optimization through a Box-Behnken design

Jenifer Ramírez-Galeana[1], Wilberth Chan-Cupul[2], Andrea Mendoza-Arceo[2]

[1]Instituto Tecnológico Superior de Puruándiro, Carretera Puruándiro-Galeana Km 4.3, C.P. 58532 Puruándiro, Michoacán, México.
[2]Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo Km. 40, C.P. 28100, Tecomán, Colima, México.

RESUMEN

Antecedentes: *Lasiodiplodia theobromae* y *Bipolaris oryzae* producen lacasa durante su proceso patogénico, esta enzima es relevante para la industria biotecnológica; por ello es importante optimizar su producción en fermentación sumergida.

Objetivo: Evaluar la producción de lacasa por *B. oryzae* y *L. theobromae* en fermentación sumergida con medios a base de avena y salvado de trigo y optimizar la producción a través de un diseño experimental Box-Behnken (DEBB).

Métodos: En un factorial A×B [(A=*B. oryzae* y *L. theobromae*, B=medio de cultivo, buffer ácido cítrico y salvado de trigo (BACST) o avena (BACA)] se cuantificó la lacasa volumétrica y específica y proteína total. Se seleccionó la interacción *B. oryzae* × BACST y se aplicó un DEBB para optimizar las variables de respuesta.

Resultados y conclusiones: El BACST y *L. theobromae* produjeron mayor actividad lacasa. El DEBB mejoró la lacasa volumétrica y proteína total, pero no la lacasa específica. El medio optimizado fue salvado de trigo (5.4 $g.L^{-1}$), NaOH (0.24 $g.L^{-1}$) y ácido cítrico (0.54 $g.L^{-1}$), el cual incrementó 36.03 veces más la lacasa volumétrica (229.63 $U.L^{-1}$) en comparación con el medio sin optimizar (5.61 $U.L^{-1}$). El DEBB optimizó el medio de cultivo BACST y mejoró la actividad lacasa de *B. oryzae*.

Palabras clave: ambiente, biotecnología, fitopatógenos, oxidasas, sustrato

ABSTRACT

Background: *Lasiodiplodia theobromae* and *Bipolaris oryzae* produce laccase during their pathogenic process. This enzyme is relevant to the biotechnology industry; therefore, it is important to optimize its production in submerged fermentation.

Objective: To evaluate laccase production by *B. oryzae* and *L. theobromae* in submerged fermentation using oat-based and wheat bran-based media and to optimize production through a Box-Behnken experimental design (BBED).

Methods: A factorial A × B design [(A = *B. oryzae* and *L. theobromae*; B = culture medium: citric acid buffer and wheat bran (CABWB) or oats (CABO)] was used to quantify volumetric and specific laccase activity and total protein content. The interaction *B. oryzae* × CABWB was selected, and a Box-Behnken experimental design (BBED) was applied to optimize the response variables.

Results and conclusions: CABWB and *L. theobromae* produced the highest laccase activity. The BBED improved volumetric laccase activity and total protein content, but not specific laccase activity. The optimized medium consisted of wheat bran (5.4 $g.L^{-1}$), NaOH (0.24 $g.L^{-1}$), and citric acid (0.54 $g.L^{-1}$), which increased volumetric laccase activity by 36.03-fold (229.63 $U.L^{-1}$) compared with the non-optimized medium (5.61 $U.L^{-1}$). The BBED successfully optimized the BACST culture medium and enhanced laccase activity in *B. oryzae*.

Keywords: biotechnology, environment, oxidases, phytopathogens, substrate

ARTICLE HISTORY

Received: 29/08/2025
Accepted: 23/02/2026
On line: 27/02/2026

CORRESPONDING AUTHOR

Wilberth Chan Cupul, e-mail: wchan@ucol.mx
Orcid: 0000-0001-8634-3618

INTRODUCCIÓN

Las enzimas fúngicas constituyen una herramienta fundamental en el desarrollo de bioprocesos industriales debido a su alta eficiencia catalítica, especificidad de sustrato y compatibilidad con condiciones de operación sostenibles (Saini y Kant-Sharma 2021). Una de las enzimas fúngicas de importancia ecológica (ambiente, Eichlerová *et al*. 2015), biotecnológica (biorremediación, Ribas *et al*. 2009) y médica (biosensores, Wang *et al*. 2026) es la lacasa (bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2), una oxidasa multicúprica de amplia especificidad. Por su hábito lignícola, los basidiomicetos son considerados como los principales productores de lacasa, cuya función es participar en la morfogénesis y descomposición de la lignina (Hadibarata y Yuniarto 2020).

Por otra parte, los ascomicetos asexuales *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. y *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (Dothiodeomycetes: Ascomycota) son capaces de producir patogénesis en gramíneas, arvenses y frutales (Picos-Muñoz *et al*. 2015, Rebolledo-Prudencio *et al*. 2025). Asimismo, producen lacasa durante el proceso patogénico con diferentes propósitos, ya que se ha demostrado que la enzima participa en la síntesis de pigmentos fúngicos mediante la polimerización de melanina a partir de compuestos fenólicos, derivados de la degradación de la lignina, como el dihidroxinaftaleno (DHN), esto para resistir el estrés oxidativo como mecanismo de defensa vegetal y facilitar su invasión (Liu *et al*. 2022).

En *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Barry, una sola lacasa (Sslac2) es esencial para la patogénesis (Westrick *et al*. 2024). La inactivación de Sslac2 resulta en la no patogenicidad y una estructura alterada de la matriz extracelular. De forma similar, en *Magnaporthiopsis maydis* (Samra, Sabet & Hing.) Klaubauf, Lebrun & Crous la secreción de lacasas aumenta con la edad de la planta huésped y el contenido de lignina en los tejidos, lo que sugiere su importancia en la explotación e invasión del tejido vegetal (Degani y Goldblat 2020). En *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref múltiples genes de lacasas se regulan positivamente durante la infección temprana de plantas de pino silvestre, lo que indica su participación en la infección del huésped (Kuo *et al*. 2015). Las lacasas también contribuyen a la virulencia fúngica al mediar las respuestas a señales ambientales y al estrés (Westrick *et al*. 2024). Sin embargo, los estudios moleculares, bioquímicos, biotecnológicos y optimización de las lacasas de *L. theobromae* y *B. oryzae* no han sido abordadas ampliamente, a pesar de las múltiples aplicaciones que posee esta enzima. Por lo tanto, este estudio pretende aportar sobre la optimización de la producción de la lacasa por estos fitopatógenos en extractos crudos a través de los objetivos: 1) evaluar la producción de lacasa por *B. oryzae* y *L. theobromae* en fermentación sumergida en medios líquidos a base de avena y salvado de trigo, y 2) optimizar la producción de lacasa a partir de *B. oryzae* a través de un diseño experimental "Box Behnken".

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies fúngicas

Los fitopatógenos *B. oryzae* y *L. theobromae* fueron aislados de palmas de coco (*Cocos nucifer* L.) híbrido enano verde de Brasil e identificados morfológica y molecularmente por Rebolledo-Prudencio *et al*. (2025, ACMFCnhEVB_1) y Moreno-Zúñiga *et al*. (2024), respectivamente. Los aislamientos se reactivaron en papa dextrosa agar (PDA).

Selección del medio de cultivo y especie

Se elaboraron dos medios de cultivo líquido. 1) Buffer de acetato de sodio con salvado de trigo (BACST) y Buffer de acetato de sodio con avena (BACA). El BACST se preparó con 3.6 g de salvado de trigo, 0.24 g de NaOH y 1.08 g de $C_6H_8O_7$. El BACA consistió en 3.6 g de avena, 0.24 g de NaOH y 1.08 g de $C_6H_8O_7$, el pH fue de 4.5 Los medios de cultivo se prepararon y dispusieron (120 mL) separadamente en matraces de Erlenmeyer de 250 mL. Los matraces se esterilizaron en autoclave a 121 °C (1.5 lb) durante 15 minutos. Una vez enfriado los medios de cultivo a temperatura ambiente, en condiciones estériles, se inocularon de manera independiente cuatro discos de micelio-agar (12 días de edad) de los hongos *B. oryzae* y *L. theobromae*. Los matraces con los medios de cultivo ya inoculados se incubaron bajo condiciones de agitación orbital a 120 rpm y temperatura controlada de 27°C durante siete días.

Variables de respuesta

Cada 48 horas se tomaron alícuotas de 10 mL en tubos cónicos (50 mL) en campana de flujo laminar, los cuales se centrifugaron a 5,500 rpm para obtener un sobrenadante, al que se realizaron las determinaciones de actividad lacasa volumétrica, proteína total y lacasa específica.

La actividad de lacasa volumétrica se determinó mediante el método de la oxidación de ABTS [ácido 2,2´-acino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] el cual produjo un cambio de coloración de incoloro a verde esmeralda. La reacción constó de un volumen total de 1 mL, la mezcla de reacción fue de 100 µL de ABTS (0.5 mM), 500 µL de buffer acetato de sodio (0.1 M, pH 4.5) y 400 µL del sobrenadante (con diluciones respectivas 1:10, 1:20 o 1:100 cuando se requirió). La absorbancia de la reacción se leyó en cinética en un espectrofotómetro (Unico®, UV2150) a 420 nm durante tres minutos. Como blanco se empleó la misma reacción sustituyendo el sobrenadante por el medio de cultivo sin inocular. Las lecturas iniciales y finales se tomaron para calcular la actividad enzimática de acuerdo con Chan-Cupul *et al.* (2016), unidad de actividad lacasa (U) de definió como la cantidad de lacasa que cataliza la conversión de un micromol (µmol) de sustrato por minuto (El-Monssef *et al.* 2016).

El contenido de proteína total en el sobrenadante se cuantificó a través del método de Bradford, el reactivo se preparó en el laboratorio disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomasie G-250 en 50 mL de etanol 95 %. Posteriormente, se le adicionaron 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v). La solución se aforó con agua destilada a un litro. Finalmente, el reactivo terminó a una concentración de 0.01 % (p/v). Se realizó una curva estándar con soluciones conocidas (0, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, y 100 $mg.L^{-1}$) de proteína (albúmina de huevo al 99 %). La curva estándar fue de $Y = 0.127 X + 0.1315$ (Y = absorbancia, X = concentración de proteína en $mg.mL^{-1}$, $R^2 = 0.9934$).

La actividad específica de la lacasa ($U.mg^{-1}$ de proteína) se obtuvo al dividir la actividad lacasa volumétrica ($U.L^{-1}$) entre el contenido de proteína total ($mg.L^{-1}$) (Blanco y Blanco 2017).

Para la selección del medio de cultivo y especie se empleó un diseño experimental factorial A × B con dos niveles, dónde el factor A fue el medio de cultivo (BACST o BACA) y el factor B fue la especie fúngica (*B. oryzae* o *L. theobromae*), en total se obtuvieron cuatro interacciones (tratamientos), cada uno se estableció con cinco repeticiones, una repetición consistió en un matraz Erlenmeyer con medio de cultivo (120 mL) inoculado con cuatro discos de micelio-agar. Los datos de las variables de respuesta: actividad lacasa (volumétrica y específica) y contenido de proteína fueron analizados a través de un análisis de varianza bifactorial, cuando el p-valor fue menor a 0.05 se realizó una comparación de rango múltiple de Tukey con p-valor de 0.05. Todos los análisis se realizaron en Statgraphics® para Windows®.

Diseño experimental Box-Benhken (DEBB)

Se empleó a *B. oryzae* y el medio BACST para optimizar la producción de lacasa y proteína total a través de un diseño experimental de superficie respuesta Box-Benhken. Para *B. oryzae* aún no se cuenta con estudios previos de su aplicación en diseños experimentales para optimizar la producción de lacasa, por el contrario, con *L. theobromae* previamente se ha reportado su estudio a través de un DEBB (Borham *et al.* 2023). EL medio de cultivo y la especie fueron seleccionados por haber presentado la mayor actividad lacasa volumétrica a las 48 h en el experimento factorial. En el DEBB Se evaluaron tres factores (Tabla 1) y dos niveles de cada factor denominados bajo (-) y alto (+). También se incluyeron cuatro puntos centrales (nivel 0), los cuales sirvieron para calcular los errores estándares y los coeficientes de variación (Tabla 1). La matriz del diseño experimental "Box-Benhken" se desarrolló en Statgraphics® y constó de un total de 16 experimentos (Tabla 2). La ecuación 1 describe el modelo del diseño.

Ecuación 1: $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{ii} \beta_{ii} X_i^2$

Donde Y es la respuesta prevista (actividad lacasa- volumétrica, -específica y contenido de proteína), 0 es la intersección con el eje, i es el coeficiente lineal, ii es el coeficiente cuadrático e ij es el coeficiente interactivo. Xi y Xj representan las variables independientes. Los distintos experimentos de la Tabla 2 se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 120 mL del medio de cultivo con sus respectivas concentraciones de acuerdo con la matriz de DEBB (Tabla 1). Los matraces con los medios de cultivo fueron inoculados con cuatro discos de micelio-agar de *B. oryzae.* Todos los matraces se incubaron a 27°C y 120 rpm durante

siete días. Terminado el tiempo de incubación, en una cámara de flujo laminar se colectaron alícuotas de 10 mL en tubos cónicos de 50 mL, los cuales se centrifugaron para obtener los sobrenadantes. Las variables de respuesta fueron los valores obtenidos de la actividad de lacasa volumétrica y específica y proteína total, como se describió anteriormente.

El DEBB se analizó en Statgraphics® para Windows®. Se realizaron los análisis de varianzas, obtención de los modelos lineales y gráficas de Pareto.

Tabla 1. Factores y niveles evaluados para la optimización de lacasa y proteína total producida por *Bipolaris oryzae* en medio de cultivo BACST

	Niveles de los factores		
Factores	**Nivel bajo (-)**	**Nivel 0**	**Nivel alto (+)**
NaOH (g)	0.12	0.24	0.36
Ácido cítrico (g)	0.54	1.08	1.62
Salvado de trigo (g)	1.8	3.6	5.4

Tabla 2. Matriz del diseño experimental Box-Benhken

	Factores		
Experimento	**Salvado de trigo ($g.L^{-1}$)**	**NaOH ($g.L^{-1}$)**	**Ácido cítrico ($g.L^{-1}$)**
1	1.8	0.12	1.08
2	5.4	0.36	1.08
3	1.8	0.36	1.08
4	5.4	0.24	0.54
5	1.8	0.24	0.54
6	5.4	0.24	1.62
7	5.4	0.12	1.08
8	3.6	0.36	0.54
9	1.8	0.24	1.62
10	3.6	0.12	0.54
11	3.6	0.12	1.62
12	3.6	0.36	1.62
13	3.6	0.24	1.08
14	3.6	0.24	1.08
15	3.6	0.24	1.08
16	3.6	0.24	1.08

NaOH=hidróxido de sodio

RESULTADOS

Selección del medio de cultivo y especie

Lacasa volumétrica. Para el factor medio de cultivo se encontró diferencia significativa (P=0.0003) solo en el primer muestreo (48 h), el medio de cultivo BACST permitió una mayor actividad lacasa (3.81 UL^{-1}), en comparación con el medio BACA (0.25 $U.L^{-1}$, Figura 1A). En los subsecuentes muestreos (96, 144 y 192 h) no se encontraron diferencias significativas (P>0.05). Independiente del medio de cultivo, la mayor actividad lacasa se encontró a las 96 h, con promedio de 16.82 $U.L^{-1}$ (Figura 1A). Para el factor especie, en el primer muestreo *B. oryzae* (3.92 $U.L^{-1}$) presentó mayor actividad lacasa volumétrica (P=0.0002) comparado con *L. theobromae* (0.13 $U.L^{-1}$). Posteriormente, ocurrió lo contrario, *L. theobromae* presentó mayor actividad lacasa volumétrica en comparación con *B. oryzae* en los tres muestreos subsecuentes (96, 144 y 192 h), dónde la mayor actividad (P=0.00001) se encontró a las 96 h con 27.87 $U.L^{-1}$ para *L. theobromae* y 5.75 $U.L^{-1}$ para *B. oryzae* (Figura 1B). En las interacciones, se encontraron diferencias significativas (P=0.0002), el medio de cultivo BACST con *B. oryzae*, presentando la mayor actividad lacasa volumétrica con 7.54 $U.L^{-1}$ en comparación con las otras interacciones, las cuales oscilaron entre 0.07 (BACTS-*L. theobromae*) y 0.30 $U.L^{-1}$ (BACA-*B. oryzae*) (Figura 1C).

Contenido de proteína. Para el factor medio de cultivo no existió diferencia significativa (P>0.05) ambos medios permitieron igual producción de proteína total. El medio BACST alcanzó 166.33 mgL^{-1} a las 192 h; mientras que el medio BACA alcanzó 138.52 $mg.L^{-1}$ (Figura 1D). Para la especie se observaron diferencias significativas en tres de los cuatro muestreos (48, 144 y 192 h), *L. theobromae* produjo significativamente más proteína total que *B. oryzae*. Destaca que, a las 192 h, *L. theobromae* alcanzó 193.35 $mg.L^{-1}$, superando ampliamente a *B. oryzae* con 111.51 $mg.L^{-1}$ (Figura 1E). En las interacciones se encontraron diferencias estadísticas en los cuatro muestreos (Figura 1F), la interacción BACST-*L. theobromae* presentó mayor contenido de proteína en los muestreos a las 144 y 192 h con 48.87 y 219.6 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, los medios BACTS y BACA con *B. oryzae* presentaron los valores más bajos en los mismos muestreos con un intervalo de 23.74 y 113.01 $mg.L^{-1}$ de proteína (Figura 1I).

Lacasa específica. Para el medio de cultivo, se observó una diferencia significativa a las 48 h (P=0.0004), el medio BACST permitió una mayor actividad específica con 0.361 $U.mg^{-1}$ de proteína, en comparación con el medio BACA con 0.025 $U.mg^{-1}$ de proteína (Figura 1G). En las mediciones subsiguientes (96, 144 y 192 h), no se encontraron diferencias significativas (P>0.05). Para la especie, a las 48 h se encontró que *B. oryzae* (0.366 $U.mg^{-1}$ de proteína) produjo una mayor (P=0.0003) actividad específica en comparación con *L. theobromae* (0.19 $U.mg^{-1}$ de proteína, Figura 1H). No obstante, en los muestreos posteriores (96, 144 y 192 h) *L. theobromae* superó a *B. oryzae*, con un pico máximo de actividad de lacasa específica a las 96 h de 0.958 $U.mg^{-1}$ de proteína (Figura 1H). En cuanto a las interacciones, se presentaron diferencias significativas a las 48 (P=0.0002) y 96 h (P=0.0013). A las 48 h, la interacción BACST-*B. oryzae* mostró la mayor actividad lacasa específica (0.713 $U.mg^{-1}$ de proteína) respecto a las demás interacciones que oscilaron en un intervalo de 0.009 a 0.030 $U.mg^{-1}$ de proteína (Figura 1I). A las 96, las mayores actividades específicas se registraron en las interacciones BACST-*L. theobromae* (0.995 $U.mg^{-1}$ de proteína) y BACA- *L. theobromae* (0.920 $U.mg^{-1}$ de proteína). Las interacciones entre *B. oryzae* y los medios BACST y BACA obtuvieron los valores más bajos de lacasa específica con 0.199 y 0.221 $U.mg^{-1}$ de proteína, respectivamente (Figura 1I).

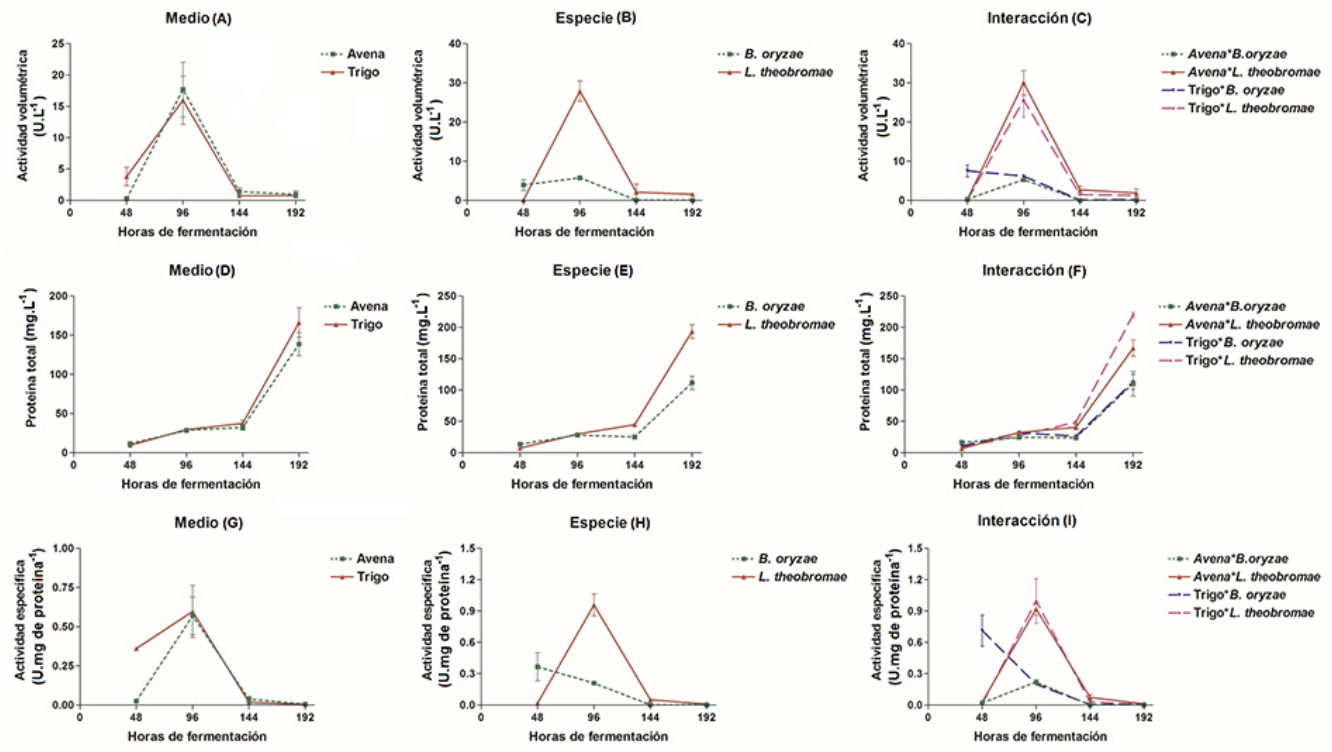


Figura 1. Actividad lacasa volumétrica (A, B y C), contenido de proteína (D, E y F) y actividad lacasa específica (G, H e I) de *Bipolaris oryzae* y *Lasiodiplodia theobromae* en los medios de cultivo Buffer Acetato de Sodio- Salvado de trigo (BACST) y -Avena (BACA). Medias (± error estándar), n=5.

Diseño experimental Box-Behnken (DEBB)

Lacasa volumétrica. En la Tabla 3 se presenta la matriz, factores y resultados de las variables de respuesta del diseño experimental Box-Behnken (DEBB). En el experimento 11 se encontró la actividad de lacasa volumétrica más baja con 0.46 $U.L^{-1}$. Por el contrario, el valor más alto se encontró en el experimento cuatro con 229.63 $U.L^{-1}$. Mientras que, los puntos centrales en promedio presentaron 5.61 $U.L^{-1}$; por lo tanto, el experimento cuatro incrementó 39.9 veces más la actividad de lacasa volumétrica respecto a los puntos centrales.

El único factor que resultó estadísticamente significante para la actividad de lacasa volumétrica fue el ácido cítrico (P=0.0075, Tabla 4); de acuerdo con la gráfica de Pareto (Figura 2), el valor bajo (0.54 $g.L^{-1}$) de ácido cítrico presentó el efecto significativo. La ecuación 2 representa el modelo matemático (P<0.05) para la producción de lacasa volumétrica por *B. oryzae*. El DEBB sugiere que los valores óptimos de los factores son: salvado de trigo 5.4 $g.L^{-1}$, hidróxido de sodio 0.36 $g.L^{-1}$ y ácido cítrico 0.54 $g.L^{-1}$.

Ecuación 2: Lac = 394.842 - 61.8097*ST - 666.469*NaOH - 329.368*AC + 11.7442*ST^2 + 116.007*ST*NaOH - 34.7711*ST*AC - 62.2396*NaOH^2 + 322.377*NaOH*AC + 130.088*AC^2

Tabla 3. Matriz del diseño experimental Box-Behnken para la producción de lacasa volumétrica por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo

Experimentos	Respuestas		
	Lacasa volumétrica ($U.L^{-1}$)	Proteína total ($mg.L^{-1}$)	Lacasa específica ($U.mg^{-1}$ de proteína)
1	35.88	135.42	0.2650
2	99.77	346.81	0.2877
3	34.49	60.73	0.5679
4	229.63	922.76	0.2489
5	83.33	170.86	0.4877
6	12.27	635.42	0.0193
7	0.93	248.08	0.0037
8	43.06	1391.11	0.0310
9	1.16	217.70	0.0053
10	100.23	431.62	0.2322
11	0.46	453.14	0.0010
12	26.85	230.35	0.1166
13	8.10	393.65	0.0206
14	4.40	159.47	0.0276
15	3.47	116.43	0.0298
16	6.48	97.44	0.0665

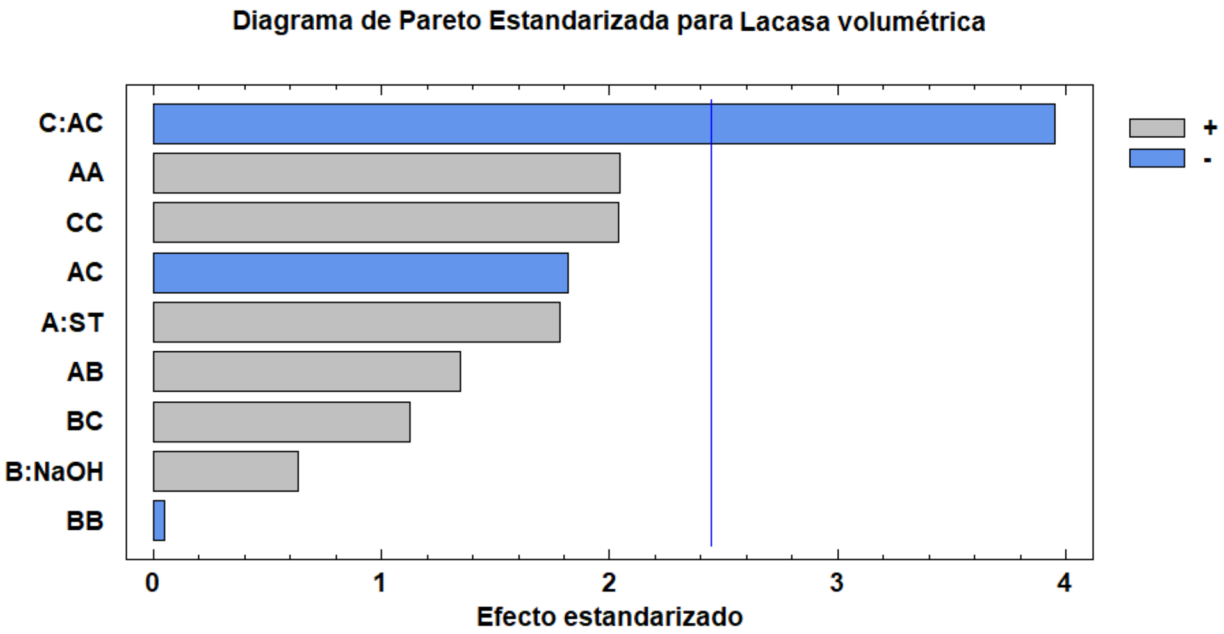


Figura 2. Diagrama de Pareto para la producción de lacasa volumétrica por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo. El color de las barras representa si un efecto es negativo (azul) o positivo (gris). Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio) y factor C (AC=Ácido cítrico).

Tabla 4. Análisis de varianza para la producción de lacasa volumétrica por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico con salvado de trigo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:ST	4405.79	1	4405.79	3.19	0.1245
B:NaOH	555.611	1	555.611	0.40	0.5496
C:AC	21581.1	1	21581.1	15.60	0.0075
AA	5791.59	1	5791.59	4.19	0.0867
AB	2511.51	1	2511.51	1.82	0.2265
AC	4569.08	1	4569.08	3.30	0.1190
BB	3.21306	1	3.21306	0.00	0.9631
BC	1745.57	1	1745.57	1.26	0.3042
CC	5755.88	1	5755.88	4.16	0.0874
Error total	8298.36	6	1383.06		
Total (corr.)	55217.7	15			

Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio), factor C (AC=Ácido cítrico) y Gl=grados libertad.

Tabla 5. Análisis de varianza para la producción proteína total por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:ST	307469	1	307469	6.25	0.0465
B:NaOH	72340.7	1	72340.7	1.47	0.2708
C:AC	237960	1	237960	4.84	0.0701
AA	17917.8	1	17917.8	0.36	0.5682
AB	7518.62	1	7518.62	0.15	0.7093
AC	27919.1	1	27919.1	0.57	0.4797
BB	21281.7	1	21281.7	0.43	0.5351
BC	349446	1	349446	7.10	0.0373
CC	523789	1	523789	10.65	0.0172
Error total	295107	6	49184.6		
Total (corr.)	1.86075E6	15			

Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio), factor C (AC=Ácido cítrico) y Gl=grados libertad.

Proteína total

En el experimento número tres se encontró el contenido de proteína más bajo con 60.73 mg.L^{-1} (Tabla 5). Por el contrario, el valor más alto se localizó en el experimento ocho con 1391.11 mg.L^{-1} (Tabla 5).

Mientras que, los puntos centrales en promedio presentaron 191.75 m./L^{-1}; por lo tanto, el experimento ocho incrementó 6.2 veces más el contenido de proteína total respecto a los puntos centrales.

El análisis de varianza obtenido del DEBB para el contenido de proteína total se presenta en la Tabla 5. El factor lineal significativo fue el salvado de trigo (P=0.0465). Asimismo, la interacción entre el hidróxido de sodio y ácido cítrico (P=0.0373) y el ácido cítrico al cuadrado (P=0.0172), fueron significativos. De acuerdo con la gráfica de Pareto (Figura 3), el valor alto (1.62 $g.L^{-1}$) de ácido cítrico, el valor alto (5.4$g.L^{-1}$) de salvado de trigo y el valor bajo ($g.L^{-1}$) de interacción de hidróxido de sodio y ácido cítrico presentaron efectos significativos. La ecuación 3 representa el modelo matemático (P<0.05) para la producción de proteína total por *B. oryzae*. El DEBB sugiere que los valores óptimos de los factores son: salvado de trigo 5.4 $g.L^{-1}$, hidróxido de sodio 0.36 $g.L^{-1}$ y ácido cítrico 0.54 $g.L^{-1}$.

Ecuación 3: Proteína total = 82.8825 + 302.3*ST + 2564.65*NaOH - 1595.75*AC - 20.657*ST^2 + 200.718*ST*NaOH - 85.9516*ST*AC + 5065.36*NaOH^2 - 4561.27*NaOH*AC + 1240.97*AC^2

Lacasa específica

En el experimento tres se encontró la mayor actividad lacasa específica con 0.5679 $U.mg^{-1}$ de proteína (Tabla 3), este valor fue 14.73 veces más que el promedio de los cuatro puntos centrales (0.0361 $U.mg^{-1}$ de proteína). Por el contrario, el experimento 11 registró la menor actividad específica (0.0010 Umg^{-1} de proteína). El análisis de varianza del DDEB (Tabla 6) indicó que ninguno de los factores principales resultó significativo (P>0.05), sin embargo, el salvado de trigo al cuadrado resultó con una significancia (P=0.0461), el cual fue favorecido por el valor positivo (valor alto) según el diagrama de Pareto (Figura 4). La ecuación 4 describe el modelo para la actividad lacasa específica, el cual no fue significativo (P>0.05).

Ecuación 4: Lacasa específica = 1.78388 - 0.496021*ST - 3.21656*NaOH - 0.608519*AC + 0.0524769*ST^2 - 0.021875*ST*NaOH + 0.0650206*ST*AC + 5.20312*NaOH^2 + 1.22222*NaOH*AC - 0.0543553*AC^2

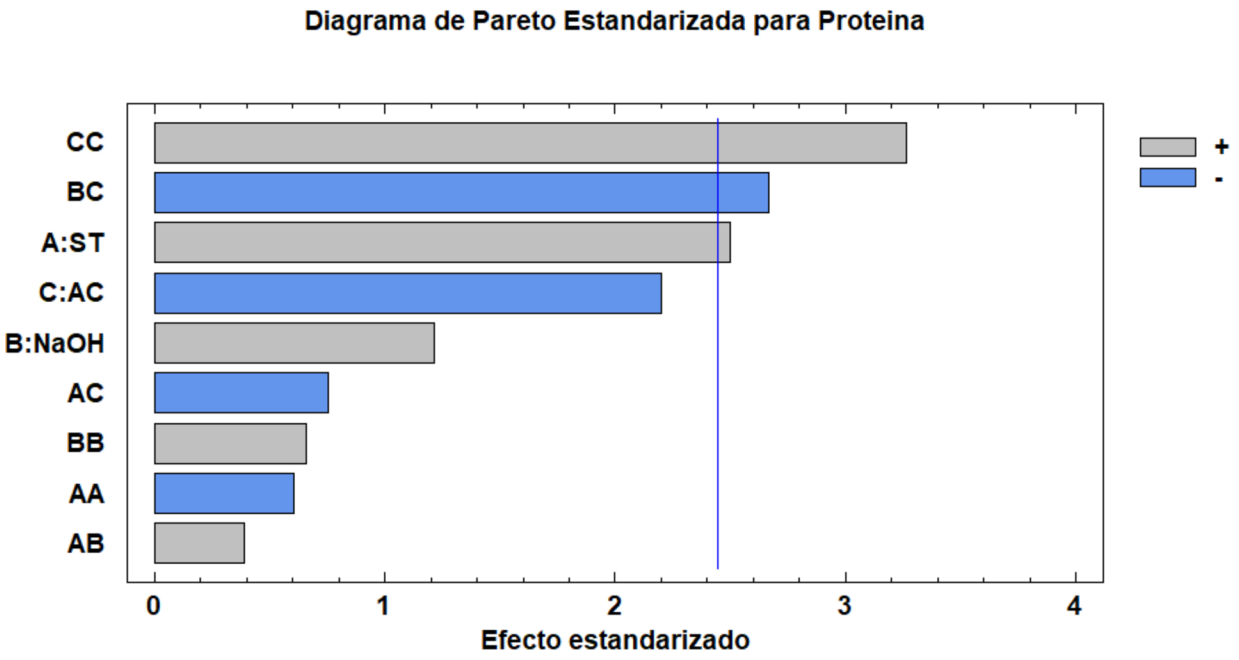


Figura 3. Diagrama de Pareto para la producción de proteína total por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo. El color de las barras representa si un efecto es negativo (azul) o positivo (gris). Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio) y factor C (AC=Ácido cítrico).

Tabla 6. Análisis de varianza para la actividad lacasa específica por *B. oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:ST	0.073402	1	0.073402	3.99	0.0928
B:NaOH	0.0314127	1	0.0314127	1.71	0.2393
C:AC	0.0919347	1	0.0919347	4.99	0.0668
AA	0.115634	1	0.115634	6.28	0.0461
AB	0.0000893025	1	0.0000893025	0.00	0.9467
AC	0.015977	1	0.015977	0.87	0.3875
BB	0.022455	1	0.022455	1.22	0.3117
BC	0.0250906	1	0.0250906	1.36	0.2873
CC	0.00100489	1	0.00100489	0.05	0.8230
Error total	0.110447	6	0.0184078		
Total (corr.)	0.487447	15			

Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio), factor C (AC=Ácido cítrico) y Gl=grados libertad.

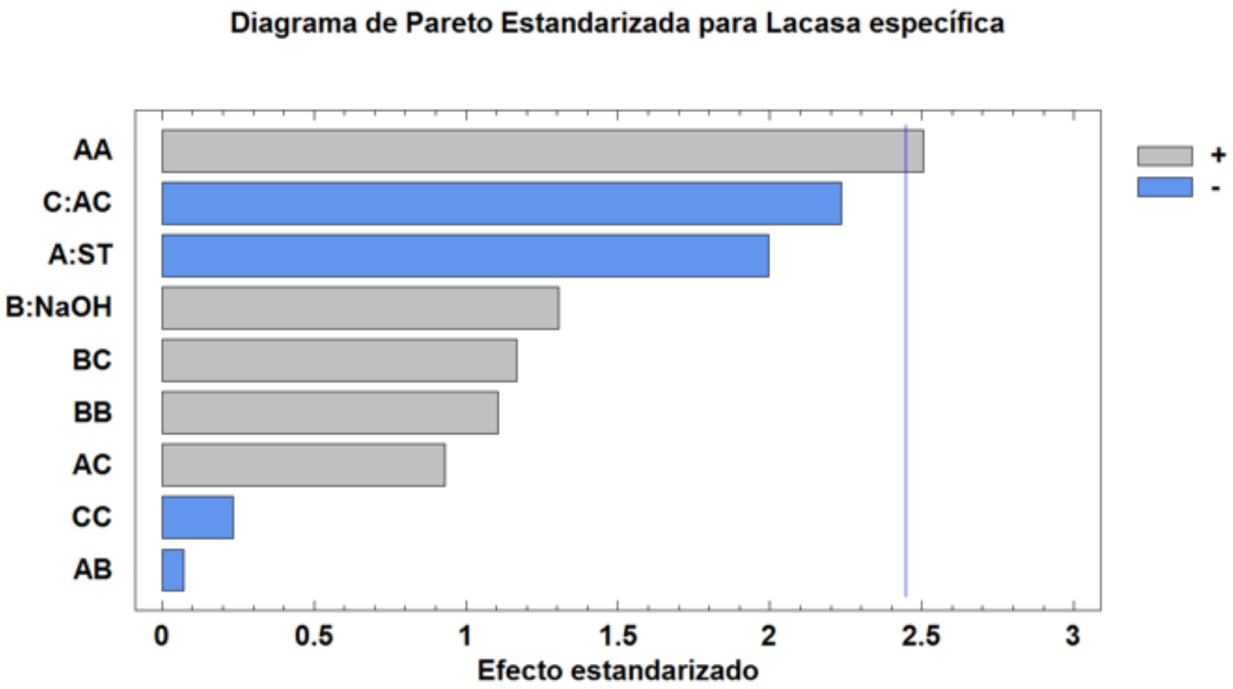


Figura 4. Diagrama de Pareto para la actividad lacasa específica por *Bipolaris oryzae* en el medio de cultivo buffer ácido cítrico salvado de trigo. El color de las barras representa si un efecto es negativo (azul) o positivo (gris). Factor A (ST=salvado de trigo), factor B (NaOH=hidróxido de sodio) y factor C (AC=Ácido cítrico).

Diseño factorial A×B vs DEBB

Bipolaris oryzae a través del DEBB (experimento 4: salvado de trigo 5.4 g.L^{-1}, NaOH 0.24 g.L^{-1} y ácido cítrico 0.54 g.L^{-1}) incrementó su actividad laccasa volumétrica 36.03 veces más (Figura 5A) en comparación con el diseño factorial A×B, empleando el medio BACST sin optimizar (salvado de trigo 3.6 g.L^{-1}, NaOH 0.24 g.L^{-1} y ácido cítrico 1.08 g.L^{-1}).

Para la proteína total, el DEBB permitió a *B. oryzae* incrementar 11.3 veces más (Figura 5B) su contenido de proteína (experimento 8: salvado de trigo 3.6 g.L^{-1}, NaOH 0.36 g.L^{-1} y ácido cítrico 0.54 g.L^{-1}) en comparación al medio BACST sin optimizar. La actividad laccasa específica de *B. oryzae* no mostró incremento alguno al comparar los valores obtenidos del diseño factorial A×B y DEBB (Figura 5C).

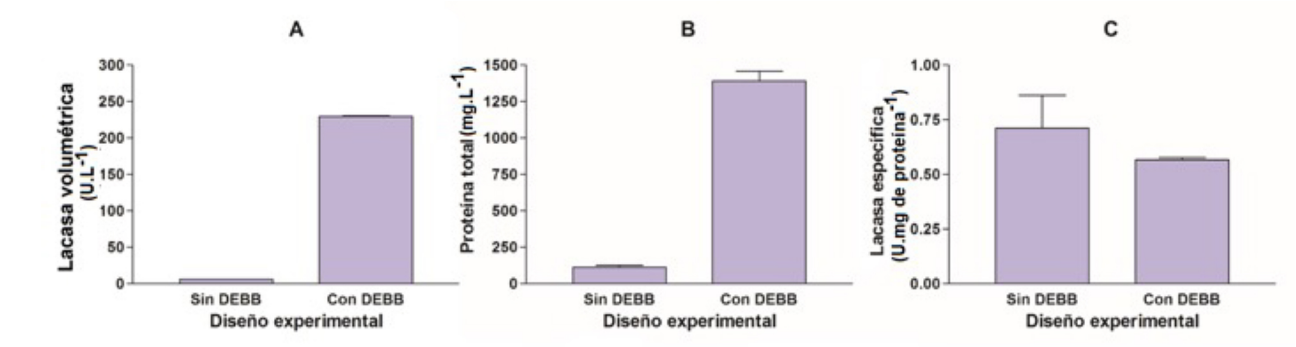


Figura 5. Comparación de los resultados entre el diseño factorial A×B y el diseño experimental Box-Benhken. Medias (± error estándar), n=5.

DISCUSIÓN

Los hongos de las familias *Botryosphaeriaceae* y *Pleosporaceae* comprenden una gran diversidad de especies con hábitos endófitos, parásitos y saprobios. Particularmente, *L. theobromae* y *B. oryzae* son fitopatógenos de una amplia diversidad de especies de plantas y causan enfermedades como cáncer, gomosis, muerte descendente, tizón de hojas y pudrición de raíces (Picos-Muñoz *et al.* 2015, Sacchetto *et al.* 2018). Las lacasas fúngicas desempeñan diversas funciones en la patogenicidad en diferentes especies, el gen de la lacasa (Cglac13) participa en el crecimiento micelial, el desarrollo del tubo germinativo y la patogenicidad (Zhang *et al.* 2023). Por ello, la lacasa es un factor de virulencia crucial expresado como una enzima de la pared celular que oxida compuestos polifenólicos y hierro, y está involucrada en la degradación de la lignina (Zhu y Williamson 2004).

Los fitopatógenos *L. theobromae* y *B. oryzae* son capaces de producir lacasas, Vasconcenlos *et al.* (2001) previamente reportaron la habilidad de *L. theobromae* para producir lacasas intra y extracelularmente en un medio de cultivo mínimo salino con una actividad volumétrica de 2.2 U.mL^{-1}. En *Bipolaris maydis* (Y. Nisik & C. Miyake) Shoemaker (Joseph *et al.* 2019) se ha reportado la producción de lacasa de 193.75 U.L^{-1}. Sin embargo, la producción de lacasa por *L. theobromae* y *B. oryzae* es una característica cepa-dependiente y está regulada por diversos factores abióticos y bióticos. Al respecto, algunas cepas de *L. theobromae* evaluadas para actividad lacasa no mostraron resultados positivos (Abdel-Azeem y Salem 2012).

A pesar de ello, estos hongos filamentosos proporcionan una capacidad secretora superior, diversas moléculas metabólicas y robustez en los sistemas de fermentación. Por lo tanto, la necesidad de utilizar sistemas fúngicos endófitos para cubrir las necesidades en el proceso de producción de productos biotecnológicos blancos es cada vez mayor. De acuerdo con Bengyella *et al.* (2019) el valor total de productos biotecnológicos blancos en el mercado ascendió a US$ 124760 millones en 2008 y se prevé que alcance los US$ 510370 millones para 2030, con un impacto significativo de los hongos filamentosos

en la bioeconomía de enzimas industriales, con especial énfasis con las lacasas fúngicas (Bengyella *et al.* 2019). Por ello, la importancia de optimizar la producción de esta enzima para fines biotecnológicos. Al respecto, algunos autores han realizado bioprospecciones en cepas de *L. theobromae* con resultados negativos (Abdel-Azeem y Salem 2012, Uzma *et al.* 2016, Toghueo *et al.* 2017) y positivos (Tapwal *et al.* 2014, Félix *et al.* 2018) en pruebas cualitativas (oxidación del halo por ABTS y/o guaiacol). En cuanto a la producción de la enzima, los resultados han sido variados, Tapwal *et al.* (2014) reportaron una actividad lacasa de 3.0 $U.mL^{-1}$ en *L. theobromae*; mientras que Cao *et al.* (2020) reportaron actividades mayores a 400 $U.L^{-1}$, en un medio mínimo salino suplementado con Benzo-α-pireno (100 ppm), el cual se degradó en 80%. En un fermento salino con salvado de trigo, Borham *et al.* (2023) reportaron una actividad lacasa de 5 $U.mL^{-1}$ con *Lasiodiplodia* sp. YZH1 y una degradación del rojo (100 ppm) Congo del 80.5%. Sin embargo, algunos estudios reportan actividades enzimáticas bajas (0.021 $U.L^{-1}$) cuando se usan algunos compuestos fenólicos en el medio de cultivo, por ejemplo: ácido benzoico, felúrico y salicílico (Srivastavaa *et al.* 2013). Asimismo, *L. theobromae* es capaz de producir otras enzimas de valor comercial como amilasas (EC: 3.2.1.1.), pectinasa (EC: 3.2.1.15.) y asparaginasa (EC: 3.5.1.1.) (Srivastavaa *et al.* 2013, Félix *et al.* 2018, Cao *et al.* 2020).

Algunos primeros estudioss sobre la actividad lacasa del género *Bipolaris* fueron comunicados por Tapia-Tuseel *et al.* (2011), posteriormente Joseph *et al.* (2019) reportaron la actividad lacasa en *B. maydis* y recientemente, Joseph *et al.* (2024) describieron la habilidad de esta especie para degradar concentraciones de clorpirifos (insecticida organofosforado) con una producción de lacasa de 290.14 $U.L^{-1}$. Para *B. oryzae*, se reportó recientemente su habilidad para producir lacasas en medio de cultivo líquido con salvado de trigo, con una actividad de 8.5 $U.L^{-1}$ (Rebolledo-Prudencio *et al.* 2025). Asimismo, el género *Bipolaris* no solo es capaz de producir oxidasas del tipo lacasa, sino que también se conoce su habilidad para producir lipasas, amilasas y pectinasas (Goyal *et al.* 2023).

Por otra parte, el diseño de Box-Behnken permite la estimación de los parámetros del modelo cuadrático y optimización de la variable de respuesta en función de los factores (Ferreira *et al.* 2007). Este diseño se ha empleado en algunos estudios para la optimización de la producción de lacasas en hongos de la pudrición blanca como *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Latif *et al.* 2022) y *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P Kumm. (Isanapong *et al.* 2024). Sin embargo, la optimización en hongos fitopatógenos con potencial biotecnológico, como lo son *L. theobromae* y *B. oryzae*, no han sido estudiados a profundidad, en especial, el presente estudio aporta un medio de cultivo sencillo y económico a base de ácido cítrico, NaOH y salvado de trigo para optimizar la producción de lacasa. En un estudio similar, Sacchetto *et al.* (2018) emplearon un diseño experimental de compuesto central para mejorar la producción de lacasa por *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx en función de tres factores (elementos del medio de cultivo): $CuSO_4*5H_2O$, KH_2PO_4 y $NaNO_3$; sin embargo, ninguno de los experimentos logró mejorar la producción de lacasa volumétrica (1.65 $U.L^{-1}$) y específica (3.07 Umg^{-1}) respecto a los puntos centrales, es decir, que el medio de cultivo sin optimizar presentó mayor actividad. Por el contrario, en el presente estudio, *B. oryzae* mejoró su actividad lacasa volumétrica en 36.03 veces más (229.63 $U.L^{-1}$) por efecto del valor bajo del ácido cítrico (0.54 $g.L^{-1}$). En otro estudio, Nayak y Choudhary (2023) optimizaron la producción de lacasa por los hongos filamentosos *Dichotomopilus funicoa* (Cooke) X.Wei Wang & Samson y *Alternaria padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis a través de un diseño de compuesto central de cuatro factores y cuatro niveles, empleando un medio de cultivo rico en C, N y vitaminas;los factores de estudio fueron carboximetilcelulosa, extracto de carne, temperatura de incubación y pH. El diseño experimental permitió mejorar un 65.9% (0.659 veces más) la actividad lacasa (0.0151 $U.L^{-1}$) respecto a los puntos centrales (0.0091 $U.L^{-1}$ en promedio) en *D. funicoa*. Mientras que con *A. padwickii* (0.0078 $U.L^{-1}$), el diseño experimental mejoró en gran medida la actividad lacasa volumétrica en 2.07 veces más (0.0240 $U.L^{-1}$). Estas actividades enzimáticas, son bajas si las comparamos con la actividad volumétrica de *B. oryzae*, a pesar de los incrementos obtenidos por efecto del diseño experimental.

Recientemente, Borham *et al.* (2023) emplearon un diseño Box-Benhken para optimizar la degradación de rojo Congo por *L. theobromae*, sin embargo, no cuantificaron y/o optimizaron la actividad lacasa du-

rante el proceso de remoción, reportando5 U.L^{-1}, valor mucho menor al encontrado en el presente estudio en el medio BACST (27.87 U.L^{-1}) sin optimizar. Por otra parte, ya que *B. oryzae* tiene la capacidad de producir otras enzimas diferentes a la lacasa, la razón por la cual sólo se detectó incremento de la actividad lacasa volumétrica y proteína total podría deberse a que este último parámetro está compuesta por todas las proteínas que produce el hongo en la fermentación, por lo que podría incluir otras enzimas como amilasas, celulasas y proteasas (Ashfaq *et al.* 2023); por lo tanto, al dividir la actividad volumétrica lacasa (U.L^{-1}) entre el contenido de proteína total (Blanco y Blanco 2017) para obtener la actividad específica lacasa (U.mg de proteína), se obtuvo un valor bajo de actividad específica, especialmente con el DEBB. Hay que considerar que la cuantificación de proteína total refleja la capacidad secretora general *B. oryzae*, la actividad volumétrica muestra la producción funcional de la lacasa y la actividad específica indica la eficiencia relativa de la lacasa dentro del conjunto de proteínas secretadas; por lo que el DEBB podría estar favoreciendo más la actividad específica de otras enzimas diferentes a la lacasa.

Para mayor compresión del rol ecológico de las lacasas en los fitopatógenos *B. oryzae* y *L. theobromae* futuros estudios podrían enfocarse en caracterizar los genes implicados en la síntesis de lacasa, purificación de la enzima, cuantificar su habilidad para la biorremediación y biocatálisis, y el uso de estos microorganismos como micoherbicidas.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo buffer ácido cítrico con salvado de trigo fue el mejor medio de cultivo para la producción de lacasa independientemente de la especie de hongo. En bioensayo sin DEBB, *L. theobromae* presentó mayor actividad lacasa volumétrica (3.8 veces más) y específica (2.1 veces más) en comparación a *B. oryzae*. Al aplicar el DEBB en *B. oryzae* se mejoró la producción de lacasa volumétrica y contenido de proteína. La actividad específica no fue mejorada por el DEBB. Los componentes del medio de cultivo optimizado fueron salvado de trigo 5.4 g.L^{-1}, NaOH 0.24 g.L^{-1} y ácido cítrico 0.54 g.L^{-1}, registrándose un incrementó de 36.03 veces más actividad lacasa volumétrica (229.63 U.L^{-1}) en comparación con el medio de cultivo BACST sin optimizar (5.61 U.L^{-1}, salvado de trigo 3.6 g.L^{-1}, NaOH 0.24 g.L^{-1} y ácido cítrico 1.08 g.L^{-1}). El medio BACST optimizado se considera económico al poseer solo tres componentes con bajas cantidades, por lo que es un medio ideal para la producción de lacasas fúngicas.

REFERENCIAS

Abdel-Azeem AM, Salem FM. 2012. Biodiversity of laccase producing fungi in Egypt. Mycosphere 3 (5), 900-920. https://doi.org/10.5943 /mycosphere/3/6/4

Ashfaq B, Arshad H, Imran M, Atiq M, Yousaf S, Saleem K, Arshad A. 2023. Biochemical profiling of resistant phenotypes against *Bipolaris oryzae* causing brown spot disease in Rice. Frontiers in Agronomy 3 (1), 1-11. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.675895

Bengyella L, Iftikhar S, Nawaz K, Fonmboh DJ, Yekwa EL, Jones RC, Njanu YMT, Roy P. 2019. Biotechnological application of endophytic filamentous ***Bipolaris*** and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35, 69-79. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2644-7

Blanco A, Blanco G. 2017. Enzymes. En: Blanco A, Blanco G. Medical Biochemistry. Academic Press, 153-175 pp. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2

Borham A, Okla MK, El-Tayeb MA, Gharib A, Hafiz H, Liu L, Zhao C, Xie R, He N, Zhang S. 2023. Decolorization of textile azo dye via solid-state fermented wheat bran by *Lasiodiplodia* sp. YZH1. Journal of Fungi 9, 1069. https://doi.org/10.3390/jof9111069

Cao H, Wang U, Liu H, Jia W, Sun H. 2020. Enzyme activities during Benzo[a]pyrene degradation by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a polluted soil. Scientific Reports 10, 865. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57692-6

Chan-Cupul W, Heredia-Abarca GP, Rodríguez-Vázquez R. 2016. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolíticas de macromicetos del estado de Veracruz, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 32 (3), 339-351. https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08

Degani O, Goldblat Y. 2020. Potential role of laccases in the relationship of the maize late wilt causal agent, *Magnaporthiopsis maydis*, and its host. Journal of Fungi 6 (2), 63. https://doi.org/10.3390/jof6020063

Eichlerová I, Homolka L, Žifčáková L, Lisá L, Dobiášová P, Baldrian P. 2015. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. Fungal Ecology 13, 10-22. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.002

El-Monssef RA, Hassan EA, Ramadan E. 2016. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fun-

gal pigments on aging paper and parchment. Annals of Agricultural Science 61 (1), 145-154. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.11.007

Félix C, Libório S, Nunes M, Félix R, Duarte A, Esteves AC. 2018. *Lasiodiplodia theobromae* as a producer of biotechnologically relevant enzymes. International Journal of Molecular Sciencie 19 (2), 29-39. https://doi.org/10.3390/ijms19020029

Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S, Souza A.S., dos Santos W.N.L. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Analytica Chimica Acta 597, 179-186. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011

Goyal S, Bansal P, Singhal P, Kumar R, Gupta A, Rakhra G, Gupta M, Alkhanjaf AM, Shaikh IA, Umar A, Akhtarg MS, Baskoutash S. 2023. First report of endophytic *Bipolaris axonopicola* from untapped Bastar forests, India, producing human lipase and histone deacetylase inhibitors. South African Journal of Botany 155, 318-329. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.02.013

Hadibarata T, Yuniarto A. 2020. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 28, 101717. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101717.

Isanapong J., Suwannoi K., Lertlattanapong S. 2024. Purification, characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* HK35, and optimization for congo red biodecolorization using Box-Behnken design. 3 Biotech 4, 70. https://doi.org/10.1007/s13205-024-03926-7

Joseph JT, Mahalakshmi R, Revathy K, Panneerselvam K, Manikandan P, Shobana CS. 2019. Effectiveness of application of lignolytic fungal strains, *Cladosporium uredinicola* GRDBF21 and *Bipolaris maydis* GRDBF23 in the treatment of tannery effluent. Journal of Environmental Biology 40, 158-164. https://doi.org/10.22438/jeb/40/2/MRN-771

Joseph JT, Shobana CB, Sekhar D, Suresh S, Poothenchery S, Selvam KP, Aloyuni SA, Othaim AA, Alshehri B, Abdel-Hadie A, Ismaild A, Manikandan P. 2024. Exploration of *Cladosporium uredinicola* GRDBF21 and *Bipolaris maydis* GRDBF23 in biodegradation of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. Journal of King Saud University-Science 36, 103252. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103252

Kuo HC, Détry N, Choi J, Lee YH. 2015. Potential roles of laccases on virulence of *Heterobasidion annosum* s. s., Microbial Pathogenesis 81, 16-21. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.03.004

Latif A, Maqbool A, Zhou R, Arsalan M, Sun K, Si Y. 2022. Optimized degradation of bisphenol A by immobilized laccase from Trametes versicolor using Box-Behnken design (BBD) and artificial neural network (ANN). Journal of Environmental Chemical Engineering 10 (2), 107331. https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107331.

Liu N, Zhang QQ, Jia H, Zhao B, Zhu ZP, Cao ZY, Dong JG. 2022. Characterization of laccase gene StLAC6 and its involvement in the pathogenicity and peroxisome function in *Setosphaeria turcica*. Journal of Integrative Agriculture 21 (7), 2019-2030. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63855-8.

Moreno-Zúñiga MG, Chan-Cupul W, Sánchez-Rangel JC, Rodríguez-Rodríguez J.C. 2024. Producción de lacasa por *Bipolaris oryzae* y *Lasiodiplodia theobromae*, fitopatógenos asociados a *Cocos nucifera* var. Enano verde de Brasil. Avances en Investigación Agropecuaria 28 (Especial), 16-17. https://doi.org/10.53897/RevAIA.24.28.16

Nayak B, Choudhary R. 2023. Optimization, purification and characterization of laccase from lignocellulolytic fungi *Dichotomopilus funicola* NFCCI 4534 and *Alternaria padwickii* NFCCI 4535. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 42, 102344. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102344

Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. Revista Mexicana de Fitopatología 33 (1), 54-74.

Rebolledo-Prudencio OG, Chan-Cupul W, Moreno-Zúñiga G, Cruz-Jiménez CA, Sánchez-Rangel JC. 2025. *Bipolaris oryzae* agente asociado a la mancha foliar en *Cocos nucifera* híbrido "Enano Verde de Brasil". Mexican Journal of Phytopathology 43 (4), 55. https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-09

Ribas L.C.C., de Mendonça M.M., Camelini C.M., Soares C.H.L. 2009. Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. Bioresource Technology 100 (20), 750-4757. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.059.

Sacchetto JP, da Silva-Filho AF, Rezende MI, Scarminio I, Ayub MAZ, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa-Dekker AM. 2018. *Botryosphaeria* spp. as producers of laccase when cultivated on vegetable oils as sole carbon source: optimizing Laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 on soybean oil. Orbital: The Electronical Journal of Chemistry 10 (7), 568-577. http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v10i7.1206

Saini S, Kant-Sharma K. 2021. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research, International Journal of Biological Macromolecules 193, 2304-2319. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.063.

Srivastavaa P, Andersena PC, Maroisa JJ, Wrighta DL, Srivastavaa M, Harmon PF. 2013. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria isolates*. Crop Protection 43, 146e156. http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.015

Tapwal A, Varghese S, Kumar S, Arora J. 2014. Production of laccase by *Alternaria alternata* and *Lasiodiplodia theobromae*. European Journal of Experimental Biology 4 (4), 196-201.

Tapia-Tussell R., Pérez-Brito D., Rojas-Herrera R., Cortes-Velazquez A., Rivera-Muñoz G., Solis-Pereira S. 2011. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. African Journal of Biotechnology 10 (50), 10134-10142. http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.331

Toghueo R.M.K., Zabalgogeazcoa I, Vázquez-de Aldana B.R., Boyom F.F. 2017. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa, Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. South African Journal of Botany 109, 146-153. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.021.

Uzma F, Konappa NM, Chowdappa S. 2016. Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 3, 335-342. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.08.007

Vasconcelos AFD, Dekker RFH, Barbosa AM, Paccola-Meirelles L. 2001. Comparison of the laccases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. Mycoscience 42 (6), 543-548. https://doi.org/10.1007/BF02460952.

Wang X, Li K, Han Q, Chen X, Hu J, Wang Y, Huang H, Li Y. 2026. Development of laccase-like nanozymes and the analytical applications in conjunction with emerging sensing technologies. Talanta 296, 128524. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128524

Westrick NM, Dominguez EG, Bondy M, Hull CM, Smith DL, Kabbage M. 2024. A single laccase acts as a key component of environmental sensing in a broad host range fungal pathogen. Communications Biology 7 (348), 1-11. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06034-7

Zhang M, Xiao C, Tan Q, Dong L, Liu X, Pu J, Zhang H. 2023. The involvement of the laccase gene Cglac13 in mycelial growth, germ tube development, and the pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from mangoes. Journal of Fungi 9 (5), 503. https://doi.org/10.3390/jof9050503

Zhu X, Williamson PR. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Research 5 (1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.004