



Actividad lacasa de *Bipolaris* sp. en diferentes medios de cultivo líquido

Laccase Activity of *Bipolaris* sp. in Different Liquid Culture Media

Juan Pablo Aguilar Aguilar¹ <http://orcid.org/0009-0008-4113-3017>

Wilberth Chan Cupul² <http://orcid.org/0000-0001-8634-3618>

¹Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, C. de Santiago Tapia 403, Col. Centro, Morelia, Michoacán, México. CP. 58000

²Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, km. 40 Autopista Colima-Manzanillo, Tecmán, Colima, México. C.P. 28930
Autor de correspondencia: jpabloaguilar@gmail.com

Recibido: 22 de febrero de 2024

Aceptado: 01 de junio de 2024

Publicado: 25 de junio de 2024

Resumen

Objetivo. Cuantificar la actividad lacasa de *Bipolaris* sp. en fermentación líquida con diferentes medios de cultivo. **Materiales y métodos.** Se reactivó una cepa de *Bipolaris* sp. en papa dextrosa agar (PDA). Se elaboraron cuatro medios de cultivo líquido: 1) Sivakumar, 2) Czapek-Dox (modificado), 3) salvado de trigo buffer citrato (STBC) y 4) extracto de hojas de palma de coco (EHPC). En matraces Erlenmeyer de 250 mL se depositaron 120 mL de cada tipo de medio de cultivo y fueron esterilizados a 121 °C a 15 Psi durante 15 minutos. Tres discos de micelio-agar de *Bipolaris* sp. fueron inoculados en cada matraz y se incubaron a 28 °C con agitación constante a 120 rpm durante siete días. A las 72, 120 y 168 horas se cuantificó en espectrofotómetro la actividad lacasa y la cantidad de proteína total. **Resultados.**

Abstract

Objective. To quantify the laccase activity of *Bipolaris* sp. in liquid fermentation with different culture media. **Materials and methods.** A strain of *Bipolaris* sp was reactivated in Potato Dextrose Agar (PDA). Four liquid culture media were prepared: 1) Sivakumar, 2) Czapek-Dox (modified), 3) wheat bran buffer citrate (WBBC), and 4) coconut palm leaf extract (CPLE). In 250 mL Erlenmeyer flasks, 120 mL of each type of culture medium were deposited and sterilized at 121 °C (15 lbs pressure) for 15 minutes. Three mycelium-agar disc of *Bipolaris* sp. were inoculated in each flask, incubated for seven days at 28 °C with constant agitation at 120 rpm and 28 °C. At 72, 120, and 168 hours, the laccase and total protein quantity were quantified in spectrophotometrically by spectrophotometer. **Results.** The WBBC medium showed a higher produc-

El medio STBC presentó mayor producción ($P < 0.05$) de actividad volumétrica lacasa en los tres muestreos realizados con 395.5, 560.5 y 283.7 U/L, respectivamente. Por el contrario, el Czapek-Dox presentó nula actividad de actividad específica lacasa y proteína total. El STBC permitió mayor producción ($P < 0.05$) de proteína total con 384.81 mg/L. con relación al medio STBC. **Conclusión.** El medio de cultivo salvado de trigo buffer citrato fue el mejor para la producción de lacasa y de proteína total; por el contrario, el medio de cultivo Czapek-Dox (modificado) fue el menos idóneo.

Palabras clave

Biología, fitopatología, fermentación, proteína.

tion ($P < 0.05$) of laccases volumetric activity in the three samplings carried out with 395.5, 560.5, and 283.7 U/L, respectively. On the other hand, the Czapek-Dox showed no activity of specific activity in the laccase and total protein. The WBBC allowed a higher production ($P < 0.05$) of total protein with 384.81 mg/L in relation to the STBC medium. **Conclusions.** The wheat bran buffer citrate culture medium was the best to produce laccase and total protein by *Bipolaris* sp. in liquid fermentation. In contrast, the Czapek-Dox culture medium (modified) was the least suitable to produce laccase and total protein.

Keywords

Biotechnology, phytopathogen, fermentation, protein.

Introducción

Bipolaris sp. es un hongo fitopatológico de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) híbrido Enano Verde de Brasil, el cual fue aislado en una plantación en el municipio de Tecmán, Colima, México (Gaspar-Galeana *et al.*, 2023). Macroscópicamente es un hongo que presenta micelio de color blanco algodonoso en sus primeros siete días de crecimiento, cambiando a una tonalidad marrón-grisáceo conforme madura, es un indicador de la formación de conidióforos y conidiosporas. Sin embargo, microscópicamente exhibe una coloración marrón clara, conidios rectos y distoseptados (de 5 a 6), con forma elipsoidal y tendencia a estrecharse en sus extremos. En cambio, los conidióforos son septados y agrupan hasta ocho conidios, de igual manera las hifas son septadas. *Bipolaris* sp. se reporta como agente causal de la mancha foliar en diversos cultivos como coco, arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.), entre otras (Cruz-Jiménez, 2023).

Actualmente existe un interés de gran impacto por el potencial que tienen diversas enzimas producidas por microorganismos, como el de degradar moléculas contaminantes, tal es el caso de la lacasa. De acuerdo con Blánquez-Moya (2015), algunos microorganismos como bacterias [*p.e. Streptomyces ipomea* (sic.) Person and Martin] y hongos [*p.e. Trametes maxima* (Mont.) A. David & Rajchenb., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.] presentan potencial para producir lacasas, la cual posee potencial oxidativo en distintos sistemas lacasa-mediador para la degradación de contaminantes ambientales, como tintes textiles, fármacos e hidrocarburos de petróleo (siendo hidrocarbonocástico) (Contreras y Carreño, 2018). Las lacasas pertenecen a la familia de las enzimas oxidorreductasas multicobre, las cuales poseen cuatro átomos de cobre en su centro reactivo y se encuentran relacionadas en diversas reacciones del metabolismo celular, como el catabolismo de nutrientes y compuestos tóxicos, fosforilación oxidativa y fotosíntesis (Kosman, 2010).

Por otro lado, *Bipolaris* sp. es un ascomiceto microscópico que posee diversos nichos ecológicos, se puede comportar como saprobio, parásito y endófito (Zayas-Pupo *et al.*, 2006). Además, es bien sabido que su crecimiento varía según el sustrato donde crece y desarrolla, con frecuencia es aislado de hojas, tallos y raíces de diferentes pastos. Por ello, es importante conocer sus características fisiológicas de crecimiento como esporulación, tasa de germinación y crecimiento. Por otra parte, *Bipolaris* es un género que no solo posee interés agronómico por su habilidad para ocasionar enfermedades en cultivos, sino que, también posee interés biotecnológico, puesto que se han empleado algunas especies de *Bipolaris* para la producción de lacasas, degradación de efluentes textiles e incluso se han estudiado para el desarrollo de herbicidas biológicos, siendo un hongo fitopatógeno para *Microstegium vimineum* (Trin.) A. Camus (hierba estilete japonesa) siendo una planta invasiva (Kleczewski y Flory, 2010; Xiao *et al.*, 2022).

Los ensayos realizados en fermentación líquida se han enfocado primordialmente en organismos no fitopatógenos; en consecuencia, para *Bipolaris* no se han realizado ensayos suficientes para determinar el medio de cultivo líquido idóneo, tecnología importante de estudiar, puesto que en este tipo de fermentación se producen con mayor eficiencia la actividad lacasa, cuya importancia en biotecnología ambiental y agrícola es valiosa (Quero-Carrillo *et al.*, 2020). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue cuantificar la actividad lacasa de *Bipolaris* sp. en fermentación líquida con diferentes medios de cultivo.

Materiales y métodos

Sitio experimental

La preparación de los medios de cultivo, aislamiento y purificación del material biológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico III de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (FCBA) de la Universidad de Colima, ubicado en el kilómetro 40 de la autopista Colima - Manzanillo, al noroeste del municipio de Tecomán, Colima, México, con ubicación geográfica en 18°56'47" latitud N y 103°53'46" longitud O, con una altura de 56 m.s.n.m. (Google Earth Pro, 2023).

Origen del material biológico

La cepa fue aislada de hojas de palma de coco variedad Enano verde de Brasil e identificada morfológicamente por Cruz-Jiménez (2023) y Gaspar-Galeana *et al.* (2023). Este aislado se reactivó en PDA, la muestra vegetal fue colectada del rancho "La Ceiba", en la localidad de Caleras, Tecomán, Colima, ubicado geográficamente en 18°59'31" latitud N y 103°53'19" longitud O (Google Earth Pro, 2023). A través de un muestreo al azar realizado por Gaspar-Galeana *et al.* (2023) seleccionado aquellas plantas sintomáticas a mancha foliar, de las cuales se aisló *Bipolaris* sp. Las hojas de palma de coco necesarias para realizar el medio de cultivo se colectaron de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (FCBA) de la Universidad de Colima.

Medios de cultivo

Para elaborar el medio de fermentación líquida Sivakumar, los reactivos necesarios se pesaron en una balanza analítica de alta precisión (cuadro 1). Enseguida, todos los reactivos se depositaron en un matraz Erlenmeyer y se adicionó 1 L de agua destilada. Para disolver completamente los reactivos, se agitó en placa de calentamiento y agitación orbital (35 °C/80 rpm) durante dos minutos (Sivakumar *et al.*, 2010).

Para el medio Czapek-Dox (modificado), se realizó siguiendo la misma metodología, sin calentamiento (Delgadillo-Martínez *et al.*, 2020), únicamente se pesaron las sales para su disolución (cuadro 1).

El medio salvado de trigo buffer citrato (STBC), se preparó primeramente el ácido cítrico a una concentración 0.05 M en 500 mL (4.8 g/0.5 L) y posteriormente el NaOH a una concentración 0.05 M en 500 mL (1 g/0.5 L); una vez ajustado el buffer a pH 9.0 se le adicionó el salvado de trigo (30 g/L) (Delgadillo-Martínez *et al.*, 2020).

Para el medio con extracto de hoja de palma de coco se licuaron aproximadamente 60 g de hojas limpias de palma de coco, cortadas en rectángulos de tamaño manipulable. Las hojas cortadas se licuaron con 250 mL de agua destilada, del cual sólo se utilizaron 50 mL del líquido para hacer una concentración del 20% de hoja triturada, finalmente se agregó 10 g de glucosa a la solución. En todos los medios de cultivo se distribuyó 120 mL del medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. El cuadro 1 describe los componentes de cada medio de cultivo (Delgadillo-Martínez *et al.*, 2020).

Inoculación

Para determinar la producción de lacasa, se inoculó *Bipolaris* sp. en cinco cajas de Petri de 90×15 mm en PDA. Después de nueve días de incubación, se tomaron tres cortes de cultivo fúngico (5 mm de diámetro) cortados del borde de la colonia con ayuda de un popote estéril, se colocaron tres cortes de cultivo fúngico para cada matraz Erlenmeyer de 250 mL con 120 mL de medio de cultivo, siendo en total cuatro matraces (replicas) por medio de cultivo evaluado. Los matraces se incubaron durante siete días a 120 rpm y 29 °C (Bonugli-Santos, 2010).

Se prepararon los siguientes reactivos: 1) 0.1 M de ácido acético glacial, se midió 1.5 mL de ácido acético glacial con una concentración de 95% (PM= 60.05 g/mol y δ = 1.5 g/mL) y se disolvió en 250 mL de agua destilada; 2) 5 mM de ABTS, se pesó 0.013 g de ABTS sigma A1888 (PM= 548.68 g/mol) y se agregó a 5 mL de agua desionizada, se disolvió y vertió en un frasco ámbar de vidrio; 3) 0.1 M de buffer de acetato pH= 4.5, se pesó y disolvió 2.05 g de acetato de sodio en 250 mL y se mezcló con 0.1 M de ácido acético glacial hasta alcanzar un pH de 4.5. Una unidad de actividad lacasa (U) se definió como la cantidad de enzima lacasa que oxidó 1 μ mol de sustrato ABTS por minuto. La actividad lacasa se expresó como actividad volumétrica (U/L).

Cuadro 1
Medios de cultivo con sus reactivos y soluciones

Componentes (g o mL/L)	Medios de cultivo			
	Extracto de hojas de palma de coco	Salvado de trigo buffer citrato	Czapek-Dox (modificado)	Sivakumar
Glucosa	10.0 g	-	30.0 g	20.0 g
Licuado de hojas de palma de coco	50.0 mL	-	-	-
Salvado de trigo	-	30.0 g	-	-
Extracto de levadura	-	-	-	2.5 g
NaOH	-	2.0 g	-	-
Ácido cítrico	-	9.0 g	-	-
NaCl	-	-	3.0 g	-
K ₂ HPO ₄	-	-	1.0 g	1.0 g
MgSO ₄	-	-	0.5 g	0.5 g
KCl	-	-	-	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	0.5 g
CaCl ₂	-	-	-	0.01 g
FeSO ₄	-	-	-	0.01 g
MnSO ₄	-	-	-	0.001 g
ZnSO ₄	-	-	-	0.001 g
CuSO ₄	-	-	-	0.002 g

Actividad lacasa

Cuantificación de lacasa (U/L)

La actividad enzimática de lacasa se midió espectrofotométricamente, a través de la oxidación del ABTS [2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazolina sulfato ácido)] como sustrato (Tinoco *et al.*, 2001). Se empleó 600 μ L de muestra (extracto del cultivo de *Bipolaris* sp. en los medios de cultivo), 300 μ L de buffer acetato de sodio y 100 μ L de ABTS para la preparación del volumen total de la reacción dentro de las celdas de cuarzo (1 mL). Las muestras con abundante actividad se diluyeron 1:20 con agua destilada.

El blanco constó de 600 μ L de muestra de extracto de *Bipolaris*, 300 μ L de buffer acetato de sodio y 100 μ L de agua destilada. En el espectrofotómetro se realizó una medición cinética a longitud de onda de 420 nm, monitoreando la oxidación del sustrato durante tres minutos. Este procedimiento se realizó para cada matraz con los cuatro tipos diferentes de medio de cultivo utilizados en este estudio. La actividad enzimática se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Lacasa (U/mL)} = \frac{\Delta\text{Abs} \times V_t}{t \times \xi \times \lambda \times V_m} (1\ 000\ 000)$$

Donde:

t = Tiempo de reacción de tres minutos

ξ = Valor del coeficiente de extinción de 29 300 mol/cm

V_t = Volumen total de reacción de 1 mL

V_m = Volumen de muestra de 0.6 mL

λ = Haz de luz = 1 cm

ΔAbs = Abs final – Abs inicial.

Proteína total

El contenido de proteína total en el sobrenadante de los medios de fermentación líquida se cuantificó con el método de Bradford (1976). El reactivo Bradford se preparó disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol 95%, al cual se le adicionó 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). La concentración final de la solución utilizada fue de 0.01% (p/v). Para el sustrato se prepararon tubos de ensaye con 1 mL de muestra (uno por cada matraz) más un mL del reactivo de Bradford, se mezclaron bien y se dejó reposar por cinco minutos. Los medios con abundante proteína se diluyeron 1:20 con agua destilada. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a longitud de onda de 595 nm. Se utilizó agua destilada más reactivo Bradford como blanco de lectura.

Para determinar la concentración de proteína total (mg/L) de las muestras de este estudio, se empleó albúmina de huevo en concentraciones conocidas como estándar. Para determinar una curva estándar se substituyó la absorbancia obtenida en la siguiente fórmula:

$$y = 0.0081x + 0.0764$$

Donde: $y = \text{OD } 595 \text{ nm}$; $x = \text{concentración de proteína, con un coeficiente de correlación alto } (R^2 = 0.9691)$ explicando así 96.91% de la variabilidad de los datos.

Actividad específica de la enzima lacasa (U/mg)

Para cuantificar la actividad específica primero se estimó la proteína total, después se calculó el cociente de la actividad enzimática de la lacasa (U/L) y la proteína total (mg/L).

Análisis de datos

Una vez probados los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó análisis de varianza unidireccional y la comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) para determinar los valores significativamente diferentes entre los valores medios de la actividad lacasa, utilizando la distribución F por cada medio de cultivo empleado. Se optó por este tipo de análisis de datos debido a las pocas tomas de mediciones (72, 120 y 168 horas). Todos los análisis se efectuaron con StatGraphics® para Windows®.

Resultados

Actividad volumétrica lacasa (U/L)

Desde la primera medición, a las 72 horas, el medio STBC citrato mostró la mayor actividad volumétrica (395.59 U/L) superando así en su punto máximo (120 horas) a todos los medios, con una actividad volumétrica de 560.54 U/L, inclusive en la tercera (168 horas) y mínima medición con 283.75 U/L. Todos los demás medios de cultivo presentaron una menor cantidad de actividad volumétrica en las tres mediciones, siendo estadísticamente similares entre ellos ($F= 55.35, 65.70, 108.35$ y $P=0.00001$ en las tres mediciones, respectivamente). Los medios con menor producción de lacasa a las 120 horas fueron Czapek-Dox y EHPC, 1.6 U/L y 0.0 U/L, respectivamente (cuadro 2).

Proteína total (mg/L)

En el medio de cultivo líquido EHPC no se obtuvo una diferencia estadística significativa de producción de actividad volumétrica y específica de lacasa, sin embargo, destaca por su poca producción de proteínas totales a las 120 y 168 horas.

A las 72 horas los medios Sivakumar (44.6 mg/L) y EHPC (43.7 mg/L) presentaron gran cantidad de proteína total; no obstante, sólo el Sivakumar presentó un aumento creciente hasta las 168 horas de fermentación, obteniendo una media máxima de 58.19 mg/L. El valor máximo para el medio EHPC se obtuvo a las 72 horas aproximadamente, ya que obtuvo una media máxima de 43.6 mg/L. Czapek-Dox no produjo proteína en todos los días que se realizaron las mediciones.

El medio STBC, después de las 120 horas de fermentación, presentó una media de proteína total de 279.25 mg/L, hasta llegar a cuantificarse 384.81 mg/L a las 168 horas de fermentación, logrando ser el medio con una mayor producción de proteína total (cuadro 2).

Cuadro 2

Actividad volumétrica lacasa (U/L), actividad específica de la enzima lacasa (U/mg), contenido de proteína total (mg/L) de *Bipolaris* sp. en medios de cultivo líquido

Medio de cultivo	Actividad volumétrica lacasa	Proteína total	Actividad específica lacasa
	72 h de fermentación		
Sivakumar	0.74±0.16 b	44.6±4.03 a	0.017±0.004 b
Czapek-Dox	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c	0.00±0.00 b
STBC	395.59±53.13 a	15.44±4.28 b	31.0±8.73 a
EHPC	0.00±0.00 b	43.7±1.28 a	0.00±0.00 b
F=	55.35	53.21	12.59
P=	0.00001	0.00001	0.0005

Medio de cultivo	Actividad volumétrica lacasa	Proteína total	Actividad específica lacasa
	120 h de fermentación		
Sivakumar	18.99±3.09 b	55.35±3.0 b	0.35±0.06 b
Czapek-Dox	1.60±0.20 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
STBC	560.54±68.3 a	279.25±46.8 a	2.22±0.48 a
EHPC	0.00±0.00 b	37.6±0.83 b	0.00±0.00 b
F=	65.70	28.95	19.13
P=	0.00001	0.00001	0.0001
	168 h de fermentación		
Sivakumar	18.78±2.09 b	58.19±1.23 b	0.32±0.03 b
Czapek-Dox	0.06±0.05 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
STBC	283.75±26.62 a	384.81±68.44 a	0.82±0.17 a
EHPC	0.00±0.00 b	39.18±1.15 b	0.00±0.00 b
F=	108.38	26.99	19.71
P=	0.00001	0.00001	0.0001

Medias (\pm error estándar) con literales diferentes, son significativamente diferentes entre sí, de acuerdo con la comparación de medias Tukey ($P=0.05$). STBC = Salvado de trigo buffer citrato, EHPC=Extracto hoja de palma de coco.

Actividad específica de la enzima lacasa (U/mg)

El único medio con una actividad específica alta y estadísticamente diferente a los demás medios fue el STBC (cuadro 2), presentando mayor actividad específica a las 72 horas, 31.0 U/mg de proteína. Los medios de cultivo Czapek-Dox y EHPC no presentaron actividad específica en las tres mediciones: 72, 120, 168 horas. El medio Sivakumar presentó baja actividad específica, sin embargo, no fue significativamente diferente de los demás medios que no presentaron una actividad específica ($P=0.05$).

Discusión

La plasticidad de *Bipolaris* sp. para colonizar diferentes nichos le ha conferido la capacidad de comportarse como un agente de control de malezas, incluso como un agente causal de enfermedades en cultivos de importancia comercial en México (Kleczewski y Flory, 2010; Xiao *et al.*, 2022). No obstante, la escasa evidencia de la producción enzimática de lacasa en medios de cultivo definidos para *Bipolaris* sp. permite documentar por primera ocasión la actividad lacasa volumétrica (U/L), específica (U/mg) y el contenido de proteína total (mg/L) de este hongo en medios de cultivo líquido definidos. Diversos autores han documentado que especies cercanas a *Bipolaris*, que también presentan la capacidad de producir lacasa como *Curvularia*, han registrado valoraciones mayores como las de Vázquez *et al.* (2022), quienes al evaluar la potencialidad del consorcio microbiano

Curvularia kusanoi L7- *Trichoderma pleuroticola*, a través de las cinéticas de producción de las enzimas celulolíticas y ligninolíticas (lacasa y peroxidasa) en fermentación sólida sumergido de salvado de trigo y de bagazo de caña de azúcar. Ambas cepas mostraron alta producción celulolítica, sólo *Curvularia kusanoi* L7 presentó una actividad ligninolítica con actividad lacasa máxima de 1 400 U/L a los siete días. Estos resultados contrastan con este estudio en donde *Bipolaris* sp. presenta una actividad lacasa máxima de 560 U/L a los cinco días en el mismo medio de cultivo sumergido.

De igual manera, Iglesias-Velasco *et al.* (2022) al confrontar una cepa de *Curvularia eragrostidis* y seis cepas de *Trichoderma* spp. cuantificaron cualitativamente la actividad quitinasa y β -glucanasa de *C. eragrostidis* y de *Trichoderma* sp. T-98. Donde *C. eragrostidis* produjo lacasa (0.027 U/mg de proteína), la cual se incrementó en confrontación con *Trichoderma* sp. T-94 (Lacasa=0.219 U/mg de proteína) en medio de cultivo Czapeck agar suplementado con el 1% de carboximetil-celulosa. Aunque no son exactamente los mismos medios de cultivo, Czapeck produjo una mayor actividad específica en confrontación, mientras que nuestro Czapeck Dox modificado produjo 0 U/mg de proteína en todas las mediciones. Brindando soporte a la importancia del medio de cultivo donde se desarrolla, inclusive si se encuentra en confrontación con otro microorganismo, afectando la velocidad y cantidad de proteínas producidas.

Por otro lado, se puede fortalecer y relacionar a *Bipolaris* sp. con su uso potencial para la decoloración y degradación de aguas residuales, ya que presenta una actividad volumétrica de 560.54 U/L de lacasa a los cinco días. Así pues, en *Curvularia clavata* se ha reportado una actividad volumétrica de 30 U/L de lacasa, con potencial para la decoloración y degradación de aguas residuales agrícolas que contienen compuestos (Neoh *et al.*, 2013).

De igual manera, se reporta la capacidad de *Curvularia aeria* (25.4 U/mL), *C. akkaii* (18.1 U/mL) y *C. lunata* (166.2 U/mL) para producir lacasa en fermentación líquida. El medio líquido que los autores utilizaron es el mismo que uno de los presentes en el estudio, Sivakumar, presentando una diferencia de 15 g/L en la cantidad de glucosa, además que añadieron 5.0 g/L de peptona. Para los demás reactivos y soluciones fueron las mismas cantidades, con la diferencia que los autores no reportan haber usado extracto de levadura. No obstante, el medio Sivakumar utilizado presentó mayor actividad lacasa volumétrica máxima, 18.99 U/L, siendo muy baja si se le compara con la actividad lacasa volumétrica máxima presente en el medio salvado de trigo buffer citrato 560.54 U/L a los cinco días (Patel y Bhaskaran, 2014).

El salvado de trigo utilizado en diversos medios de cultivo, tanto para fermentación de estado sólido como en fermentación líquida, ha mostrado ser el medio donde se desarrolla la mayor actividad enzimática y la mayor actividad específica de lacasa. Como para la cepa *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18, donde ha mostrado una actividad enzimática de 450.43 U/mL y la actividad específica para lacasa fue de 268.18 U/mL a las 72 horas a 30 °C (Dos Santos-Ferreira *et al.*, 2022).

Así mismo, se documentó que las lacasas fúngicas participan en la esporulación, la producción de pigmentos, la formación de cuerpos fructíferos, la defensa contra el estrés, la

patogénesis de las plantas y la degradación de la lignina (Arregui *et al.*, 2019). Además, la producción enzimática se ve afectada por números factores, tales como la composición y fuente de nutrientes en el medio donde se desarrolla, el pH, la temperatura, la agitación y la presencia de inductores como etanol, alcohol, veratrílico, CuSO₄, compuestos análogos de la lignina, la presencia de otro microorganismo como en los cocultivos; asimismo la dosifica de proteínas totales no es específica, lo que significa que los hongos que presentaron altas dosis de proteínas totales y baja actividad lacasa exhiben actividades para otros grupos de enzimas, como las proteasas (Rodríguez-Couto *et al.*, 2002; Chan-Cupul *et al.*, 2018).

De tal modo que la fuente de carbono, su contenido y la cantidad de nitrógeno influyen de manera directa en la producción de enzimas ligninolíticas (Elisashvili *et al.*, 2011). De manera que el alto contenido de carbono en el medio STBC, debido a la gran cantidad de salvado de trigo sea la razón de haber encontrado mayor actividad lacasa en comparación con los otros medios de cultivo. Del mismo modo, la baja presencia de nitrógeno en el medio Czapek-Dox (modificado) además de contener sales, explica la poca o nula actividad enzimática lacasa.

Conclusiones

El medio de cultivo en fermentación líquida que permite obtener los valores más altos para la producción de lacasa y proteína total producidos por *Bipolaris* sp. es el salvado de trigo buffer citrato. Por otro lado, el medio de cultivo Czapek-Dox (modificado) fue el menos idóneo.

Literatura citada

- Arregui, L.; Ayala; Gómez-Gil, X.; Gutiérrez-Soto, G.; Hernández-Luna, C.E.; Herrera de los Santos, M.; Levin, L.; Rojo-Domínguez, A.; Romero-Martínez, D.; CN-Saparrat, M.; Trujillo-Roldán, M.A. y Valdez-Cruz, N.A. (2019). Laccases: Structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial cell factories*. 18: 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Blánquez-Moya, A. (2015). Caracterización y función biológica de la lacasa producida por *Streptomyces ipomea* CECT 3341: Aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales. Tesis de maestría, Universidad de Alcalá, España. 156 p.
- Bonugli-Santos, R. C. (2010). Fungos isolados de microrganismos marinhos brasileiros: Diversidade genética e potencial biotecnológico. Tesis de doctorado, Universidad Estatal de Campina, Brasil. 174 p.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Contreras, H. y Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*. 1(1): 27-33. <https://doi.org/10.251127/ucni.v1i1.269>
- Cruz-Jiménez, A. (2023). Mancha foliar en coco (*Cocos nucifera* L.) var. Enano Verde de Brasil: Identificación del hongo asociado y su susceptibilidad a fungicidas biológicos. Seminario de investigación II. Universidad de Colima. Tecoman, Colima, México. 18 p.
- Delgadillo-Martínez, J.; Ferrera-Cerrato, R.; Alvarado-López, J.; Alarcón, A.; Pérez-Moreno, J. y Almaraz-Suárez, J.J. (Ed.). (2020). *Microbiología aplicada a la agricultura y ecosistemas: Principios y técnicas para su investigación*. (1.a ed.) [Físico]. Editorial del Colegio de Posgraduados. Texcoco, México. 624 p.
- Dos Santos-Ferreira, J.V.; Durante-Neves, A.G.; Da Silva-Batista, J.M.; Pedrosa-Brandão da Costa, R.M. y Figueiredo-Porto, A.L. (2022). Seleção e produção de laccases a partir da fermentação em estado sólido de fungos filamentosos. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 3(3): 1-7. <https://doi.org/10.51161/rem/s/3382>

- Elisashvili, V.; Torokb, T.; Kachlishvilia, E.; Khardziania, T.; Metrevelia, E.; Kobakhidzea, A. y Berikashvilia, I. (2011). Evaluation and regulation of the lignocellulolytic activity of novel white-rot basidiomycetes. *Global Journal of Biochemistry* |, 2(2): 134-141.
- Gaspar-Galeana, R.E.; Palma-García, J.M. y Chan-Cupul, W. (2023). Mancha foliar en palma de coco “enano verde de Brasil”: Identificación del fitopatógeno y su control biorracional *in vitro*. *Avances En investigación Agropecuaria*. 27: 219-235.
- González-Arias, G.; López-Mesa, M.O.; Amat-Novio, Z.; Estrada-Vilardel, G.; López-Manes, D.; Bernal-Areces, B.; Granda, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Figueredo-González, L.; Pupo-Zayas, A.D.; Ramos, M.; González, M.; Ruiz-Guardado, M.; Pérez-Guevara, I.; Nápoles-Albanés, C.; García-Rivero, G.; Sánchez, C.R.; Buchillón, C. y López, M. (2006). Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad*. 10(1): 11-18.
- Google Earth Pro. (2023). Google earth software ver. 2017. (Consultado 28 junio 2022).
- Iglesias-Velasco, S.J.; Chan-Cupul, W.; Osuna-Castro, J.A.; Hernández-Ortega, H.A. y Centeno-Leija, S. (2022). Antagonismo *in vitro*, actividad ligninolítica y de hidrolasas de pared celular en la interacción de especies de *Trichoderma* con *Curvularia eragrostidis* aislado de piña. *Scientia Fungorum*. 53: e1430.
- Kleczewski, N.M. y Flory, S.L. (2010). Leaf blight disease on the invasive grass *Microstegium vimineum* caused by a *Bipolaris* sp. *Plant Disease*. 94(7): 807-811.
- Kosman, D.J. (2010). Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *Journal of Biological Chemistry*. 285(35): 26729-26735. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15: 15-28.
- Mendoza-Arceo, A. (2020). Actividad enzimática ligninolítica de dos poblaciones de *Ganoderma* spp. y su crecimiento por efecto de interacciones con *Trichoderma* spp. Tesis licenciatura, Universidad de Colima, Tecmán, Colima. México. 69 p.
- Neoh, C.H.; Lam, C.Y.; Lim, C.K.; Yahya, A. y Ibrahim, Z. (2013). Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environmental Science and Pollution Research*. 21: 4397-4408.
- Patel, R. y Bhaskaran, L. (2014). Screening of novel ascomycetes for the production of laccase enzyme using different lignin model compounds. *International Journal of Pharma and Bio Science*. 74: 452-458.
- Quero-Carrillo, A.R.; Zárate-Ramos, A.; Robles-Yerena, L.; Nava-Díaz, C.; Miranda-Jiménez, L. y González-Muñoz S. (2020). Pathogenic fungi associated to Mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*. *Mexican Journal of Phytopathology*. 38(2): 198-214.
- Tinoco R.; Pickard M.A. y Vázquez-Duhalt R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 331-335.
- Rodríguez-Couto, S.; Gundín, M.; Lorenzo, M. y Sanromán, A. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. 38: 249-255.
- Sivakumar, R.; Rajendran, R.; Balakumar, C. y Tamilvendan, M. (2010). Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. *Int J Eng Sci Technol*. 2(12): 7133-7141.
- Vázquez, M.A.; Cabrerías, E.C.V.; Torta, L.; Laudicina, V.A.; Sardina, M.T. y Mirabile, G. (2022). Potencialidades del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi-Trichoderma pleuroticola* como pretratamiento biológico para la degradación de fuentes fibrosas. *Revista MVZ Córdoba*. 27(2): e2559. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2559>
- Chan-Cupul, W.; Arámbula-Zúñiga, C.C.; Fan, Z. y Heredia, G. (2018). Oxidative enzymes activity and hydrogen peroxide production in white-rot fungi and soil-borne micromycetes co-cultures. *Annals of Microbiology*. 69: 171-181.
- Xiao, W.; Li, J.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Fang, W.; Valverde, B.E. y Chen, S. (2022). A fungal *Bipolaris bicolor* strain as a potential bioherbicide for goosegrass (*Eleusine indica*) control. *Pest Management Science*. 78(3): 1251-1264.