



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Producción de lovastatina por *Pleurotus ostreatus*
desarrollado en fermentación en medio líquido y
fermentación en medio sólido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo

Codirectores
Dr. Gerardo Díaz Godínez
Dra. Maura Téllez Téllez

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2014

Cosas que ojo no vio, ni oído oyó, ni han subido en corazón de hombre, son las que Dios ha preparado para los que le aman. 1 Corintios 2:9



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Producción de lovastatina por *Pleurotus
ostreatus* desarrollado en fermentación en medio
líquido y fermentación en medio sólido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo

Comité Tutorial

Codirectores

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dra. Maura Téllez Téllez

Tutores

Dr. Rubén Díaz Godínez

Dr. Saúl Tlecuil Beristaín

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2014

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, apoyado por el proyecto financiado por CONACyT Proyecto No. 156406 del Dr. Gerardo Díaz Godínez, así como también al apoyo recibido por CONACyT con la beca para estudios de maestría con en No. De registro 485542 para Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Posgrado en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Producción de lovastatina por *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación en medio líquido y fermentación en medio sólido.”**

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., OCTUBRE 24 DE 2014

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DRA. MAURA TELLEZ TELLEZ

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ

DR. SAÚL TLECUHTL BERISTAIN

Adriana Montoya E.

DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas del CTBC de la UAT por todo el apoyo durante estos dos años.

Al CONACYT por el apoyo recibido durante estos dos años con la beca para estudios de maestría con número de registro 485542.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez, porque sin su confianza en mi potencial difícilmente estaría aquí y probablemente tampoco llegaría a donde Dios tiene planeado. Gracias por su paciencia, ayuda, comprensión y apoyo durante este tiempo, aún desde antes de empezar la maestría. Dios lo bendiga y le recompense todo lo que ha sembrado.

A la Dra. Maura Téllez Téllez, gracias por cada regaño, por cada llamada de atención, por enseñarme a trabajar —y por seguir haciéndolo—, por ayudarme a lograr lo que no creí que se podría lograr, por toda la paciencia, por creer en mí a pesar de cada berrinche, por no rendirse —aunque yo sí me rendía—, ¡gracias por todo! Dios la bendiga y le multiplique todo lo que ha sembrado en mí.

Al Dr. Rubén Díaz Godínez, gracias por aceptar ser parte del comité tutorial de este trabajo, por su tiempo y aportaciones en cada examen.

Al Dr. Saúl Tlecuitl Beristáin, gracias por el tiempo dedicado a mi formación, por las enseñanzas y por sus valiosas aportaciones en cada examen.

A la Dra. Adriana Montoya Esquivel, muchas gracias por sus palabras de apoyo antes de cada examen, por sus aportaciones y por su tiempo.

Al profesor Francisco Varela, gracias por hacer la revisión de mis agradecimientos.

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala por el apoyo recibido a través del proyecto CACyPI 2014.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi Dios, por darle sentido a mi vida, por cumplir los sueños que no soñé y hacerme vivir aquello que nunca imaginé. Dios y Padre Eterno mío, gracias, a ti sea la gloria y la honra.

A mi amado esposo Gustavo, mi vida, eres mi mayor regalo, mi mejor recompensa, mi mayor bendición, la vida a tu lado es como color en primavera y a tu lado quiero pasar el resto de mi vida. No hace falta nada porque tú estás a mi lado y esta tesis es una buena oportunidad para agradecerte el apoyo en cada momento, por ser mi mayor fan, por amarme como me amas y por ser mejor de lo que pensé. TE AMO.

A mi mamá, por estar siempre cerca de nosotros sin importar la distancia, por pasar parte de tus vacaciones cuidándonos. Eres la mejor mamá del mundo y espero tener el tiempo para ser tan buena madre como lo eres tú, no te cambiaría nada, madre, eres justo lo que necesito, justo lo que quiero, y agradezco a Dios por haberme puesto cerca de ti. TE AMO.

A Pilar Galicia, Apolinar Montalvo y Fredy Montalvo, gracias por ser la familia que siempre quise, por adoptarme como una hija, por cuidarme y defenderme en todo tiempo, que bendición es ser parte de ustedes. GRACIAS POR TODO.

A mi abuela Piedad, por ser una excelente mujer y por haberme hecho —en gran parte— lo que hoy soy. Gracias, Abu, por amarme como me amas, espero que el tiempo me alcance para demostrarte todo lo que te quiero.

A mi papá, porque a pesar de todo estás conmigo, por apoyarme a iniciar esta maestría, aun cuando pensaste que había mejores formas de invertir mi tiempo, por apoyarme en mi nueva etapa de esposa y madre, y por seguir aquí. Te amo, papá.

Y a mis amigos, los chicos del laboratorio (Pelo, Daysi, Lilia, Betito, Ivette) por su ayuda, enseñanzas, apoyo en cada paso de la maestría y por hacer de mi vida una aventura agradable. GRACIAS POR TODO. Dios los bendiga

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi familia, a mi amado esposo Gustavo y a mi hermoso hijo Santiago, ustedes junto con esta maestría son todo lo que no soñé, pensé o imagine que un día sería mío y Dios me lo dio. LOS AMO.

Así que Dios cumplió lo que un día escribió: “Cosas que ojo no vio, ni oído oyó, ni han subido en corazón de hombre, son las que Dios ha preparado para los que le aman”.

1 Corintios 2:9

RESUMEN

Mevinolina, monacolina K o lovastatina es un metabolito que se obtiene de diferentes géneros y especies de hongos filamentosos. Dentro de los principales géneros están: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pythium*, *Gymnoascus* y *Pleurotus*, entre otros. La lovastatina es un compuesto eficiente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, que tiene la capacidad de disminuir el colesterol total por dos mecanismos: inhibición competitiva de la HMG-CoA reductasa y aumento del catabolismo de lipoproteínas en el hígado. Esto lo hace aumentando los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que cumplen la función de captar no sólo estas moléculas, sino también a sus precursores, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y sus remanentes VLDL cuya hidrólisis producen LDL. El tratamiento de la hipercolesterolemia se centra en la disminución de VLDL y LDL; y un aumento de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Por lo que existe la necesidad de optimizar la producción en cantidades apreciables utilizando hongos comestibles, como es el caso de *Pleurotus ostreatus*, que además, es un alimento nutracéutico. Los sistemas más utilizados son por fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte y biodegradable). En este trabajo se evaluó el contenido de lovastatina producido por *Pleurotus ostreatus*. El hongo se creció durante 408 h en fermentación en medio líquido, se observó una biomasa máxima de 15.5 g/L con una μ de 0.026 h⁻¹ y en fermentación en medio sólido sobre soporte inerte (espuma de poliuretano) una biomasa máxima de 17.5 g/L con una μ de 0.033 h⁻¹. La concentración de lovastatina intracelular máxima en la fermentación en medio líquido fue de 4.2 mg/g, obtenida en la fase de crecimiento exponencial y la producción máxima de lovastatina extracelular fue de 2.6 mg/g y se encontró en las primeras horas de la fermentación, en la fase de adaptación o estacionaria. La concentración de lovastatina intracelular mayor en fermentación en medio sólido sobre soporte inerte fue de 65 mg/g y una producción máxima de lovastatina extracelular de 0.244 mg/g, ambos títulos se encontraron en las primeras horas de la fermentación. En cuanto a la producción de cuerpos fructíferos (fermentación sólida sobre soporte biodegradable) las concentraciones más elevadas se encontraron en el píleo y en el estípite del cuerpo fructífero de 3.5 cm de longitud (3.83 mg/g y 1.47 mg/g respectivamente). Los resultados revelaron una mayor producción de biomasa y concentración de lovastatina en fermentación en medio sólido

sobre soporte inerte con respecto de la fermentación en medio líquido, y una mayor obtención de este metabolito en las muestras intracelulares con respecto de las extracelulares. *Pleurotus ostreatus* se considera un productor potencial de lovastatina, y es posible aumentar la producción realizando modificaciones en las condiciones de cultivo.

ÍNDICE

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Colesterol.....	16
1.1.1. Patologías ocasionadas por desequilibrio en la concentración del colesterol	17
1.1.2. Tratamiento para dichas patologías.....	18
1.2. Estatinas.....	18
1.2.1. Capacidades biológicas de las estatinas	19
1.2.2. Inhibición de la síntesis del colesterol.....	19
1.2.3. Tipos de estatinas	21
1.3. Lovastatina.....	21
1.3.1. Propiedades de lovastatina	22
1.3.2. Origen de lovastatina.....	22
1.4. Hongos basidiomicetos	23
1.5. <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
1.5.1. Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
1.5.2. Estructura de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
1.5.3. Producción industrial de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
1.6. Sistemas de fermentación	29
1.6.1. Fermentación en medio líquido.....	29
1.6.2. Fermentación en medio sólido	29
1.6.3. Producción de cuerpos fructíferos.....	30
2. ANTECEDENTES	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	44
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	45
5. OBJETIVOS.....	46
5.1. Objetivo general.....	46
5.2. Objetivos específicos	46
6. METODOLOGÍA.....	47
6.1. Microorganismo de estudio.....	48

6.2.	Medio de cultivo y desarrollo micelial	48
6.3.	Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento	50
6.4.	Extracción de lovastatina	50
6.4.1.	Obtención de las muestras	50
6.4.2.	Extracción de lovastatina	51
6.5.	Cuantificación de lovastatina	52
6.5.1.	Activación de lovastatina	52
6.5.2.	Curva de calibración de lovastatina por espectrofotometría UV	52
6.5.3.	Curva de calibración de lovastatina por HPLC	52
6.5.4.	Cuantificación de lovastatina por espectrofotometría UV	52
6.5.5.	Cuantificación de lovastatina por el método de bioensayo	53
6.6.	Análisis de datos	53
7.	RESULTADOS	54
7.1.	Producción de biomasa	54
7.1.1.	Fermentación en medio líquido	54
7.1.2.	Fermentación en medio sólido	55
7.2.	Curva de calibración	56
7.3.	Fermentación en medio líquido	57
7.3.1.	Producción de lovastatina intracelular	57
7.3.2.	Producción de lovastatina extracelular	57
7.4.	Fermentación en medio sólido	58
7.4.1.	Producción de lovastatina intracelular	58
7.4.2.	Producción de lovastatina extracelular	58
7.5.	Producción de lovastatina en cuerpo fructífero	59
7.6.	Parámetros cinéticos	59
7.7.	Concentración de lovastatina por el método de actividad antimicrobiana	60
7.8.	Bioensayo	61
8.	DISCUSIÓN	62
8.1.	Evaluación de la producción intracelular y extracelular de lovastatina	62

8.2.	Evaluación de la producción de lovastatina en cuerpo fructífero	64
9.	CONCLUSIONES.....	65
10.	PERSPECTIVAS.....	66
11.	REFERENCIAS	67
12.	ABREVIATURAS	76
13.	PUBLICACIONES	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Ruta biosintética del colesterol (Fernández y cols. 2003).	17
Figura 2. Inhibición de la biosíntesis del colesterol (Radha y Lakshmanan 2012).	20
Figura 3. Estructura molecular de lovastatina (Alarcón y cols. 2003).	21
Figura 4. Fórmulas estructurales de lovastatina (Samiee y cols. 2003).	22
Figura 5. Esquema de basidioma (Carrillo 2003).	23
Figura 6. Esquema de la reproducción sexuada de Basidioma. (Modificada de Courssuperieur de mycologiemédicale. Paris. Institut Pasteur, 1980).	27
Figura 7. Partes fundamentales de <i>Pleurotus</i> (Sánchez 1998).	28
Figura 8. Esquema de cultivo de hongos comestibles. a) Propagación de la cepa a partir de esporas o micelio, b) esterilización del grano, c) Inoculación del grano para producir la semilla, d) Inoculación del sustrato con la semilla, e) Cultivo de <i>Lentinula edodes</i> , f) Cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> y g) Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Stamets 1995).	31
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología.	47
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> (ATCC-32783) en fermentación líquida.	54
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> (ATCC-32783) en fermentación sólida.	55
Figura 12. Curva de calibración de lovastatina pura analizada por espectrofotometría.	56
Figura 13. Curva de calibración de lovastatina pura analizada por HPLC.	56
Figura 14. Concentración de lovastatina intracelular en fermentación líquida analizada por espectrofotometría.	57
Figura 15. Concentración de lovastatina extracelular en fermentación líquida analizada por espectrofotometría.	57
Figura 16. Concentración de lovastatina intracelular en fermentación sólida analizada por espectrofotometría.	58
Figura 17. Concentración de lovastatina extracelular en fermentación sólida analizada por espectrofotometría.	58
Figura 18. Concentración de lovastatina en cuerpo fructífero analizada por espectrofotometría.	59
Figura 19. Zonas de inhibición en el crecimiento de <i>C. albicans</i> por lovastatina pura.	60
Figura 20. Curva de concentración de lovastatina vs. zona de inhibición en el crecimiento de <i>C. albicans</i>	61
Figura 21. Zonas de inhibición en el crecimiento de <i>C. albicans</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Composición del medio de cultivo en FML y FMS sobre soporte inerte.	49
Tabla 2. Parámetros cinéticos y producción de lovastatina de <i>P. ostreatus</i>	59

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Colesterol

El colesterol es un lípido estructural importante de las biomembranas y precursor inmediato de la síntesis de vitaminas, hormonas, esteroides y ácidos biliares. La síntesis del colesterol es llevada a cabo por diferentes procesos utilizando diferentes enzimas, entre las principales enzimas se encuentran la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa que es la enzima clave en la conversión del mevalonato (figura 1). En la sangre de un individuo en ayunas el colesterol se encuentra ligado a tres clases principales de lipoproteínas: las de baja densidad (LDL) que contienen entre el 60 y el 70% del colesterol sérico; las de alta densidad (HDL) con un contenido del 20 al 25% del colesterol total (CT) y las de muy baja densidad (VLDL) que contienen entre un 10-15% del colesterol junto con la mayor parte de los triglicéridos séricos. El nivel óptimo de colesterol debe ser inferior a 100 mg/dL y mayor a 60 mg/dL (Radha y Lakshmanan 2012).

A pesar de encontrarse normalmente en nuestro organismo, las concentraciones elevadas de colesterol constituyen un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, dado que la Organización Mundial de la Salud informó que por enfermedades cardiovasculares murieron cerca de 17.3 millones de personas en 2008 y reportó que podrían morir 23.6 millones a causa de estas enfermedades en los próximos 15 años. Considerando que el promedio de edad para que una persona pueda sufrir un ataque al corazón por causa de concentraciones por encima de los valores normales de colesterol ha llegado a un rango entre 30-40 años.

El 60% del colesterol total es sintetizado en el hígado (Radha y Lakshmanan 2012). El inhibir la síntesis del colesterol es el procedimiento más eficaz para disminuir los niveles de colesterol total en plasma (Johnson y cols. 1997).

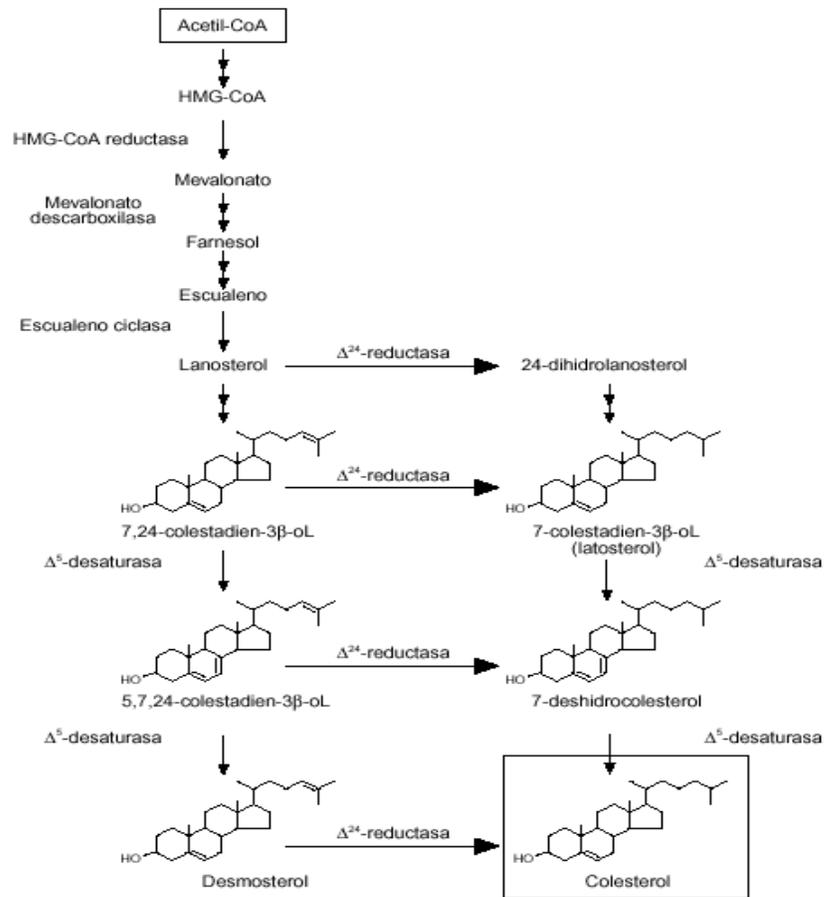


Figura 1. Ruta biosintética del colesterol (Fernández y cols. 2003).

1.1.1. Patologías ocasionadas por desequilibrio en la concentración del colesterol

El aumento o el desequilibrio en la concentración del colesterol conducen a diversos trastornos cardiovasculares como la hipercolesterolemia, aterosclerosis, infarto agudo al miocardio, ateroma, enfermedades vasculares periféricas, entre otras (Radha y Lakshmanan 2012).

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que da origen otras patologías como son: infartos al miocardio y cerebrales, aneurisma aórtico y vasculopatía periférica. La aterosclerosis se define como la combinación entre diversos grados de alteraciones arteriales en su capa íntima por acumulación local de lípidos, de los constituyentes sanguíneos y del tejido fibroso, acompañado por alteraciones de la capa media de la pared vascular. Donde las LDL modificadas por procesos oxidativos tienen un papel central en el

desarrollo de la placa de ateroma y no sólo por su contribución a la formación de células espumosas, al ser captadas por los macrófagos a través de receptores llamados “Scavenger” o basureros altamente especializados en reconocer a las LDL modificadas por la oxidación, como también por su participación en la lesión endotelial, en la inducción de autoanticuerpos y en la formación de radicales libres pro oxidantes, secundarios a las formas lipídicas degradadas, que modifican diversos factores de transcripción asociados al mantenimiento del proceso inflamatorio. Así pues las LDL modificadas son un nexo de unión, al actuar en los dos frentes, entra la formación del depósito lipídico ateromatoso y la inducción inflamatoria de la placa (Li y cols. 2002).

1.1.2. Tratamiento para dichas patologías

Las recomendaciones del equipo médico de salud para lograr disminuir el riesgo cardiovascular ocasionado por un desequilibrio en las concentraciones del colesterol se enfocan en una dieta hipolipídica, hipohidrocarbonada, con suficiente cantidad de fibra, agua y ejercicio (Conly y cols. 2011). Sin embargo también se considera una sinergia con el tratamiento farmacológico en el que se incluyen tres grupos de fármacos: las estatinas que son los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, las resinas secuestradoras de ácidos biliares y el ácido nicotínico. Los derivados del ácido fíbrico, como el gemfibrozilo, son fármacos de segunda línea y su máxima eficacia reside en la disminución de los triglicéridos (Lee y cols. 2002).

1.2. Estatinas

Las estatinas son compuestos bioactivos de origen microbiano inhibidores reversibles de la enzima microsomal (HMG-CoA) reductasa que convierte a HMG-CoA a mavalonato, el paso que determina la velocidad de síntesis del colesterol endógeno (Álvarez de Sotomayor y cols. 1999). Las estatinas no sólo logran reducciones muy importantes del LDL sino también un aumento del HDL y disminución de los triglicéridos por eso son el tratamiento más eficiente en las patologías con riesgo cardiovascular. La vía biosintética involucrada en la producción de estatinas inicia por unidades de acetato, unidas entre sí para la formación de cadenas de poliacetatos (Sreenivasan y cols. 2008, Marcin y Stanislaw 2009).

1.2.1. Capacidades biológicas de las estatinas

Entre sus capacidades biológicas se encuentran la capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria y la lesión secundaria de la isquemia aguda, ya que reducen el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico en pacientes con riesgo de enfermedad vascular; esto lo hacen aumentando la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) debido a su capacidad para regular al máximo la sintasa de ON. Por lo tanto las estatinas se han considerado en el tratamiento de patologías del sistema de nervioso central como lo son: isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, tumores, y trauma (Stêpieñ y cols. 2005).

Estas propiedades hacen de las estatinas los fármacos hipolipemiantes más utilizados en la clínica, tanto para tratamientos de prevención primaria como secundaria en enfermedades cardiovasculares. Algunos beneficios clínicos de estos compuestos, además de disminuir el colesterol plasmático son: mejorar la respuesta inflamatoria, fibrinólisis, coagulación, proliferación celular y la función endotelial (Kwak y cols. 2000).

1.2.2. Inhibición de la síntesis del colesterol

Las estatinas son un compuesto eficiente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares ya que tienen la capacidad de disminuir el colesterol total por dos mecanismos; uno es por inhibición competitiva y reversible de la HMG-CoA reductasa, y el otro mecanismo de acción es el aumento del catabolismo de lipoproteínas en el hígado (Piedras-Huerta y cols. 2001).

La enzima que cataliza la conversión de la HMG-CoA a mevalonato es la HMG-CoA reductasa, la inhibición de esta enzima es la clave para impedir la conversión del colesterol endógeno, por lo que, la enzima (HMG-CoA reductasa) se une al inhibidor enzimático (estatinas) en lugar de unirse a la HMG-CoA y impide así la formación de mavalonato y por consiguiente la formación del colesterol (Figura 2).

El aumento del catabolismo de lipoproteínas en el hígado se lleva a cabo de la siguiente forma: aumentando los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que cumplen la

función de captar no sólo estas moléculas, sino también a sus precursores, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y sus remanentes VLDL cuya hidrólisis producen LDL. Cuantas más VLDL y remanentes sean captados, menor número de LDL se formará; por tanto, el aumento de receptores LDL inducido por las estatinas, consigue por un mecanismo indirecto, el aumento del catabolismo de las VLDL y sus remanentes, reduciendo el número de moléculas que se convertirán en LDL. Esta acción sobre las VLDL, explica por qué las estatinas son capaces de reducir las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Álvarez de Sotomayor y cols. 1999). Son justo estos mecanismos de acción lo que hace de las estatinas el tratamiento más funcional y eficiente en el uso de enfermedades cardiovasculares.

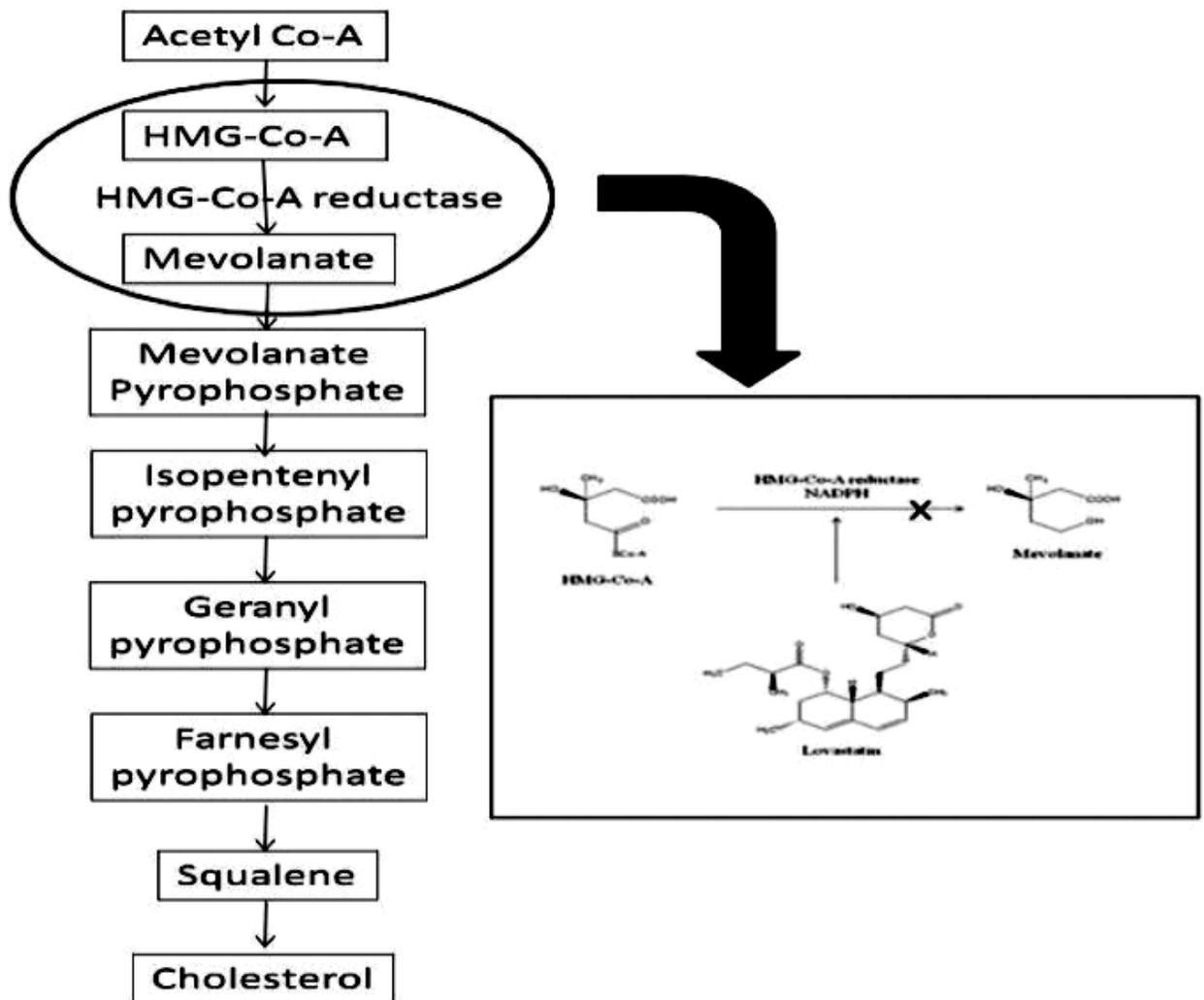


Figura 2. Inhibición de la biosíntesis del colesterol (Radha y Lakshmanan 2012).

1.2.3. Tipos de estatinas

Existen diversos tipos de estatinas que se pueden clasificar de acuerdo a su origen como: biológicas (lovastatina y compactina); y sintéticas, derivadas de las naturales (pravastatina, simvastatina, rosuvastatina, cerivastatina, atorvastatina y fluvastatinas) (Chakravarti y Sahai 2004).

1.3. Lovastatina

La lovastatina fue la primera estatina aprobada por la FDA de E.U.A en 1987. La más potente y de escasa hepatotoxicidad. Mevinolina, monacolina K o lovastatina ($C_{24}H_{36}O_5$) (Figura 3), es un policétido fúngico, que puede existir en dos formas: forma de lactona y en forma de hidróxilo (Figura 4), de las cuales la forma de hidroxilo es el fármaco activo (Samiee y cols. 2003). Lovastatina está compuesta por un anillo de hexahidro-naftaleno y un anillo de hidroxil-lactona, en el que el anillo de lactona se une a la HMG-CoA y por lo tanto inhibe la formación de colesterol. La lovastatina y otros derivados naturales y sintéticos constituyen el grupo de estatinas que han llamado la atención de numerosas compañías farmacéuticas (Di Napoli y cols. 2005).

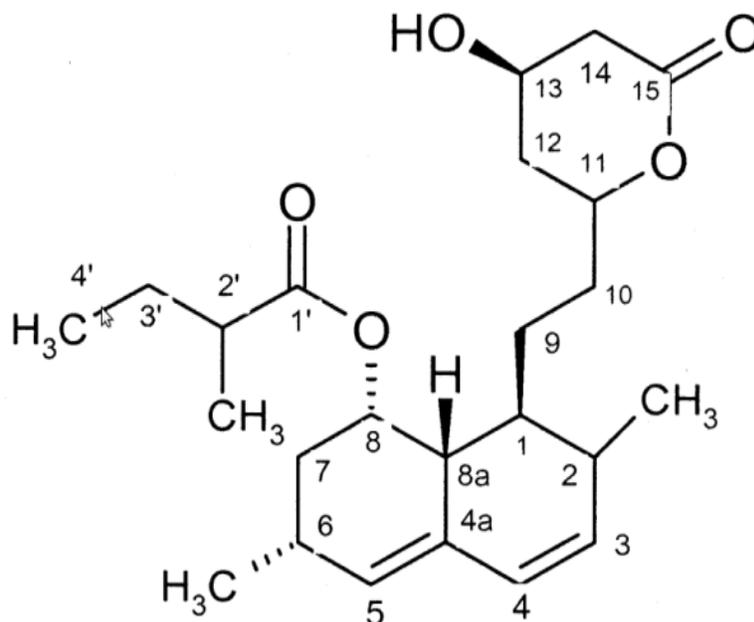


Figura 3. Estructura molecular de lovastatina (Alarcón y cols. 2003).

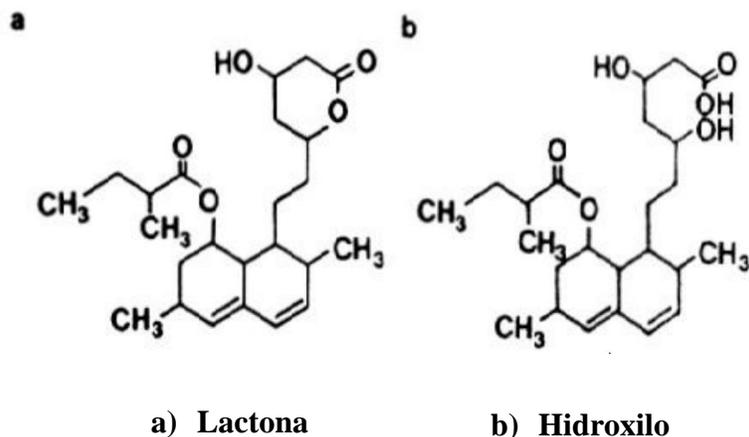


Figura 4. Fórmulas estructurales de lovastatina (Samiee y cols. 2003).

1.3.1. Propiedades de lovastatina

La lovastatina incrementa la producción de ON al estimular y sobre-expresar la enzima sintasa endotelial del ON (eNOS), en un proceso dependiente de la inhibición de la genil geranil transferasa, lo que prolonga la vida media del RNA mensajero de la eNOS, pero no la transcripción de su gen. Además incrementa la actividad de eNOS al aumentar su fosforilación en un proceso dependiente del sistema fosfatidilinositol-3-cinasa/proteína cinasa Akt (Ptdins-3K/Akt). Así también, inhiben la expresión de la endotelina-1, un potente vasoconstrictor (Álvarez de Sotomayor y cols. 1999). Es esta acción la que revela como la lovastatina es eficaz para mejorar la función endotelial (Di Napoli y cols. 2005).

La lovastatina también es un potente agonista de la apoptosis de células cancerígenas, esto se debe a la forma de anillo abierto que es el agonista eficaz de la apoptosis. Por lo tanto, la orientación del anillo de lactona de lovastatina puede representar un enfoque terapéutico novedoso en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Dimitroulakos y cols. 2001).

1.3.2. Origen de lovastatina

La lovastatina es un metabolito que se obtiene de diferentes géneros y especies de hongos filamentosos por diferentes procesos de fermentación; dentro de los principales géneros están: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pythium*, *Gymnoascus* y *Pleurotus*, entre otros (Chakravarti y Sahai 2004).

Se han aislado una amplia variedad de compuestos bioactivos de muchas especies de hongos comestibles por lo tanto el uso de los hongos comestibles con propiedades terapéuticas ha provocado el interés global de la comunidad científica y clínica debido a que los hongos comestibles han mostrado ser eficientes contra numerosas enfermedades y desordenes metabólicos tan serios como el cáncer o enfermedades degenerativas. Estos efectos terapéuticos parecen tener múltiples acciones farmacológicas complejas en diferentes objetivos celulares y moleculares (Poucheret y cols. 2006). Dentro de los metabolitos se incluyen una amplia variedad de grupos; entre los que se encuentran los terpenoides, esteroides, ácidos grasos, proteínas, lectinas, proteoglicanos y polisacáridos.

En la actualidad los polisacáridos producidos por hongos, por su composición y estructura, parecen conferir muchas actividades biológicas importantes tales como: antitumoral (Wang y cols. 2005), antioxidante (Liul y cols. 2010), antiviral, inmunomoduladora, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria, hipoglucemiante e hipolipemiante (Hu y cols. 2006). Muchos de los polisacáridos responsables de esas actividades son los β -glucanos y los metabolitos secundarios (Gil-Ramírez y cols. 2011).

1.5. *Pleurotus ostreatus*

La especie de *P. ostreatus* ha sido comúnmente llamada seta u ostra por su parecido a la ostra y por su forma de concha pero también por otra parte la población rural conoce este hongo con los nombres de “hongo seta”, “hongo del maguey”, “hongo blanco”, “hongo del rastrojo”, y “hongo de la pulpa de café” (Guzmán 1997).

Su tamaño varía en función de la edad y de la cantidad de sustrato que lo alimenta. La forma depende también de la edad, primero es abombada y finalmente llega a ser plana. En cuanto al color puede variar desde el gris claro a gris pizarra oscuro de tono violáceo o azulado y desde color café con leche a pardo. Algunas variedades pueden presentar tonos verdosos o azul-verdoso muy llamativos (Gregori y cols. 2007). La composición química de *P. ostreatus* es muy variable dependiendo de la edad y la variabilidad es ocasionada por diferencias en el contenido de humedad, la temperatura y la presencia de nutrientes (Sánchez 2009).

En general *P. ostreatus* es un organismo que se ha considerado como un alimento nutracéutico, ya que es bajo en calorías y grasas, pero rico en proteína y fibra. Posee un alto contenido de humedad, entre 87 y 93% según las condiciones de manejo al momento de la cosecha y reporta un contenido de proteína de 30.4% del peso seco. La proteína de este hongo contiene los nueve aminoácidos esenciales requeridos por los seres humanos, también es una buena fuente de los nutrientes como el fósforo, el hierro y las vitaminas, incluyendo tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, ergosterol, y la niacina. El nivel de ácidos grasos en este hongo es generalmente bajo, alrededor de 2-8%. El nivel de ácidos grasos polinsaturados en comparación con ácidos grasos saturados es bastante alta, lo que constituye más del 75% del total de ácidos grasos, de los cuales los ácidos oleico y linoleico son los más significativos (Cardona 2001).

Los atributos principales de este hongo son sus propiedades medicinales que han sido el tema de varios investigadores en todo el mundo. Las propiedades farmacológicas y fisiológicas de los hongos *P. ostreatus* mejoran la actividad inmunológica, el mantenimiento de la homeostasis, regulan los ritmos biológicos, curan y previenen diversas enfermedades como el cáncer, accidente cerebrovascular y las enfermedades isquémicas del corazón (Thekkuttuparambil y cols. 2007).

Se ha reportado la presencia de algunos compuestos bioactivos en *P. ostreatus*, dentro de los más importantes están las estatinas, lectinas, proteínas, polisacáridos y glicoproteínas que presentan actividades biológicas como antiproliferativas, anticancerígenas e hipolipemiantes, entre otras (Hu y cols. 2006).

1.5.1. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*

En el ciclo de vida de este hongo, se presentan tres fenómenos importantes: (Moore-Landecker 1996, Herrera y Ulloa 1998):

- Plasmogamia: Fusión de dos células de micelio primario, a través de la cual los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común.
- Cariogamia: Fusión de los núcleos de las dos células de micelio primario.

- Meiosis: División nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide al estado haploide.

La fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denomina haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se llaman diplontes. En algunos basidiomicetes como en el caso de *Pleurotus*, la cariogamia no se lleva a cabo de manera inmediata a la plasmogamia de tal forma que se produce una fase dicariótica o dicariofase en la cual, se obtiene una célula denominada dicariocito o dicariote misma que posee dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad y cada uno de ellos se conoce como dicarion (Herrera y Ulloa 1998).

El ciclo de vida (figura 6), comienza cuando se presenta la germinación de una basidiospora la cual produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides que al ramificarse conforman el micelio primario, mismo que continua creciendo de forma monocariótica hasta que pueda realizarse la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Después de que ambas células se fusionan, el septo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicarióticos en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de este último, se obtienen núcleos haploides, que emigran a la parte externa del basidio y una vez allí, son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio monocariótico o primario y comienza nuevamente el ciclo (Larraya y cols. 1999, Ramírez y cols. 2000, Valencia del Toro 2002).

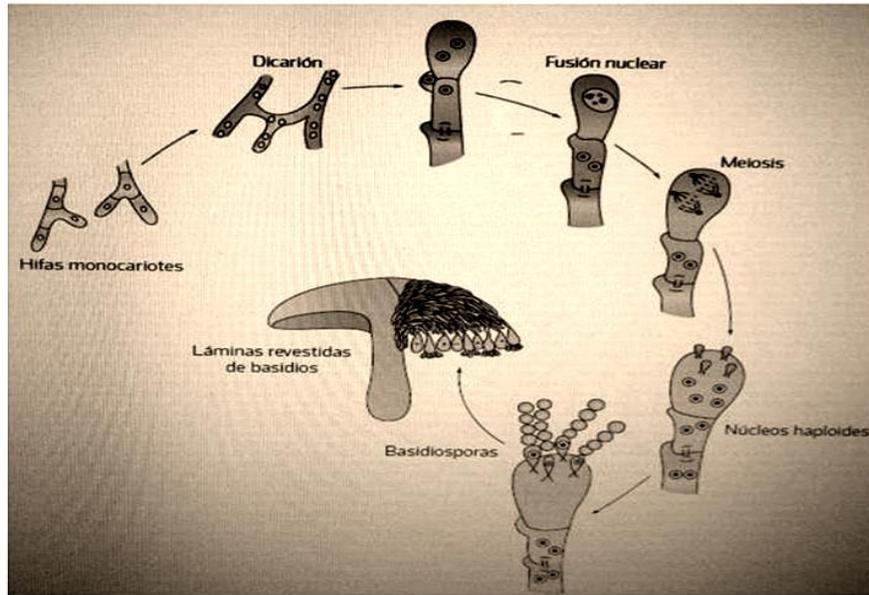


Figura 6. Esquema de la reproducción sexual de Basidioma. (Modificada de Cours supérieur de mycologiemédicale. Paris. Institut Pasteur, 1980).

1.5.2. Estructura de *Pleurotus ostreatus*

El cuerpo de las setas se constituye principalmente de: píleo (sombrero), estípite (pie), himenio (laminas) y esporas (Bermúdez y cols. 2003). Píleo: tiene forma de paraguas, más o menos circular, su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, (figura 7). (Gaitán y cols. 2006). Estípite: es firme, blanco, algo peludo en la base, (García 1986) muy corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro, con el principio del himenio en la parte de arriba. Himenio: están dispuestas radialmente como las varillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene, hasta el borde. Son anchas, espaciadas unas de otras, de color blanco o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie (Clyde 1964). Esporas: son de blancas a cremosas, cilíndricas de 8-11×3-4 μm , hialinas y lisas (Clyde 1964).

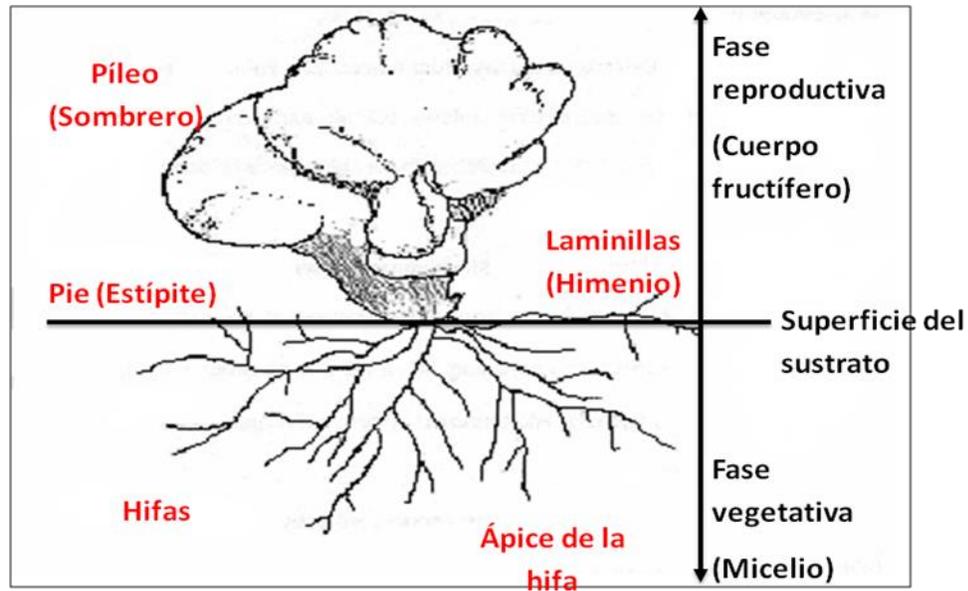


Figura 7. Partes fundamentales de *Pleurotus* (Sánchez 1998).

1.5.3. Producción industrial de *Pleurotus ostreatus*

La producción de *P. ostreatus* es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y cada vez cobra mayor importancia en el ámbito económico de muchos países.

Hasta 1980, las cuatro especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo eran *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (Seta u ostra), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Volvariella volvacea*. Desde entonces el género *Agaricus* ha sido el hongo comestible más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte, *Lentinula edodes* es producido en su mayor parte en Japón, *Volvariella* en países Asiáticos y *Pleurotus* en México y Sudamérica (Chang 1999).

En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, han incrementado su popularidad mundial en los últimos años, debido a su habilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas y su capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de cereales (Bonatti y cols. 2004), papel (Baysal y cols. 2003), pulpa de café (Salmones y cols. 2005), residuos vegetales así como desechos lignocelulósicos de la industria alimenticia (Cohen y cols. 2002, Shashirekha y cols. 2002).

1.6. Sistemas de fermentación

La fermentación puede definirse como un proceso bioquímico en el cual, se obtiene la energía ATP, a través de las reacciones de oxido-reducción, es decir aquellas en las que los electrones son transferidos desde un compuesto, el dador electrónico o agente reductor, a un aceptor electrónico, el agente oxidante (Lehninger 1979).

1.6.1. Fermentación en medio líquido

La fermentación en medio líquido (FML) es definida como un cultivo de microorganismos dispersos en forma homogénea en un matraz agitado que puede o no ser aireado por medios mecánicos. En este sistema, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interface gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. 3) Disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel 1991). El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los microorganismos. Inicialmente, todos los procesos de producción se realizaron en fermentación en medio líquido (FML) o fermentación sumergida, variando parámetros físico-nutricionales (Jaivel y Marimuthu 2010).

1.6.2. Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido (FMS), involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas de sustratos sólidos húmedos en ausencia de agua libre entre las partículas. En este tipo de fermentación el sustrato debe poseer la humedad necesaria para mantener el crecimiento y metabolismo del microorganismo seleccionado en la bioreacción. Se deben considerar varios aspectos importantes para el desarrollo de cualquier bioproceso en FMS estos incluyen: la selección del microorganismo, la selección del sustrato, la cantidad de agua en el sistema apropiado, entre otros. La FMS ha sido ampliamente empleada en producciones industriales, debido a sus ventajas tales como mejor control del proceso,

menor posibilidad de contaminación, menor sensibilidad a la represión metabólica, mayor concentración de los productos, entre otros, y ha incrementado su popularidad debido a la obtención de mayores rendimientos de varios productos de importancia industrial como enzimas, pigmentos, antibióticos, metabolitos entre otros. La FMS en los últimos siglos ha generado gran interés debido a que estos procesos se han convertido en una herramienta biotecnológica importante para la producción de diferentes bioproductos (Mitchell y cols. 2000).

1.6.3. Producción de cuerpos fructíferos

La producción de cuerpos fructíferos (CF) se realiza con base en tecnología aplicada al cultivo de hongos comestibles y permite obtener grandes producciones en relativamente poco espacio (figura 8), tiene una amplia aceptación a nivel urbano y rural por sus propiedades alimenticias. La producción inicia con el crecimiento del micelio sobre PDA (agar papa dextrosa) o agar de extracto de malta, partiendo de esporas o utilizando cualquier parte del cuerpo fructífero para obtener el micelio. Una vez que se tiene el micelio se puede llevar a cabo el desarrollo de CF. Estos se pueden crecer sobre diferentes sustratos entre los principales se encuentran los materiales lignocelulósicos, los cuales constituyen los compuestos orgánicos más abundantes del planeta, producidos fundamentalmente por las plantas; sin embargo lo más común es que se cultiven en residuos agrícolas ricos en estos compuestos. El sustrato a utilizar se hidrata, se pasteriza por inmersión en agua a 67.7°C durante 30-45 minutos o con vapor a 60°C durante seis horas (Stamets y Chilton 1983). En algunas investigaciones también se han empleado agua a 80°C durante 45 min (Velásquez y cols. 1999). Las condiciones apropiadas del ambiente y del sustrato al momento de la siembra y cosecha pueden considerarse como las siguientes: por una parte, humedad del sustrato en el momento de la pasterización es de 70-75% y humedad relativa del sustrato 82 a 86% (Steineck 1987); temperatura del sustrato de 27.7 a 30°C; concentración de CO₂ del sustrato 20000 ppm; pH 6.0 a 6.5, (Vedder 1986); y por último la temperatura durante la fase de incubación 28°C (García 1987); en estas condiciones, la incubación se lleva a cabo de 10-14 días (Flegg y cols. 1985); por otra parte durante la fructificación la temperatura debe ser de 10-15°C (Zervakis y Balis 1992); la

concentraciones de CO₂ durante la fructificación debe ser inferior de 0.08%; la humedad relativa 90-95%; y la luz de 8-12 horas diarias.

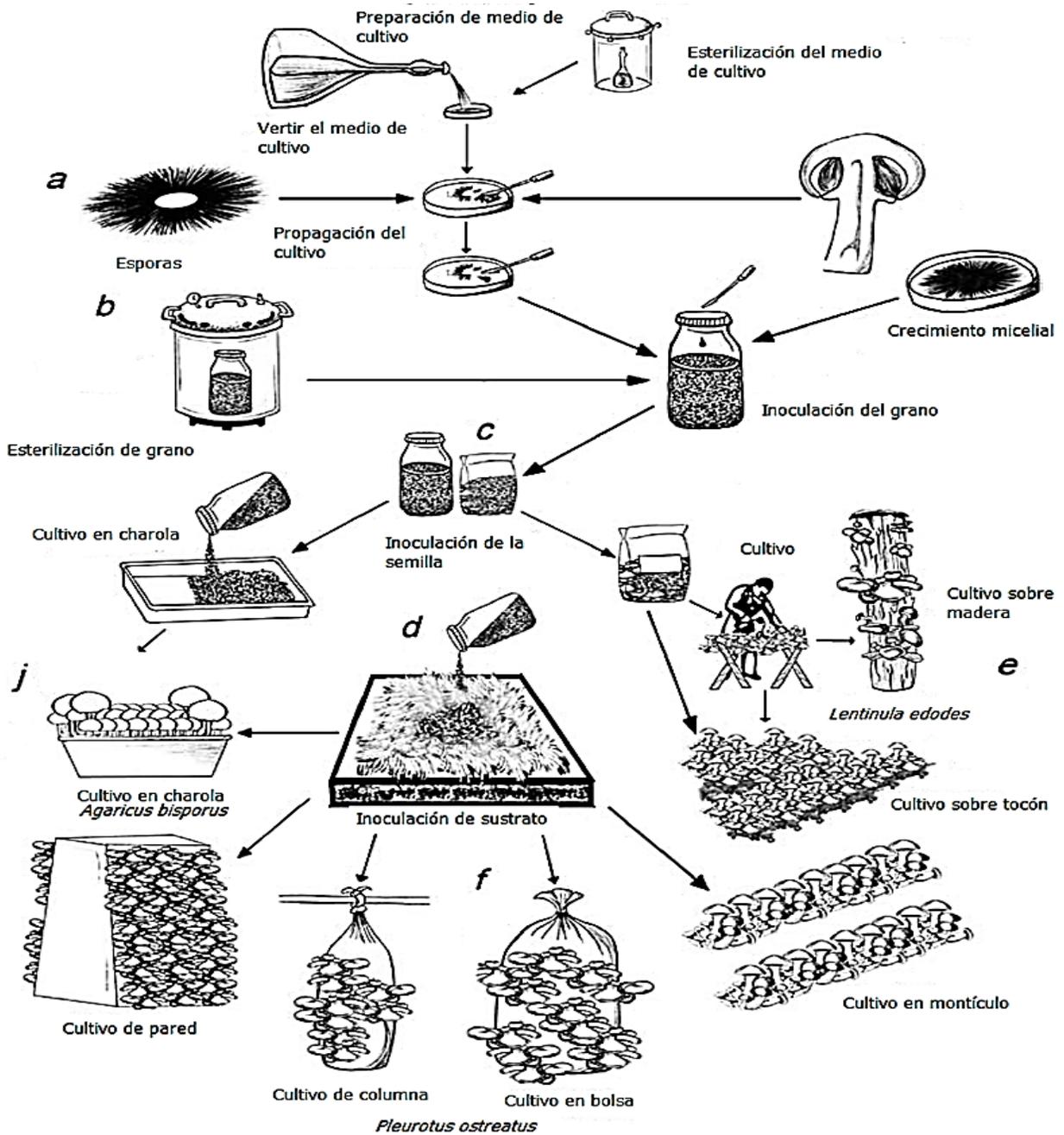


Figura 8. Esquema de cultivo de hongos comestibles. a) Propagación de la cepa a partir de esporas o micelio, b) esterilización del grano, c) Inoculación del grano para producir la semilla, d) Inoculación del sustrato con la semilla, e) Cultivo de *Lentinula edodes*, f) Cultivo de *Agaricus bisporus* y g) Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Stamets 1995).

2. ANTECEDENTES

P. ostreatus es un organismo que ha sido conocido por su valor nutricional y su valor culinario, sin embargo este organismo también puede ser utilizado como medicamento. En términos más recientes *P. ostreatus*, puede ser considerado como un alimento nutracéutico ya que además de proporcionar beneficios para la salud más allá de la nutrientes tradicionales como los son, su alto contenido de fibra, la presencia de los nueve aminoácidos esenciales, y su bajo contenido en lípidos (Cardona 2001), también es útil como una fuente de compuestos biológicamente activos de valor medicinal que incluyen su capacidad anticancerígena (Wang y cols. 2005), antiviral, hepatoprotectora (Hu y cols. 2006), antioxidante (Liul y cols. 2010) y la presencia de agentes hipocolesterolémicos (Alarcón y cols. 2003). Sin embargo los mecanismos de los diversos beneficios para la salud de *P. ostreatus* a los seres humanos siguen necesitando de extenuante investigación, especialmente teniendo en cuenta la aparición de nuevas pruebas de sus beneficios para la salud de los seres humanos (Rathee 2011).

Dentro de las propiedades hipocolesterolémicas existen diferentes estudios que revelan dichas propiedades, dentro de estas están la investigación de Chen y cols. (2012) donde evaluaron el contenido de lovastatina, ácido gamma-aminobutírico o GABA y ergotioneina en cuerpos fructíferos y micelio de 29 especies de hongos comestibles, entre los que se encontraba el género *Pleurotus* y tres especies *ostretus* obtenidas de los mercados locales de Corea, Japón y Taiwán. Los resultados mostraron que el cuerpo fructífero de *P. ostreatus* derivado del mercado local de Japón presentó el mayor contenido de lovastatina (0.6065 mg/g de peso seco). En cuanto a GABA *Flammulina velutipes* mostró la mayor concentración (0.2297 mg/g de peso seco). En ergotioneina *Pleurotus citrinopileatus* reveló el mayor contenido (2.8507 mg/g de peso seco).

Así mismo en una investigación en la que se analizaron 10 géneros de hongos en fermentación sumergida para evaluar su potencial producción de lovastatina, lograron observar la obtención de lovastatina (18.58 mg/L) por *Pleurotus spp.* derivado del departamento de fisiopatología, Tamil Nadu Agricultural University (Jaivel y Marimuthu 2010).

También en los cuerpos fructíferos de *P. citrinopileatus* se encontró un inhibidor competitivo de la enzima (HMG-CoA) reductasa. La lovastatina se encontró principalmente en el himenio de los basidiocarpos de 10 cm de diámetro a razón de 59.91 mg/g. (Hu y cols. 2006).

Además Gunde-Cimerman y Cimerman (1995) estudiaron la concentración de lovastatina en diferentes partes del cuerpo fructífero fresco de *P. ostreatus* (1ra, 2da, 3ra mitad del estípite, himenio y píleo con himenio) y de diferentes tamaños (2, 5, 10 y 15 cm de diámetro) y encontraron la mayor concentración de lovastatina estaba en el himenio del basidiocarpo de 10 cm de diámetro (27.71 mg/g biomasa seca).

Así mismo se realizaron estudios en tres grupos de ratas hembras de seis semanas de edad con hiperlipidemia inducida con ácidos biliares. En el grupo control se encontraban las ratas con colesterol normal, en el segundo grupo las ratas con hipercolesterolemia y en el tercer grupo las ratas con hipercolesterolemia pero con una adición en la dieta del 5% de harina de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*. Por lo tanto este estudio sugiere que con un 5% de harina de *P. ostreatus* suplementado en la dieta proporciona reducción en triglicéridos, LDL, fosfolípidos, CT y aumento de HDL. Además en este estudio evaluaron la presencia del colesterol en eses, y estos resultados mostraron como el exceso de colesterol simplemente es desechado del organismo (Alam y cols. 2011).

También un estudio *in vivo* demostró que *P. ostreatus* tiene gran importancia como agente terapéutico eficaz en enfermedades hiperlipidémicas especialmente las cardiovasculares con base a investigaciones en donde se observó que dicho hongo impidió la formación de placas de ateroma y la reducción de la incidencia y el grado de lesiones de aterosclerosis en las arterias aorta y coronarias de las ratas (Alam y cols. 2011).

Otra investigación ha mostrado que el hongo *P. ostreatus*, puede disminuir los niveles de lípidos, un hallazgo que ha sido apoyado por los datos preliminares de un ensayo pequeño en seres humanos, pacientes con VIH y con hiperlipidemia inducida por los antirretrovirales (Donald y cols. 2011).

También un análisis realizado en Eslovaquia con tres diferentes grupos de personas que presentaban enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón se les suministró en la dieta 10 g de harina de *P. ostreatus* al día durante seis semanas, esto mostró un aumento de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa y se confirma una significativa reducción de lípidos en plasma (Kajaba y cols. 2008). En otro estudio con ratas en donde se les administró 5% de harina de *P. ostreatus* a ratas macho mostró la disminución del colesterol en suero y en hígado de 33% y 27%, respectivamente. En el mismo estudio se mostró que la adición a la dieta de conejo del 10% de harina de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* redujo el colesterol en sangre en un 65%, también hubo disminución en la incidencia de las placas de aterosclerosis y en el tamaño de la placa, e impidió cambios aterogénicos en las arterias aorta y la coronaria (Alam y cols. 2011).

Como se puede observar son diversos los estudios que revelan la ardua tarea que se está llevando a cabo para incrementar la producción de lovastatina, para poder así contribuir al aumento del conocimiento científico con el fin de verse reflejado en la mejora de la salud.

En cuanto a la optimización de la producción de lovastatina existen diversos estudios en donde se evalúan los parámetros físicos y químicos para aumentar productividad de lovastatina por diferentes especies de organismos. Entre las que se encuentran la de Jaivel y cols. (2010) en la que realizan una investigación sobre FMS por *Aspergillus terreus* y observan que el rendimiento de lovastatina fue mayor al utilizar salvado de trigo como sustrato (982.3 mg/g), seguido por los granos de sorgo, salvado de arroz y paja de arroz.

Además en un estudio en el que estandarizo un medio de cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno desarrollado con *Aspergillus terreus*. Se observó que la biosíntesis de lovastatina resultó dependiente de la fuente nitrógeno sobre todo por los aminoácidos glutamato e histidina, y en menor medida glicina. Una productividad triple específica más alta se encontró con el medio definido en glucosa y glutamato en comparación con un complejo medio a base de glucosa, extracto de levadura, y leche peptonizada. Una explicación puede ser que las condiciones de inanición son necesarias para la producción de metabolitos secundarios. En este caso cuando se ha agotado la fuente de carbono disponible, el

complejo de inanición es aplicado y esto se ve reflejado en una eficiente producción de lovastatina (Hajjaj y cols. 2001).

Así mismo Casas y cols. (2005) muestran como la morfología del Pellet y la producción de lovastatina en cultivos de *Aspergillus terreus* son modificados por los efectos de la agitación y los regímenes de aireación (aire o una mezcla enriquecida en oxígeno que contiene 80% de oxígeno y 20% de nitrógeno en volumen). Esto sugiere que tanto un límite superior en intensidad de agitación y un alto nivel de oxígeno disuelto es esencial para la producción de altos títulos de lovastatina.

También una investigación con aplicación de vectores de oxígeno al medio de cultivo de *Aspergillus terreus* se realizó para examinar los efectos de la adición de un portador de oxígeno (n-dodecano, n-tetradecano, o n-hexadecano) sobre la producción de lovastatina. Así mismo una adición de 2.5% (w/v) n-dodecanoal al medio dio un aumento de 1.4 veces (510 mg/L) en la producción de lovastatina, esta mejora estuvo relacionada con cambios morfológicos en las células del hongo (Lai y cols. 2002).

Un estudio más sobre optimización de factores físicos y químicos para la productividad de lovastatina por *Aspergillus terreus* muestra que el mayor rendimiento se observa a los 8 días de incubación. El pH óptimo fue a 8.5. La harina de avena como fuente de carbono fue la más eficiente. La metionina como un aminoácido dio lugar a un aumento en la producción de lovastatina. La mejora nutricional aumenta el nivel de productividad de hasta 188.3 mg/L en comparación con la fermentación con el medio de cultivo original (54.5 µg/mL) (Osman y cols. 2011).

Aunado a estos estudios Alarcón y Águila (2006) realizaron un estudio en el que evaluaron once medios de cultivo para la producción de lovastatina por una cepa nativa PLUBB-127 de *Pleurotus ostreatus* los cuales contenían principalmente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 (1%), extracto de malta, glucosa, extracto de levadura, agua de peptona. La diferencia entre estos medios de cultivo era la modificación de la relación carbono nitrógeno. Los resultados mostraron un aumento

importante en el contenido de lovastatina en relación con el aumento en la concentración de nitrógeno en los medios de cultivo. La producción máxima encontrada fue de 4.15 mg/L.

Así mismo Lakshmanan y Radha (2012) reportaron los resultados de su investigación en la cual llevan a cabo la optimización de la producción de lovastatina por *P. ostreatus* sobre fermentación en medio sólido, para lo cual utilizaron diferentes sustratos biodegradables y diferentes temperaturas. Como sustratos utilizaron: salvado de trigo, salvado de arroz, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, harina de avena, cáscaras de coco, aserrín, maíz, soya, cáscaras de garbanzo y añadieron al medio de cultivo $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2HPO_4$, NaCl. Las diferentes temperaturas a las cuales se llevaron a cabo las fermentaciones fueron: 25, 28, 32 y 35°C. Obteniendo una mayor concentración de lovastatina en salvado de trigo a una temperatura de 28°C (113 mg/L).

Por otro lado en cuanto a los métodos de extracción de lovastatina se exponen algunos de los estudios realizados. Utilizando solventes, ya sean líquido-líquido o sólido-líquido, se distinguen tres tipos: aquellos en los que la lovastatina es extraída en su forma lactona disminuyendo el valor de pH, los métodos en los cuáles la lovastatina es extraída en su forma β -hidroxiácida, y aquellos en los que ambas formas están presentes en diferentes proporciones (Alberts y cols. 1980, Friedrich y cols. 1995, Li y cols. 2005). A continuación se presentan algunos de los resultados publicados en los cuales utilizan como solventes acetonitrilo, etanol, metanol y acetato de etilo.

Morovjány y cols. (1997) usaron dos diferentes solventes, acetonitrilo y metanol, para la extracción de muestras de caldos de fermentación. Se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 95 y 98%, pero se descubrió que estos disminuían cuando la muestra era acidificada. Debido a los inconvenientes reportados anteriormente, Friedrich y cols. (1995) por lo tanto realizaron la extracción con acetonitrilo.

Por su parte el grupo de Su y cols. (2003) usaron un método basado en el descrito por Samiee y cols. (2003). El método fue modificado al adicionar un paso de lactonización con ácido trifluoroacético al 1.0% v/v previo a la concentración, sin especificar cómo puede

llevarse a cabo esta concentración. Finalmente se resuspendió el extracto seco en acetonitrilo. Cabe destacar que la concentración es un paso crítico cuando se emplea esta metodología, ya que según Yang y cols. 2006, Ou y cols. 2009 si se emplean temperaturas elevadas (90-100°C) se provocaría una degradación de las estatinas, disminuyendo la recuperación de la forma lactona y aumentando la de la forma β -hidroxiácida, dando recuperaciones de 123-137%, por lo que se deben de descartar todos aquellos procedimientos que utilicen temperaturas elevadas. Debido a esto, se propuso estudiar el efecto del calentamiento para la concentración de la lovastatina cuando se aplica ésta metodología. Éste finalmente es el método más utilizado para la extracción de lovastatina en forma lactona previo a su análisis por HPLC, sin embargo, existen metodologías basadas en ésta, con pequeñas modificaciones (Sayyad y cols. 2007, Panda y cols. 2009).

Casas y colaboradores (2003) tomaron en cuenta los hallazgos de Friedrich y cols. (1995) y Morovjány cols. (1997) y determinaron la lovastatina en su forma hidroxiácida. Para ello emplearon caldo de cultivo que contenía la forma hidroxiácida y lo diluyeron diez veces en una mezcla acetonitrilo/agua 1:1 v/v, previo al análisis. También establecieron las condiciones para convertir el estándar de la forma lactona a la forma hidroxiácida por disolución en una solución de NaOH 0.1N y etanol (1:1 v/v), calentamiento de la solución a 50°C por 20 min y neutralización. Varios métodos derivados de éste han sido reportados (Hajjaj y cols. 2001, Pattanagul y cols. 2008, Baños y cols. 2009).

En 2010 Jaivel y Marimuthu después de 15 días de fermentación, realizaron la extracción con acetonitrilo por agitación en un agitador rotatorio durante 60 min a 220 rpm, luego la muestra se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm.

Chen y cols. (2012) reportan la extracción que realizan al polvo liofilizado de cuerpos fructíferos, en el cual hacen la extracción a través de rotavapor a 150 rpm a 25°C durante 24 h con acetonitrilo.

También Miranda y cols. (2013) publican un método de extracción de lovastatina tanto en fermentación en medio líquido como en fermentación en medio sólido basado en los

estudios de Baños y cols. (2009), en el cual utilizan acetonitrilo/agua (1:1v/v). Se toma 1 g de muestra y se añade 10 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1 v/v), seguido de una agitación a 200 rpm durante 30 min, e incubación en un baño sónico durante 30 min.

Subsiguientemente a estas investigaciones Gulyamova y cols. (2013 y 2014) realizaron análisis en la biomasa y micelio obtenidos de la fermentación en medio líquido y fermentación en medio sólido. La biomasa obtenida por fermentación en medio líquido fue centrifugada a 6000 rpm durante 20 min. 1 g de micelio es lavado con HCl 0.05 M y es extraído con 20 mL de acetonitrilo en un agitador rotatorio durante 60 min a 160 rpm. Los extractos se fueron secados con Na₂SO₄ concentrado a 2 mL por evaporación al vacío. El micelio fue extraído a partir de 1 g de sustrato con 20 mL de acetonitrilo por agitación en un agitador rotatorio durante 60 min a 160 rpm, se centrifugó durante 10 min a 6000 rpm, y luego se utilizó el sobrenadante para los análisis.

Así mismo debido a la existencia de una amplia variedad de solventes empleados en la literatura para la determinación de lovastatina, Li y cols. (2005) hicieron pruebas para determinar el solvente óptimo para la extracción de lovastatina en arroz fermentado con *Monascus purpureus* usando su método antes reportado (Li y cols. 2004). Para ello hicieron pruebas con etanol, metanol y acetato de etilo, debido a la buena solubilidad de la lovastatina en éstos solventes, pero encontraron que añadiendo una cantidad apropiada de agua al solvente se mejora la disolución de los compuestos de interés (estatinas), ya que ayudan a permear el polvo de arroz y consecuentemente promueven su extracción del material base. La mezcla que consideraron óptima fue la de etanol y agua (75:25 v/v) por 90 min. El rendimiento reportado con este método fue de 98.90% con un % DER (desviación estándar relativa) de 1.2%. Éste método fue empleado por Chairote y cols. (2008) para determinar el perfil químico de las estatinas presentes en la levadura de arroz rojo (red mold rice).

También Friedrich y cols. (1995) encontraron que cuando se realiza la extracción con metanol, la lovastatina se encuentra presente en tres formas: la β -hidroxiácida, la lactona y su metil-éster, siendo ésta última producto de la reacción entre la forma β -hidroxiácida y el

metanol que sirve para extraerla. También descubrió que en solución acuosa la forma más estable es la hidroxilácida, por lo cual se establece que lo más conveniente para las muestras de la fermentación es convertir la lovastatina a su forma β -hidroxilácida.

El primer método descrito de extracción de lovastatina producida en cultivo fue empleado por Alberts y cols. (1980). Este método empleó acetato de etilo como solvente y el valor de pH se ajustó de 4.0-4.2. El acetato de etilo fue propuesto por su escasa miscibilidad con el agua y su alta volatilidad, lo que permitió concentrar y recuperar la lovastatina extraída.

Además Samiee y cols. (2003) reportaron un método de extracción diferente, aun usando acetato de etilo como solvente. Éste se resume como sigue: se ajustó el valor de pH de la muestra líquida a 3.0, y se añadió un volumen igual de acetato de etilo, seguido de incubación de la muestra, después se recuperó la fase orgánica (sobrenadante), se centrifugó y concentró a sequedad. El porcentaje de recuperación (%R) reportado fue de 90% de la lovastatina existente en la forma lactona.

En cuanto al método de cuantificación para conocer la concentración de lovastatina, en la mayoría de las investigaciones se hace mención de HPLC (Cromatografía líquida de alta presión), sin embargo también existen reportes de cuantificación de lovastatina por medio de cromatografía de capa fina (TLC) (Jaivel y Marimuthu 2010), espectrofotometría UV (Ho y cols. 2011) y por medio de actividad antimicrobiana (Lakshmanan y Radha 2012 y 2013).

El método más usado para la cuantificación de este metabolito secundario como se menciono anteriormente es por HPLC, esta es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Hajjaj y cols. (2001) publicaron la siguiente metodología para cuantificar lovastatina producida por *Aspergillus terreus* manejando HPLC. Utilizaron una columna Nucleosil 100-5 C₁₈ (250 por 4 mm; Macherey & Nagel) con una precolumna (Lichrospher 100 RP-18; Merck). El disolvente A estaba compuesto por 0.05% de H₃PO₄ en agua, y el disolvente B era acetonitrilo.

El gradiente fue lineal, comenzando con 95% de disolvente A y 5% de disolvente B, alcanzando el 50% de disolvente A y 50% de disolvente B en 45 min, 30% de disolvente A y 70% disolvente B en 46 min, 10% de disolvente A y 90% de disolvente B en 48 min, y 0% de disolvente A y 100% de disolvente B en 50 min y finalmente se continuó con una carrera isocrático durante 4 min. La tasa de flujo fue de 1 mL/min. La absorción se midió a una longitud de onda de 254 nm (Hewlett Packard G 1315 A, serie 1100 detector).

Por su parte Panda y cols. (2010) muestran los resultados de una investigación sobre la optimización de la producción de lovastatina por *Monascus purpureus* y *Monascus ruber* en la que realizaron el siguiente procedimiento. La lovastatina se calculo usando una columna de 250×4.6 mm de ID Lichrosper® 100 C₁₈ de 5 µm de tamaño de partículas. Se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (65:35 v/v), y se acidificó con ácido ortofosfórico a una concentración de 0.1% con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min, y la detección se llevó a cabo por el detector de UV (SPD10A VP) a 235 nm. Las muestras se analizaron con Shimadzu CLASS-VP versión del software 5.032.

Así mismo Lakshmanan y Radha (2012) llevaron a cabo la identificación de lovastatina por el método de HPLC en el que inyectaron 20 µl del extracto del cultivo obtenido de la extracción y acidificación, usando una columna C₁₈ como fase estacionaria. Una condición isocrática era mantenido en la fase móvil (acetonitrilo y ácido fosfórico al 0.1% (60:40 v/v)) y la tasa de flujo se mantuvo a 1.5mL/min, la detección se realizó a 238 nm.

Otro método de cuantificación es por medio de TLC, en este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes. En la cromatografía en capa fina, el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado. El adsorbente se coloca en forma de una capa delgada adherida sobre un soporte rígido, que pueden ser placas de vidrio, aluminio o poliéster. En este caso Jaivel y Marimuthu (2010) reportan la siguiente metodología: las placas cromatográficas de capa fina se recubrieron con gel de silica (malla 200) a 1 mm de espesor

usando un esparcidor. Después de ser secadas al aire, las placas fueron activadas por la exposición a 120°C durante 2 horas en una incubadora. Una cantidad de 200 µl de extracto crudo fueron colocados. Las placas se desarrollaron en un sistema disolvente de diclorometano: acetato de etilo (70:30 v/v). Los puntos individuales en las placas de TLC fueron marcados y valores de Rf se calcularon antes de que las placas se tiñeran con vapor de yodo y fueran observadas bajo luz UV. Se recogió cada mancha de las placas y se almacenaron en un vial de vidrio limpio.

Por su parte Raghunath y cols. (2013) realizaron el análisis con el sobrenadante obtenido después de la filtración que llevaron a cabo en la extracción y este, se sometió a cromatografía en capa fina. Los puntos estándar y de muestra fueron vistos en la línea de la muestra y se desarrolló con ciclohexano: cloroformo: isopropano (5:2:1).

También la espectrofotometría UV es una técnica en la que la radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. En cuanto a esta técnica de cuantificación Rajput y Raj (2009) reportan una investigación en la que utilizaron 100 mg de lovastatina disueltos en 100 mL de etanol y a partir de esto hicieron las siguientes diluciones (1-40 µg/mL). Para poder analizar la concentración realizaron una curva de calibración, esta la elaboraron trazando el valor D1 contra la concentración de lovastatina en el cruce cero de la longitud de onda que fue de 245.4 nm. La concentración de lovastatina se calculado utilizando dicha curva de calibración.

En otro estudio en el que realizaron la cuantificación con este método, desarrollaron la siguiente técnica. Tomaron 1 mL del sobrenadante de la extracción y añadieron 1 mL de ácido trifluoroacético al 1% y incubaron durante 10 min de la solución anterior, 0.5 mL fueron tomados y se diluyó 10 veces con metanol y las absorbancias se leyeron a 238 nm usando Espectrofotómetro UV-Visible (Raghunath y cols. 2013).

Así mismo también se reporta que una vez que la se hace la extracción y acidificación del caldo de la fermentación, se detecta a la lovastatina a una longitud de onda de 238 nm por medio de un espectrofotómetro (Jaivel y Marimuthu 2010).

Por otra parte Ho y cols. (2011) publicaron los resultados de un estudio que hicieron con ratas en el que evaluaban la capacidad de reparación ósea que tiene la lovastatina y uno de los objetivos de su investigación fue cuantificar lovastatina por UV-Vis, para ello realizaron una curva de calibración para lo cual utilizaron acetonitrilo como solvente y las diluciones que tomaron fueron de 0 a 50 mg/mL, y estas diluciones fueron analizadas a una longitud de onda de 248 nm.

Otro método para conocer la presencia de lovastatina es por medio de bioensayos, este es el proceso para determinar la potencia de una sustancia a partir de las respuestas producidas en organismos biológicos. El bioensayo es un método que permite determinar alguna propiedad con base en la respuesta biológica que se ocasiona en determinados organismos. Un bioensayo está determinado por un estímulo y una respuesta, el estímulo puede ser químico, mecánico, físico, eléctrico entre otros; la respuesta es el efecto que produce el estímulo al organismo. La respuesta a los estímulos pueden estar en función a los diversos factores como pueden ser: concentración, temperatura, tiempo de exposición, entre otros (Lakshmanan y Radha 2013 y 2014).

Para el caso de lovastatina, existen diferentes organismos reportados como lo son: *Neurospora crassa* y *Candida albicans* (Kumar y cols. 1999, Lakshmanan y Radha 2013).

Lakshmanan y Radha (2012 y 2013) reportan los resultados de bioensayos microbianos utilizando *Candida albicans*. Ya que este microorganismo se ve inhibido en su crecimiento, por la forma de β -hidroxiácido de lovastatina. Para ello tomaron 50 μ l de los extractos de *P. ostreatus* y los transfirieron al disco de papel de 6 mm y los colocaron en la caja de Petri de 90 mm que contenía a *C. albicans*. La separación entre el control y la lovastatina se ajusto para que fuera de 15 mm. Los controles positivos y negativos se prepararon por impregnación del papel con 50 μ l del estándar de lovastatina y acetato de etilo

respectivamente. Las placas se incubaron durante 12 horas y se observaron las zonas de inhibición.

También *Neurospora crassa* se reporta que fue utilizada para la realización de bioensayos, debido que es un organismo sensible a la forma activa de la lovastatina, la β -hidroxiácida, produciendo halos de inhibición en el crecimiento, relacionando así la cantidad de lovastatina con la inhibición del crecimiento. Para llevar a cabo este bioensayo se cortaron discos de papel Whatman No.1 de 6 mm de diámetro. Se le adicionaron 10 μ l del extracto de lovastatina. Como control negativo se adiciona 10 μ l de acetato de etilo a un disco de papel, que es considerado como el cero de la curva patrón. Como controles positivos o curva patrón se adicionan 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 μ g de lovastatina en su forma activa, la β -hidroxiácida. Se dejaron secar los discos de papel durante 4 minutos. Se pasaron los discos, con ayuda de unas pinzas, a las cajas donde realizó el bioensayo. Se incubaron a 28°C durante 16-18 horas y se midieron los halos de inhibición (Kumar y cols. 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

La lovastatina es un metabolito fúngico de gran interés terapéutico debido a que mediante el consumo de dicho compuesto se reduce el contenido de lípidos en sangre. Por otra parte, la hipercolesterolemia es una de las enfermedades cardiovasculares que han provocado la muerte de cerca de 17.3 millones de personas en el 2008 (Organización Mundial de la Salud). Por lo que existe la necesidad de optimizar la producción de lovastatina en cantidades apreciables utilizando hongos comestibles, como es el caso de *Pleurotus ostreatus*, que además, es un alimento nutracéutico, por su bajo contenido de lípidos y alto contenido de fibra. Por lo que es de suma importancia conocer el sistema de fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte y biodegradable) más efectivo para la producción de lovastatina (estatina) producida por *Pleurotus ostreatus*, así como optimizar la producción biotecnológica de este compuesto bioactivo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿En qué sistema de fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte o biodegradable)

Pleurotus ostreatus produce una mayor cantidad de lovastatina?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la cantidad de lovastatina producida por *Pleurotus ostreatus* en los diferentes sistemas de fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte y biodegradable).

5.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la cuantificación de lovastatina por espectrofotometría.
- Obtención y extracción de lovastatina de cada uno de los sistemas de fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte y biodegradable).
- Evaluar la cantidad de lovastatina producida en cada uno de los sistemas de fermentación (líquido, sólido sobre soporte inerte y biodegradable) mediante HPLC y espectrofotometría.
- Evaluar la actividad de lovastatina del cuerpo fructífero (fermentación sobre soporte biodegradable) mediante bioensayos.

6. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un diagrama de la secuencia metodológica para realizar el estudio; y en apartados posteriores se hace una descripción detallada de la misma.

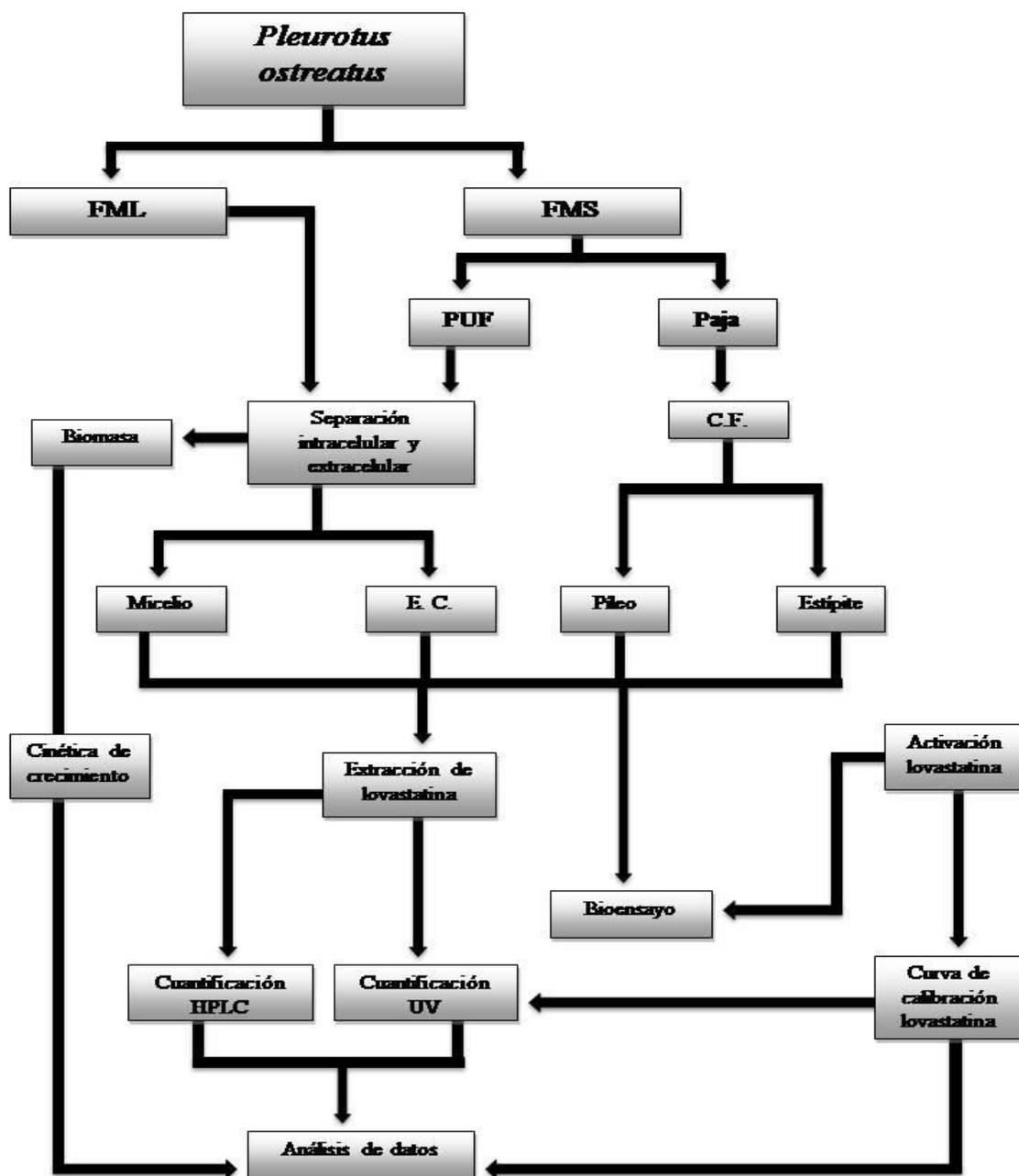


Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología.

6.1. Microorganismo de estudio

Se utilizó a la cepa de *Pleurotus ostreatus* (ATCC-32783) de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). La cepa stock se desarrolló sobre agar papa-dextrosa (PDA) a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C, resemebrándose cada mes. El inóculo para FML, FMS y CF fue micelio joven de una colonia crecida en las mismas condiciones que la cepa stock.

Para la FML y FMS se colocaron como inóculo 3 fragmentos de 4 mm de diámetro tomados mediante un horador de la periferia de una colonia de *P. ostreatus* para cada uno de los matraces.

En la producción de CF se utilizaron inóculos de 1 cm de diámetro tomados mediante un horador de una colonia de *P. ostreatus*.

6.2. Medio de cultivo y desarrollo micelial

FML: la fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 50 mL de medio de cultivo estéril (Tabla 1), ajustando el pH a 6.5 con KOH al 10% (Alarcón y cols. 2006). Con una agitación de 120 rpm.

FMS: se llevó a cabo en matraces de 250 mL, usando 0.5 g de cubos de espuma de poliuretano de baja densidad como soporte inerte impregnados con 15 mL de medio de cultivo estéril (Tabla 1) ajustando el pH a 6.5 con KOH al 10% (Alarcón y cols. 2006). La espuma de poliuretano (PUF: 17 kg⁻³) fue cortado en cubos de 0.5×0.5×0.5, previamente los cubos fueron lavados con agua destilada y secados a 60°C por 48 h (Díaz-Godínez y cols. 2001).

Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado a 25°C durante 408 horas. Todas las operaciones fueron llevadas a cabo en condiciones estériles. Tomando muestras cada 24 horas a partir de las 72 h posteriores a la inoculación para realizar los análisis.

CF: para el desarrollo del inóculo primario se utilizó semilla de trigo como sustrato, ésta fue hidratada por 48 h y esterilizada a 120°C durante 60 minutos, una vez que el sustrato estuvo listo, se colocaron fragmentos de micelio. Para la producción se usó paja de trigo y bolsas de polietileno, alternando capas de inóculo (0.1 kg) y de paja pasteurizada (0.5 kg). Se incubaron por 15 días a 25°C, posteriormente las bolsas se trasladaron al cuarto de producción en presencia de luz hasta la fructificación.

La producción se hizo por triplicado. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones estériles. La toma de muestras se llevó a cabo por triplicado en cuerpos fructíferos de 3.5, 7.0 y 10 cm de longitud.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo en FML y FMS sobre soporte inerte.

Componente	Para 1000 mL
CaCl₂ · 2H₂O	0.06g
KH₂PO₄	0.025g
(NH₄)₂SO₄	0.39 g
MgSO₄ · 7H₂O	0.15 g
FeSO₄ · 7H₂O	1.2 g
Extracto de malta	13 g
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	15 g
Agua de peptona	4 mL
Peptona	0.05 g
NaCl	0.1 g
pH 7.2 ± 0.2 a 25° C	

6.3. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La biomasa (X) producida en las fermentaciones se separó por filtración y se secó en horno a 60°C durante 24 h; y se reportó el peso seco (Díaz-Godínez y cols. 2001, Téllez-Téllez y cols. 2008).

Para determinar los parámetros de crecimiento se consideró la evolución de la biomasa $X = X(t)$ por la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001, Viniegra-González y cols. 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \dots\dots\dots (1)$$

La solución de la ecuación logística es (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + C \exp^{-\mu t})} \dots\dots\dots (2)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, X_{\max} es el valor de biomasa máxima o de equilibrio y $C = \frac{X_{\max} - X_o}{X_o}$ con $X=X_o$

Se calculó también la duración de la fase estacionaria o de adaptación por medio de la siguiente ecuación:

$$tl = te - \left(\frac{1}{\mu} \right) \left(\ln \frac{Xe}{X_o} \right) \text{ donde } te \text{ es el tiempo de la fase estacionaria y } Xe \text{ es la biomasa máxima de la fase (Pirt 1975).}$$

6.4. Extracción de lovastatina

6.4.1. Obtención de las muestras

Para la FML y FMS se tomaron dos tipos de muestras: intracelular y extracelular; para las extracelulares se tomó la muestra proveniente del extracto crudo y para las intracelulares se tomó la muestra de la biomasa. Respecto al cuerpo fructífero se tomaron muestras del píceo y del estípite.

FML: de cada biorreactor, el caldo de fermentación se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 y este se consideró como el extracto crudo (EC), (Téllez-Téllez y cols. 2008). De la biomasa húmeda obtenida se tomó para los análisis intracelulares.

FMS: el caldo de fermentación se obtuvo por un prensado ligero de la espuma de poliuretano, y se consideró como el extracto crudo (EC), a la espuma de poliuretano que contenía la biomasa producida e inmovilizada se le realizó varios lavados para eliminar los residuos de medio de cultivo (Téllez-Téllez y cols. 2008). La espuma de poliuretano lavada se utilizó para el análisis intracelular.

6.4.2. Extracción de lovastatina

FML: de las muestras extracelulares se tomaron 400 µl y se le adicionaron 800 µl de acetonitrilo al 50% (v/v); De las muestras intracelulares se tomaron 0.5 g de micelio húmedo y se maceró con 3 mL de acetonitrilo al 50% (v/v), las muestras pasaron en el sonicador durante 120 min. Después, solo las muestras intracelulares, se centrifugaron 5 min a 15 000 rpm a 20°C y se tomó el sobrenadante. Una vez que las muestras estuvieron listas se procedió a medir la concentración de lovastatina presente en las muestras.

FMS: para la muestra extracelular se tomaron 400 µl del extracto crudo y se le adicionaron 800 µl de acetonitrilo al 50% (v/v); a las muestras intracelulares se les adicionaron 15 mL de acetonitrilo al 50% (v/v), las muestras pasaron en el sonicador 120 min, posteriormente solo la muestra proveniente del micelio se filtró a través de una membrana de 0.40 µm de poro (Millipore). Cuando las muestras se encontraron listas se continuó con la medición de la concentración de lovastatina.

CF: se tomaron dos tipos de muestra, una del píceo y la otra del estípite. Se pesaron 0.1 g de las muestras y se maceraron con 3 mL de acetonitrilo al 50% (v/v); las muestras pasaron en el sonicador 120 min, posteriormente se centrifugaron 5 min a 15 000 rpm a 20°C y se tomó el sobrenadante.

6.5. Cuantificación de lovastatina

6.5.1. Activación de lovastatina

Se pesaron 20 mg de lovastatina pura, después se disolvieron en 50 mL de NaOH 0.1-ACN (preparado con una solución de Acetonitrilo al 25%). Se mantuvo a 45°C durante una h, y se ajustó el pH a 7.7 con HCl 0.1N-ACN (preparado en Acetonitrilo). Se midió el volumen final. Por último se calculó la concentración ajustada y se guardó en alícuotas para las diferentes pruebas posteriores (Yang y cols. 2006).

6.5.2. Curva de calibración de lovastatina por espectrofotometría UV

Una vez que la lovastatina se encontró activa, se paso por el baño ultrasónico 120 minutos y posteriormente por la centrifuga a 25°C por 5 minutos a 15000 rpm, se tomó el sobrenadante y a partir de este se hicieron las diluciones (10-50 µg/mL), las absorbencias se midieron con ayuda de una celda de cuarzo en un equipo VELAB UV/Vis spectrophotometer.

6.5.3. Curva de calibración de lovastatina por HPLC

La curva de calibración fue avalada por HPLC con las siguientes diluciones (0.05-2.5 µg/mL) para la cual se utilizó una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4µm), con una fase móvil de acetonitrilo: ácido fosfórico 0.1% (50% v/v), y la velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min. La forma de activa de lovastatina se analizó a 238 nm con una matriz de arreglo de diodos.

6.5.4. Cuantificación de lovastatina por espectrofotometría UV

FML: para la mezcla de reacción se tomaron 150 µl de las muestras extracelulares y de las intracelulares y se les agregó 2850 µl de acetonitrilo al 50% (v/v).

FMS: la mezcla de reacción se preparó con 150 µl de las muestras extracelulares y se les agregó 2850 µl de acetonitrilo al 50% (v/v). Por otra parte de las muestras intracelulares se tomaron 100 µl del sobrenadante y se les agregó 2900 µl de acetonitrilo al 50% (v/v).

CF: para la mezcla de reacción se tomó 300 µl de las muestras obtenidas de la extracción del píceo y estúpide, y posteriormente se les agregó 2700 µl de acetonitrilo al 50% (v/v).

Todas las absorbencias se leyeron en un equipo VELAB UV/Vis spectrophotometer a una longitud de onda de 248 nm (Ho y cols. 2011) con una celda de cuarzo de 3 mL.

6.5.5. Cuantificación de lovastatina por el método de bioensayo

6.5.5.1. Prueba de concentración

Se utilizó *C. albicans* para la realización de los bioensayos, debido que es un organismo sensible a la forma activa de la lovastatina, la β -hidroxiácida, produciendo halos de inhibición en el crecimiento, relacionando así la cantidad de lovastatina con la inhibición del crecimiento. Para llevar a cabo los bioensayos se utilizaron cajas Petri de cristal con PDA donde se colocaron aproximadamente 1.5×10^8 UFC de *C. albicans*. Posteriormente se hicieron perforaciones en el agar y ahí se colocaron 100 μ l de las diferentes concentraciones de lovastatina pura activa 0.026, 0.085, 0.14, 0.20, 0.26 mg/mL. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35°C para poder observar las diferencias en el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de las perforaciones. Para poder correlacionar la concentración con los halos de inhibición, se midieron los radios de los halos de inhibición y se graficaron contra las concentraciones de lovastatina pura utilizadas en la prueba.

6.5.5.2. Bioensayo

Para llevar a cabo los bioensayos se utilizaron cajas Petri de cristal con PDA y se colocaron aproximadamente 1.5×10^8 UFC de *C. albicans*. Se hicieron perforaciones en el agar y se colocaron 100 μ l del sobrenadante obtenido de la extracción de *P. ostreatus*, como control negativo se adicionó 100 μ l de acetato de etilo y como control positivo se adiciono 100 μ l de lovastatina en su forma activa, la β -hidroxiácida. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y se observaron los halos de inhibición (Lakshmanan y Radha 2012).

6.6. Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se reportan las medias y su desviación estándar. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Excel (Microsoft).

7. RESULTADOS

7.1. Producción de biomasa

7.1.1. Fermentación en medio líquido

El desarrollo de *P. ostreatus* en fermentación en medio líquido, se observó durante 408 horas. Se observan claramente las tres fases de crecimiento del organismo, la fase de adaptación duro 88.1517 h, la fase de crecimiento exponencial concluyó antes de las 312 h, empezando así la fase estacionaria. La curva de crecimiento se ajustó con la ecuación logística reportando una X_{\max} de 15.4969 g/L y con una μ de 0.026. Se pudo observar un coeficiente de correlación de 0.9942 como se observa en la figura 10.

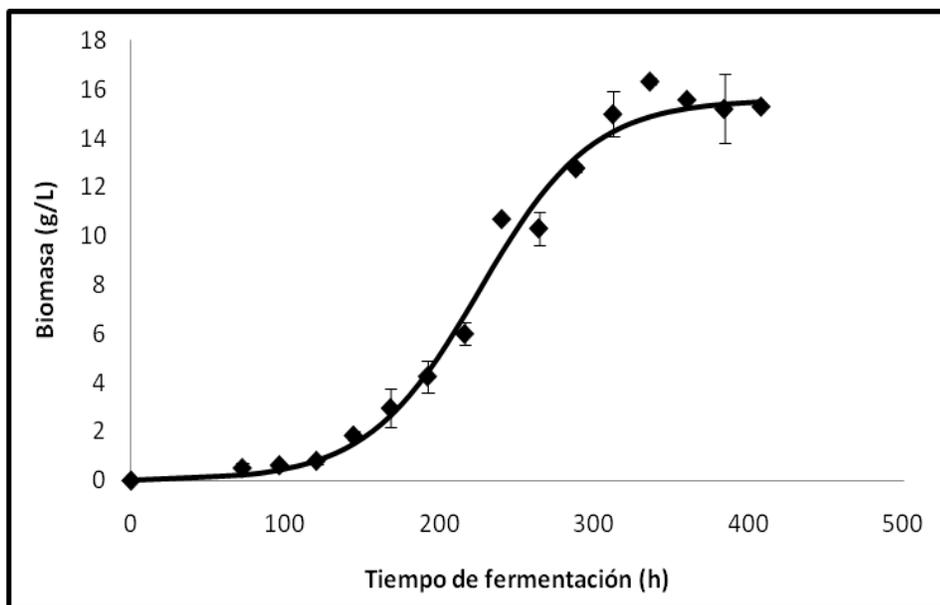


Figura 10. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* (ATCC-32783) en fermentación líquida.

7.1.2. Fermentación en medio sólido

El desarrollo de *P. ostreatus* en fermentación en medio sólido sobre soporte inerte (espuma de poliuretano), se observó durante 408 horas, la fase de adaptación tuvo una duración de 48.5760 h, la fase de crecimiento exponencial concluyó antes de las 144 h como se puede observar en la figura 11. La curva de crecimiento se ajustó con la ecuación logística, reportando una X_{\max} de 17.5119 g/L y con una μ de 0.033. Se observó un coeficiente de correlación de 0.9321 como se puede observar en la figura 10.

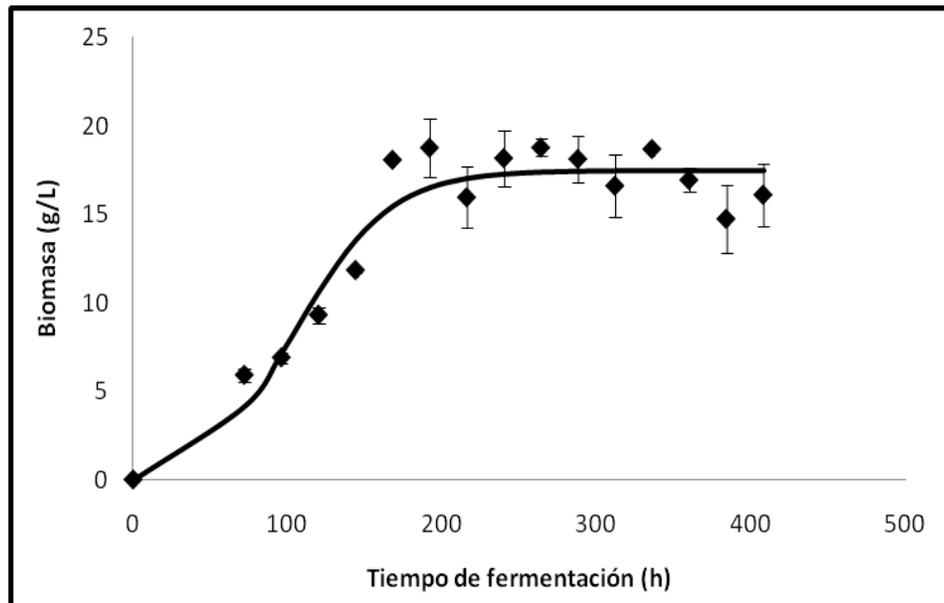


Figura 11. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* (ATCC-32783) en fermentación sólida.

7.2. Curva de calibración

La curva de calibración se realizó con una serie de 5 disoluciones (10-50 $\mu\text{g/mL}$) por espectrofotometría empleando un espectrómetro VELAB UV/Vis spectrophotometer (Figura 12) y con una serie de 6 diluciones (0.05-2.5 $\mu\text{g/mL}$) para HPLC (Figura 13) obteniendo una correlación de las curvas de calibración.

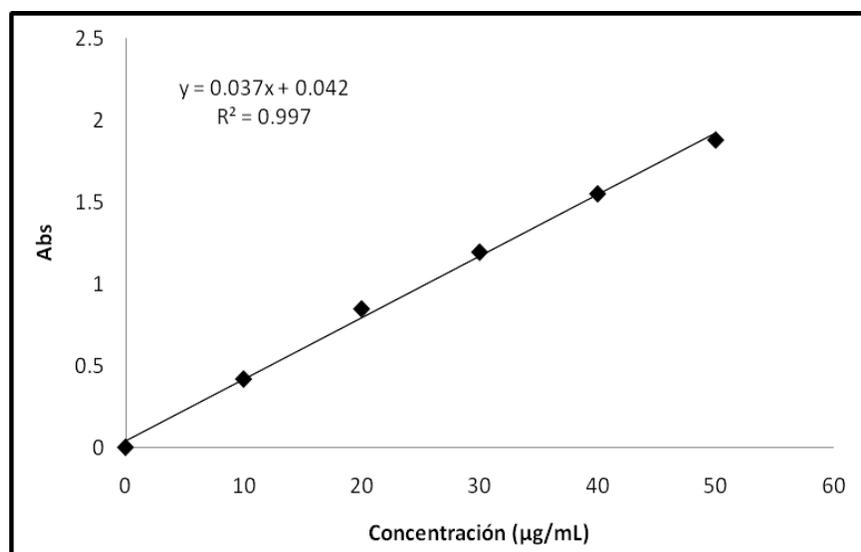


Figura 12. Curva de calibración de lovastatina pura analizada por espectrofotometría.

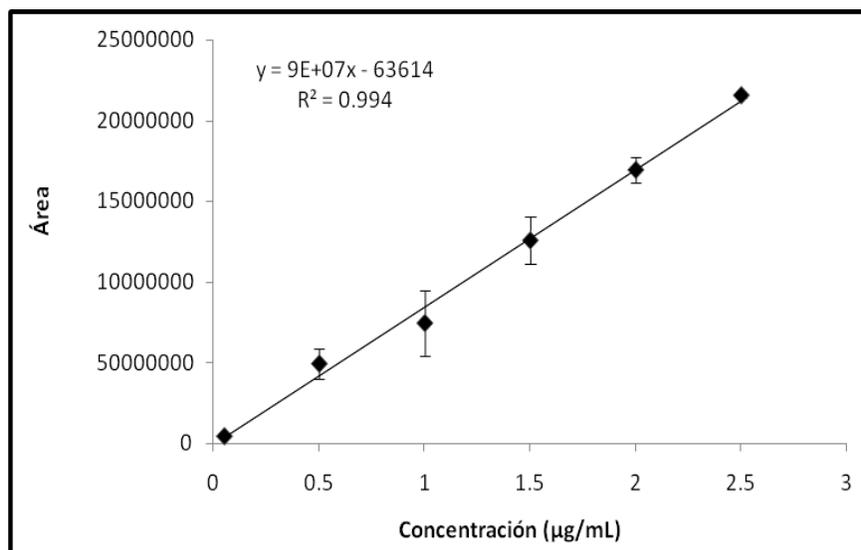


Figura 13. Curva de calibración de lovastatina pura analizada por HPLC.

7.3. Fermentación en medio líquido

7.3.1. Producción de lovastatina intracelular

La concentración de lovastatina intracelular máxima en esta fermentación fue de 688.375 mg/L y/o de 4.229 mg por cada g de hongo, obtenida en la fase de crecimiento exponencial a las 192 h de la fermentación (figura 14).

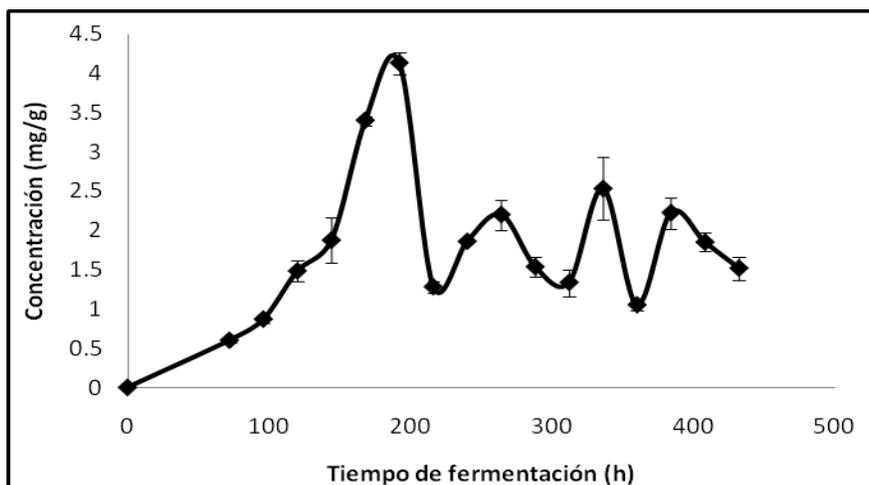


Figura 14. Concentración de lovastatina intracelular en fermentación líquida analizada por espectrofotometría.

7.3.2. Producción de lovastatina extracelular

La concentración de lovastatina extracelular en esta fermentación fue de 1.315 mg/L y/o 2.573 mg por cada g de hongo seco y se encontró en las primeras horas de la fermentación, en la fase de adaptación o estacionaria (figura 15).

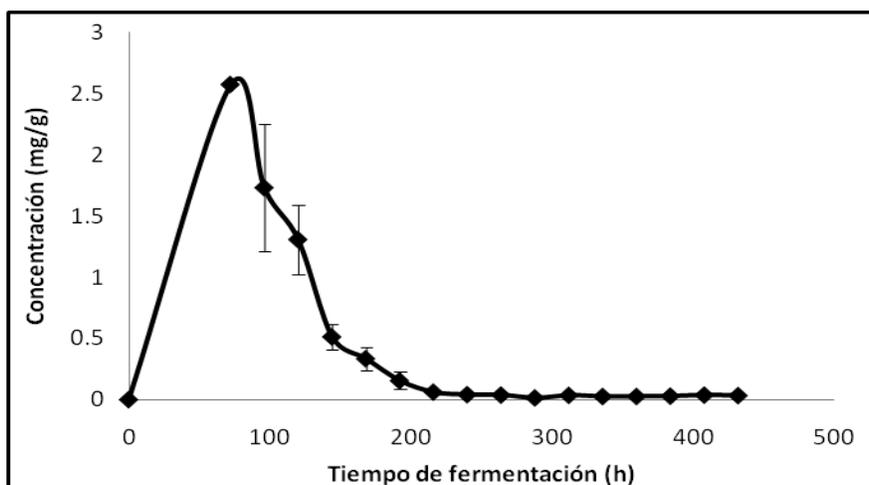


Figura 15. Concentración de lovastatina extracelular en fermentación líquida analizada por espectrofotometría.

7.4. Fermentación en medio sólido

7.4.1. Producción de lovastatina intracelular

La concentración de lovastatina intracelular mayor fue de 385.135 mg/L y/o 65.093 mg por cada g de hongo seco obtenida a las primeras horas de la fermentación (figura 16).

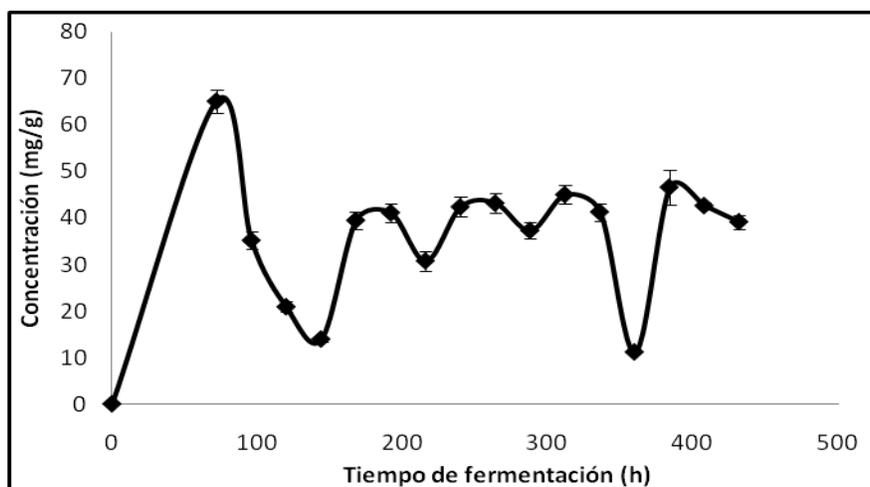


Figura 16. Concentración de lovastatina intracelular en fermentación sólida analizada por espectrofotometría.

7.4.2. Producción de lovastatina extracelular

La concentración de lovastatina extracelular en esta fermentación más alta fue de 1.45 mg/L y/o 0.244 mg por cada g de hongo seco y se encontró en las primeras horas de la fermentación (figura 17).

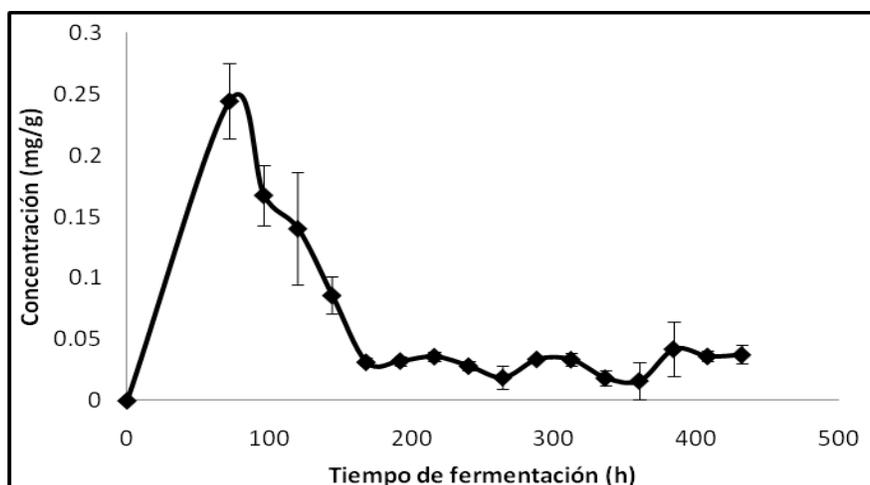


Figura 17. Concentración de lovastatina extracelular en fermentación sólida analizada por espectrofotometría.

7.5. Producción de lovastatina en cuerpo fructífero

Las concentraciones más elevadas se encontraron en el píleo y en el estípite del C.F. de 3.5 cm de longitud (3.83 mg/g y 1.47 mg/g respectivamente) como se puede observar en la figura 18.

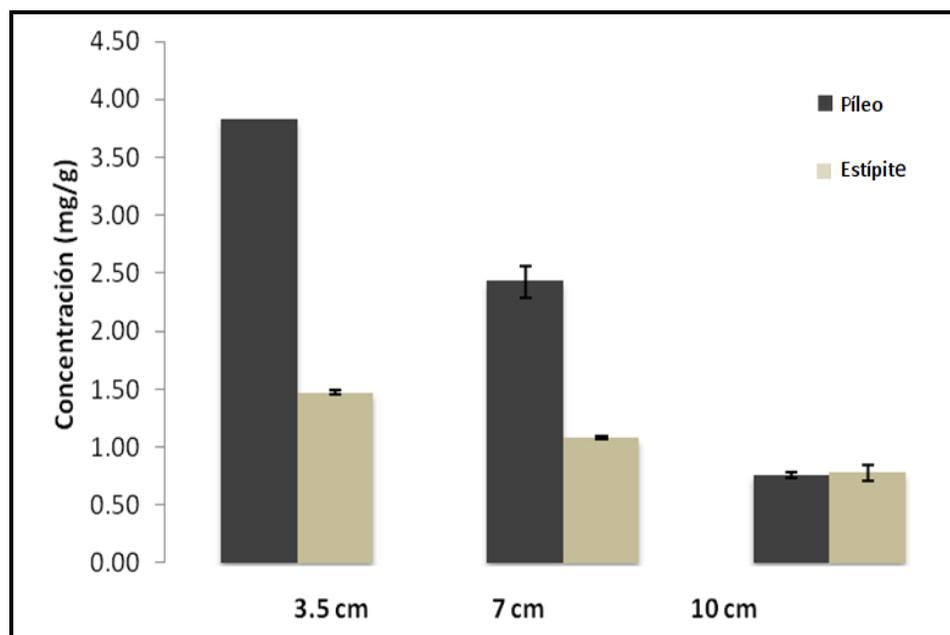


Figura 18. Concentración de lovastatina en cuerpo fructífero analizada por espectrofotometría.

7.6. Parámetros cinéticos

Tabla 2. Parámetros cinéticos y producción de lovastatina de *P. ostreatus*

Fermentación	Muestra	Biomasa g L ⁻¹	μ h ⁻¹	Lovastatina	
				mg g ⁻¹	mg L ⁻¹
FML	Intracelular	15.587	0.027	4.229	688.375
	Extracelular			2.573	1.315
FMS (Soporte inerte)	Intracelular	17.504	0.033	65.093	385.135
	Extracelular			0.244	1.450

7.7. Concentración de lovastatina por el método de actividad antimicrobiana

Se colocaron en las perforaciones del agar que contenía a *C. albicans* diferentes concentraciones de lovastatina pura activa (0.026, 0.085, 0.14, 0.20 y 0.26 mg/mL), y se pueden observar diferencias en el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de las perforaciones (Figura 19). El radio de la zona de inhibición se correlaciono con la concentración de lovastatina colocada, se puede observar como al aumentar la concentración de lovastatina se aumenta el radio de la zona de inhibición linealmente (Figura 20).

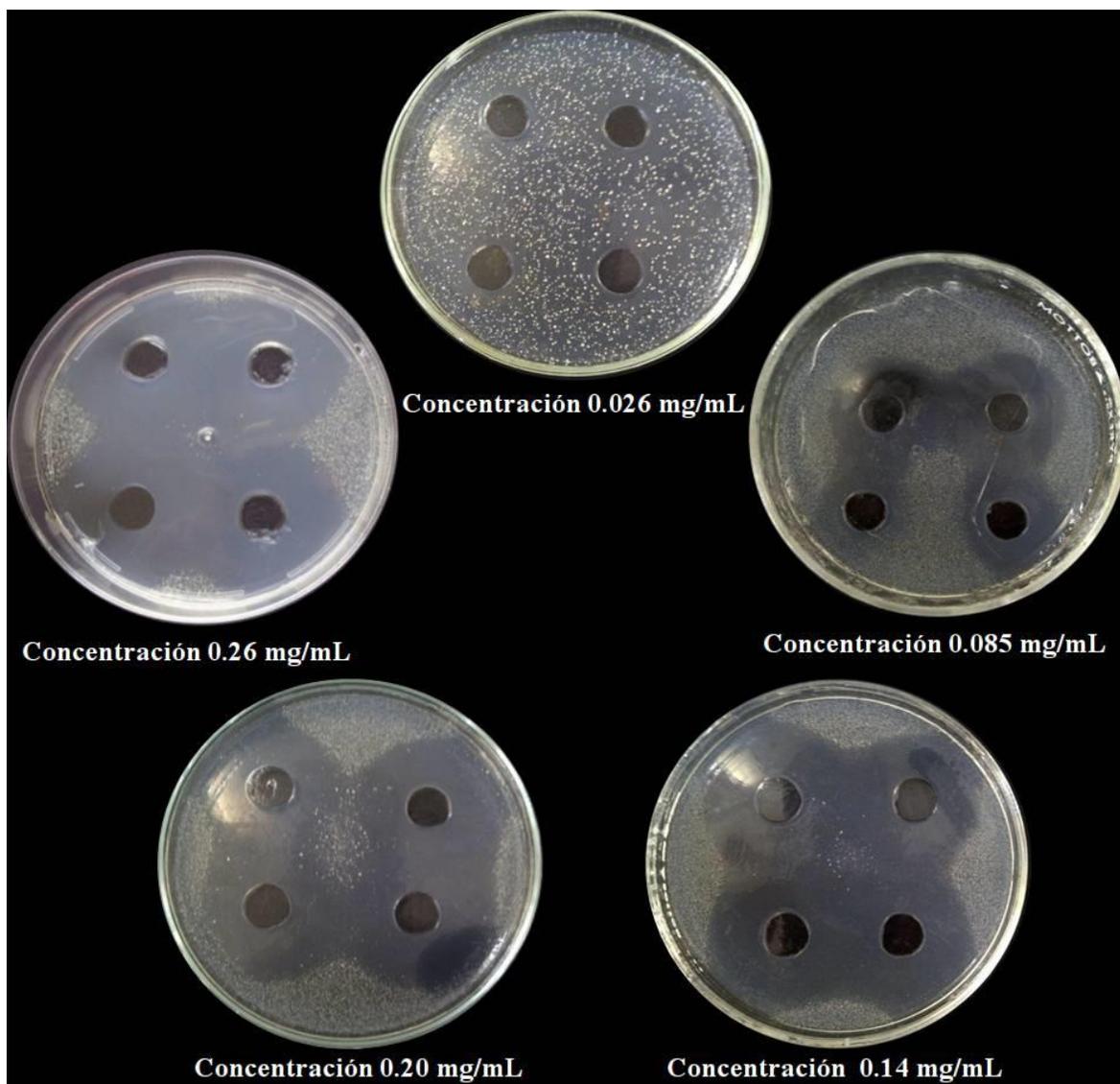


Figura 19. Zonas de inhibición en el crecimiento de *C. albicans* por lovastatina pura.

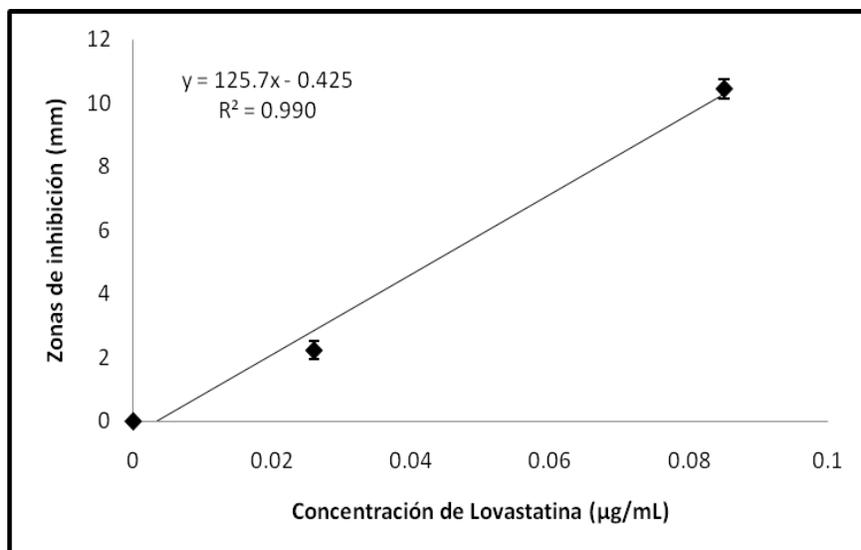


Figura 20. Curva de concentración de lovastatina vs. zona de inhibición en el crecimiento de *C. albicans*

7.8. Bioensayo

Candida albicans se ve inhibida en su crecimiento, por la forma de β-hidroxiácido de lovastatina pura del control positivo y de los extractos de hongo *P. ostretus*, no así en las perforaciones con acetato de etilo (control negativo) como se observa en la figura 21.

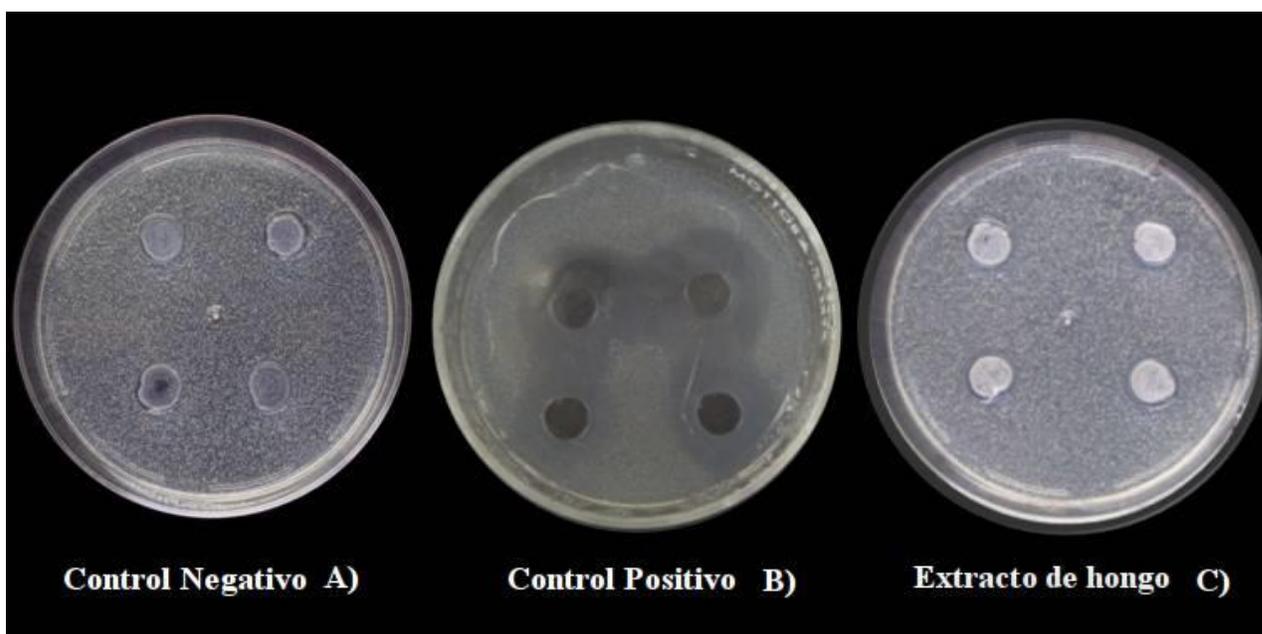


Figura 21. Zonas de inhibición en el crecimiento de *C. albicans*.

8. DISCUSIÓN

8.1. Evaluación de la producción intracelular y extracelular de lovastatina

La biomasa máxima derivada de *Pleurotus ostreatus* a partir de la fermentación en medio líquido; con un medio de cultivo a base de glucosa, extracto de malta, extracto de levadura y sales minerales, a una temperatura de 25°C con una agitación de 120 rpm; se constató en la fase estacionaria con una X_{\max} de 15.2508 g/L y con una μ de 0.02 (figura 10). En cuanto a la fermentación en medio sólido con el mismo medio de cultivo sobre soporte inerte (PUF: 17 kg⁻³) a una temperatura de incubación de 25°C, la biomasa máxima alcanzada fue de 17.3372 g/L con una μ de 0.02 (Figura 11). Con respecto a la producción de lovastatina en FML, se pudo observar una mayor obtención intracelular (688.378 mg/L y/o 4.229 mg/g) (Figura 14) que extracelular (1.315 mg/L y/o 2.572 mg/g) (Figura 15). Referente a la producción de lovastatina por FMS, se distinguió también una mayor obtención intracelular (385.135 mg/L y/o 65.093 mg/g) (Figura 16) que extracelular (1.445 mg/L y/o 0.244 mg/g) (Figura 17).

Estos resultados revelan una mayor producción de biomasa y concentración de lovastatina en FMS con respecto de la FML. Y una mayor obtención de este metabolito en las muestras intracelulares con respecto de las extracelulares. Una forma de explicar estos resultados es apoyándonos en los eventos moleculares responsables de la diferencia en los títulos de producción de lovastatina entre FML y FMS.

Barrios-González y cols. (2008) publicaron los resultados de una investigación sobre la participación de los genes *lovE* y *lovF* y su expresión en los diferentes tipos de fermentaciones. Los resultados de dicha investigación muestran que la mayor producción de lovastatina en FMS estaba correlacionada con altos niveles de acumulación de transcripción para ambos genes, y por un período más largo. La transcripción del gen *LovE* mostró 4.6 veces niveles más altos de acumulación (transcripción) que en FML. Del mismo modo, mostró un transcrito de *lovF* dos veces mayor en la acumulación del más alto nivel detectado de micelio crecido en FML. Estos resultados demostraron, que la mayor producción de lovastatina en FMS es, por lo menos parcialmente, debido a una mayor

transcripción de sus genes biosintéticos y, lo más importante, que estos niveles más altos de transcripción son el resultado de los niveles más altos de factor de transcripción de *LoveE*.

Por una parte Jaivel y Marimuthu (2010) realizaron un análisis en 10 cultivos de hongos para la producción de lovastatina sobre fermentación sumergida, entre los que se encontraba *P. ostreatus*. La extracción de lovastatina la llevaron a cabo en el extracto crudo con acetato de etilo, y una vez realizada la extracción las muestras extracelulares fueron examinadas por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 238 nm. Los resultados mostraron una producción de lovastatina por *P. ostreatus* de 18.58 mg/L y una biomasa de 6.28 g/L. Esta producción de lovastatina es mayor a la encontrada en nuestra investigación en el mismo tipo de muestra, sin embargo la producción de biomasa es superior en nuestro estudio (15.2508 g/L).

Por otro lado, Alarcón y Águila (2006) reportan la producción de lovastatina intracelular, en fermentación en medio líquido por *Pleurotus ostreatus* en la que utilizan un medio de cultivo a base de glucosa, extracto de malta y sales minerales, con una agitación de 150 rpm. Ellos reportan una obtención máxima de lovastatina de 4.15 mg/L. Estos resultados están muy por debajo de los obtenidos en nuestro estudio, lo que indica que nuestro medio de cultivo es más eficiente para la obtención de este metabolito secundario. La incorporación de extracto de levadura y agua de peptona al medio de cultivo contribuyen a la adición de aminoácidos tan importantes como lo son el ácido glutámico, histidina, metionina y glicina. Estudios han demostrado que los aminoácidos como el ácido glutámico, histidina, metionina y en menor medida glicina son necesarios para la biosíntesis de lovastatina (Hajjaj y cols. 2001, Osman y cols. 2011).

Lakshmanan y Radha (2013) publicaron los resultados de una investigación en la cual utilizan a *P. ostreatus* para la producción de lovastatina por fermentación en medio sólido. *P. ostreatus* fue cultivado en diferentes sustratos (salvado de trigo, salvado de arroz, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar) a diferentes temperaturas (25, 28, 32 y 35°C). Se obtuvo el rendimiento máximo (115 mg/L) cuando se utilizó salvado de trigo como sustrato y una

temperatura de 28°C. Estos resultados son inferiores a lo reportado en nuestra investigación utilizando un soporte inerte y una temperatura de 25°C.

8.2. Evaluación de la producción de lovastatina en cuerpo fructífero

Para los análisis de lovastatina en cuerpos fructíferos se utilizaron tres tamaños (3.5, 7.0 y 10 cm de longitud). En cuanto a la concentración de lovastatina se logró constatar una mayor producción en el CF de menor tamaño y en el píleo (3.829 mg/g) con respecto del estípite (1.467 mg/g) (Figura 20). Así mismo estos resultados experimentales coinciden con lo reportado por Gunde-Cimernan y Cimernan (1995) y Hu y cols. (2006) en dichos estudios se encuentra la mayor concentración de lovastatina en el píleo y principalmente en el himenio, que en el estípite de CF de diferentes tamaños.

Por su parte Chen y cols. (2012) realizaron una investigación en la que evaluaron el contenido de lovastatina en cuerpos fructíferos de 29 especies de hongos comestibles, entre los que se encontraba *Pleurotus ostretus* obtenido de los mercados locales de Corea, Japón y Taiwán. A las muestras se les realizó la extracción con acetonitrilo y los resultados mostraron que el cuerpo fructífero de *P. ostreatus* obtenido del mercado local de Japón presentó el mayor contenido de lovastatina (0.6065 mg/g), sin embargo estos resultados están muy por debajo de los obtenidos en nuestro estudio.

9. CONCLUSIONES

- La espectrofotometría UV-VIS es un método eficiente para la cuantificación de lovastatina.
- La lovastatina inhibe el crecimiento de *C. albicans* por lo que el bioensayo puede ser un método indirecto útil para la cuantificación de lovastatina.

10. PERSPECTIVAS

- Se ha reportado que la relación carbono/nitrógeno es importante para la producción de este metabolito secundario, por lo tanto sería importante estandarizar un medio de cultivo con una relación carbono/nitrógeno que beneficie a un mayor rendimiento de la producción de lovastatina.
- Existen investigaciones que indican que el factor estresante puede ayudar a aumentar la producción de lovastatina, por lo tanto modificar la actividad de agua (A_w), pH y temperatura son algunos de los factores que pueden modificarse para provocar algún tipo de estrés a *P. ostreatus* e inducir así una mayor producción de lovastatina.
- Así mismo también se han publicado trabajos en los que se realizan mutantes de los organismos productores de lovastatina para aumentar la obtención de dicho metabolito, por lo que generar mutantes *P. ostreatus* por medios químicos o físicos puede ser una propuesta para mejorar el rendimiento de lovastatina.

11. REFERENCIAS

- Alam N, Yoon K. (2011). Hypolipidemic activities of dietary *Pleurotus ostreatus* in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*. 39: 45-51.
- Alarcón J, Águila S, Arancibia-Avila P, Fuente O, Zamorano-Ponce E, Hernández M. (2003). Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Zeitschrift für Naturforschung*. 58: 62-64.
- Alarcón J, Águila S. (2006). Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: effects of the C:N ratio. *Zeitschrift für Naturforschung*. 61: 95-98.
- Alberts A. W, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Tothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Curri S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxyl methyl glutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lower ingagent. *Biochemistry*. 77: 3957-3961.
- Alexopoulos C, Mims C, Blackwell M. (1996). *Introductory Micology*. 4ª edición. Editorial John Wiley and sons. New York. 869 pp.
- Álvarez de Sotomayor M, Herrera M. (1999). Interés terapéutico de las estatinas en el tratamiento de la aterosclerosis. *Ars Pharmaceutica*. 40: 217-231.
- Baños J. G, Tomasini A, Szakács G, y Barrios-González J. (2009). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108: 105-110.
- Barrios-González J, Baños J. G, Covarrubias A. A, Garay-Arroyo A. (2008). Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 79: 179-186.
- Baysal E, Peker H, Yalinkilic M. K, Temiz A. (2003). Cultivation of oyster mushroom waste paper with some added supplementary materials. *Bioresource Technology*. 89: 95-97.
- Bermúdez R, Morris H, Donoso C, Fernández C, Ramos E. (2003). Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. *Florida*. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Disponible en Formato PDF.

- Bonatti M, Karnopp P, Soares H. M, Furlan S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*. 88: 425-428.
- Cardona U. L. (2001). Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Crónica forestal y del medio ambiente*. 16: 99-119.
- Carrillo L. (2003). Estructura de los hongos. *Microbiología Agrícola*. 4: 1-6.
- Casas J, Sánchez J. (2005). Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*. 116: 61-77.
- Casas López J. L, Sánchez Pérez J. A, Fernández Sevilla J. M, Ación Fernández, F. G, Molina Grima E, Chisti Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 270-277.
- Chairote E.O, Chairote G, Niamsup H, Lumyong S. (2008). The presence and the content of Monacolins in red yeast rice prepared from Thai glutinous rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 3039-3047.
- Chakravarti R, Sahai V. (2004). Compactina review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64: 618-24.
- Chang S. T. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk). *Sing in China. International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 291-300.
- Chen S-Y, Ho K-J, Hsieh Y-J, Wang L-T, Mau J-L. (2012). Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Science and Technology*. 47: 274-278.
- Clyde M. (1964). *Los hongos y el hombre. Introducción al estudio de los hongos*. Editorial Interamericana, S. A. Segunda Edición. México.
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 8: 37-45.
- Conly J, Clement F, Tonelli M, Hemmelgarn B. (2011). Cost-effectiveness of the use of low- and high-potency statins in people at low cardiovascular risk. *Canadian Medical Association or its licensors*. 16: 180-188.

- Deacon J. (1993). Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa pp. 350.
- Di Napoli P, Taccardi A. (2005). Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia–reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovascular Research*. 66: 462-71.
- Díaz-Godínez G, Soriano J, Viniegra-González G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiol and Biotechnology*. 26: 271-275.
- Dimitroulakos J, Ye L. Y, Benzaquen M. (2001). Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*. 7: 158-167.
- Donald I. A, Couey P, Shade S. (2011). Antihyperlipidemic effects of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushrooms) in HIV-infected individuals taking antiretroviral therapy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11: 1-8.
- Elmastasa M, Isildaka O, Turkekulb I, Temura N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 337-345.
- Fernández J, Hernandez M, Rios G, Gutierrez C. (2003). Cholesterol biosynthetic pathway. *Journal Antibiotics*. 16: 234-246.
- Flegg P, Spencer D, Wood D. (1985). The biology and technology of the cultivate mushrooms. New York. John Wiley. 347 pp.
- Friedrich J, Zuzek M, Bencina M, Cimerman A, Strancar A, Radez I. (1995). High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. *Journal of Chromatography A*. 704: 363-367.
- Gaitán R, Salmones D, Pérez R, Mata G. (2006). Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, A.C. Veracruz México. Disponible en PDF.
- García M. (1986). Manual para buscar setas. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Tercera Edición. Madrid.
- Gil-Ramírez A, Clavijo C, Palanisamy M, Soler-Rivas C. (2011). Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.

- Gregori A, Svagelj M, Pohleven J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus spp.* Food technology biotechnology. 45: 238-249.
- Gulyamova T.G, Nasmetova S.M, Ruzieva D.M, Ziyavitdinov J.F, Sattarova R.S, Rasulova G.A. (2014). Composition of statins produced by indigenous strain of *Aspergillus terreus*. International Journal of Engineering, Science and Technology. 6: 71-76.
- Gulyamova T. G, Ruzieva D. M, Nasmetova S. M, Sattarova R. S, Lobanova K. V, Abdulmyanova L. A, Rasulova G. A. (2013). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. International Journal of Engineering, Science and Technology. 5: 19-24.
- Gunde-Cimernan N, Cimernan A. (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa-Lovastatin. Experimental Mycology. 19: 1-6.
- Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politecnico Nacional. México. 245 pp.
- Guzmán G. (1997). Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina. Instituto de Ecología. México. 111-117.
- Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology. 67: 2596-2602.
- Henzler H. J. y Schedel M. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. Bioprocess Engineering. 7: 123-131.
- Herrera T, Ulloa M. (1990). El reino de los hongos Micología básica y aplicada. 1 a Ed., Fondo de Cultura Económica. México.
- Herrera T, Ulloa M. (1998). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica-UNAM. México. 552 pp.
- Ho M. H, Chiang C. P. (2011). Highly efficient release of lovastatin from poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. Journal of Orthopaedic research. 1504-1510.
- Hu S-H, Wang J, Lien J. (2006). Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. Applied Microbiology Biotechnology. 70: 107-113.

- Jaivel N, Marimuthu P. (2010). Isolation and screening of lovastatin producing microorganisms. *Inter Journal of Engineering Science and Technology*. 2: 2607-2611.
- Jaivel N, Marimuthu P. (2010). Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. *Inter Journal of Engineering Science and Technology*. 2: 2730-2733.
- Jayakumar T, Aloysius P, Pitchairaj G. (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*. 42: 183-191.
- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1989-1996.
- Johnson W. J. (1997). Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcellular Biochemistry*. 28: 235-276.
- Kajaba I, Simoncic R, Frecerova K, Belay G. (2008). Clinical studies on the hypolipidemic and antioxidant effects of selected natural substances. *Bratislavské lekárske listy*. 109: 257-272.
- Kumar M. S, Pallapothu M. K, Hemant M. S, Sadhukhan A. K. (1999). A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *Journal Microbiological Methods*. 40: 99-104.
- Kwak B, Mulhaupt F, Myit S. (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Medicine*. 6: 1399-1402.
- Lai L, Tsai T. (2002). Application of Oxygen Vectors to *Aspergillus terreus* Cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 453-459.
- Lakshmanan D, Radha K. V. (2012). An effective quantitative estimation of lovastatin from *Pleurotus ostreatus* using UV and HPLC. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4: 462-464.
- Lakshmanan D, Radha K. V. (2013). Lovastatin production using *Pleurotus ostreatus* and its medicinal properties analysis by docking. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7: 1974-1986.
- Larraya L. M, Peñas M. M, Perez G, Santos C, Ritter E, Pisabarro A. G, Ramirez L. (1999). Identification of incompatibility alleles and Characterisation of molecular marker

- genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics*. 34: 486-493.
- Lee J. K, Kim S. Y, Kim S.U, Kim J. H. (2002). Synthesis of cationic polysaccharide derivatives and their hypocholesterolaemic capacity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35: 181-189.
- Lehninger A.L. (1979). *Bioquímica*. 2a edición. Omega. Barcelona, España. 427-430.
- Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R. (2002). Homocysteine induces 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in vascular endothelial cells A mechanism for development of atherosclerosis? *Circulation Research*. 105: 1037-1043.
- Li Y, Liu H, Wang Z. (2005). A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of -fermented rice, red yeast rice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 82-90.
- Li Y, Zhang F, Zheng-tao W, Zhi-bi H. (2004). Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35: 1101-1112.
- Liul X, Zhou1 B, Lin1 R. (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus spp.* Mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47: 116-119.
- Marcin B, Stanislaw L. (2009). Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Journal*. 4: 1-61.
- Miranda R. U, Gómez-Quiroz L. E, Mejía A, Barrios-González J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. *Fungal Biology*. 117: 85-93.
- Mitchell D.A, Berovic M. Krieger N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 68: 65-135.
- Moore-Landecker E. (1996). *Fundamentals of the fungi*. 4a edición. Editorial Prentice Hall. USA. 574 pp.

- Morovján G, Szakács G, Fekete J. (1997). Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broth by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 763: 165-172.
- Osman M, Khattab G. (2011). Optimization of some physical and chemical factors for lovastatin productivity by local strain of *Aspergillus terreus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5: 718-732.
- Ou H, Wang C, Lai L. (2009). Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus*-fermented products. *LWT –Food Science and Technology*. 42: 292-296.
- Panda B. P, Javed S, Ali M. (2009). Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus Purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 123-127.
- Panda B. P, Javed S, Ali M. (2010). Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through Co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food Bioprocess Technology*. 3: 373-378.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlayangkak fermented by *Monascus ssp*. *International Journal of Food Microbiology*. 126: 20-23.
- Piedras-Huerta M, Asenjo-Barrón J. (2001). Las vastatinas, inhibidoras de la biosíntesis del colesterol: eficacia y toxicidad. *Facultad de Medicina UNAM*. 44: 12-17.
- Pirt S. J, Lee Y-K, Richmond A, Watts Pirt M. (1975). The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilisation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 30: 25-34.
- Poucheret P, Fons F, Rapior S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Cryptogamie Mycologie*. 27: 311-233.
- Radha K. V, Lakshmanan D. (2012). A review: lovastatin production and applications. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6: 21-26.
- Raghunath R, Radhakrishna A, Angayarkanni J, Palaniswamy M. (2013). Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 AN endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 3: 342-351.

- Rajput S. J, Raj H. A. (2009). Simultaneous estimation of ezetimibe and lovastatin by derivative spectroscopy. *International Journal of PharmTech Research*. 3: 894-899.
- Ramírez L, Larraya L. M, Pisabarro A. G. (2000). Molecular tools for Breeding basidiomycetes. *International Microbiology*. 3: 147-152.
- Rathee S, Rathee D, Rathee D, Kumar V, Rathee P. (2011). Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22: 459-474.
- Salmones D, Mata G, Waliszewski K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus spp.* On coffee pulp and wheat Straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*. 96: 537-544.
- Samiee S. M, Moazami N, Haghighi S, Mohseni F. A, Mirdamadi S, Bakhtiari M. R. (2003). Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal*. 7: 29-33.
- Sanchez C. (1998). Morphogenesis of mushroom fungi: ultrastructural, physiology and histological study of *Pleurotus ostreatus*. Ph. D. Dissertation, Manchester U.K. The University of Manchester.
- Sánchez C. (2009). Research review paper lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27:185-194.
- Sayyad S. A, Panda B. P, Javed S, Ali M. (2007). Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1054-1058.
- Shashirekha M. N, Rajarathnam S, Bano Z. (2002). Enhancement of bioconversión efficiency and chemistry of the mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Berk and Br.) Sacc. Produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seedcakes. *Food Chemistry*. 76: 27-31.
- Sreenivasan A, Shubahgar S, Arvindan R, Viruthagiri T. (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 70: 701-709.
- Stamets P. (1995). www.fungi.com
- Stamets P, Chilton J. (1983). *The Mushroom Cultivator*. Washington. Agarikon Press Olimpia. 415 pp.

- Steineck H. (1987). Cultivo comercial del champiñón. Zaragoza, España. Acribia. 142 pp.
- Stêpieñ K, Tomaszewski M, Stanislaw J. (2005). Neuroprotective properties of statins. *Pharmacological Reports*. 57: 561-569.
- Su Y.-C, Wang J.-J, Lin T.-T, Pan T.-M. (2003). Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 41-46.
- Téllez-Téllez M, Fernández F. J, Montiel-González A. M, Sanchez C, Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 81: 675-679
- Thekkuttuparambil A, Janardhanan K. (2007). Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 40: 157-162.
- Valencia-del Toro G. (2002). Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus spp.* por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado. UNAM. México, D. F.
- Vedder P. (1986). Cultivo moderno del champiñón. Madrid, España. Mundi Prensa. 369.
- Velásquez M, Mata G, Salmones D. (1999). Cultivo de cepas de *Pleurotus* en pulpa de café: evaluación comparativa de la productividad. III Congreso Latinoamericano de Micología. Caracas, agosto 31-septiembre 3 de 1999 Asociación Latinoamericana de Micología. 175 pp.
- Wang J. C, Hu S-H, Yeh C-J. (2005). Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied Microbiology Biotechnology*. 67: 759-766.
- Yang D, Hwang, L. (2006). Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *Journal of Chromatography A*. 1119 pp.
- Zervakis G, Balis C. (1992). Comparative Study on the Cultural Characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Revista Mexicana de Micología*. 5: 39-47.

12. ABREVIATURAS

HMG-CoA	Enzima hidroximetilglutaril-coenzima A
NO	óxido nítrico
CT	colesterol total
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
HDL	Lipoproteína de alta densidad
FMS	Fermentación en medio sólido
FML	Fermentación en medio líquido
CF	Cuerpos fructíferos
EC	Extracto crudo
PDA	agar papa dextrosa
g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
mL	mililitro
µL	microlitro
min	minuto
r.p.m.	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de hidrógeno
PUF	Espuma de poliuretano
spp	Especies
UFC	Unidades formadoras de colonias



National Congress of
**Biotechnology and
Bioengineering**



GIM2013
12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF PRESENTATION

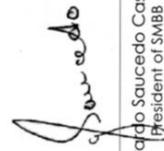
We hereby certify that

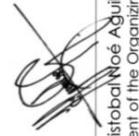
Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo, Maura Téllez-Tellez, Roxana U. Miranda, Rubén Díaz, Saúl Tlecuitl-Beristáin, Carmen Sánchez, Gerardo Díaz-Godínez

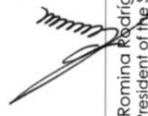
Delivered the Poster presentation

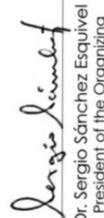
SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR LOVASTATIN QUANTIFICATION

XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.


Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
President of SMBB


Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
President of the Organizing Committee
SMBB


Dra. Romina Rodríguez Sanoja
President of the Scientific
Committee SMBB/GIM


Dr. Sergio Sánchez Esquivel
President of the Organizing
Committee GIM


Dr. Stefano Donadio
President of GIM



Congreso Internacional
**Biología, Química
y Agronomía**

La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través de la
Facultad de Ciencias Químicas y de la
Escuela de Ciencias Biológico-Agropecuarias

otorga el presente

Reconocimiento

a **Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo, Valentín Varela Floriano, Maura Téllez Téllez, Roxana Uri Miranda Labra, Ruben Díaz Godínez, Saúl Tlecuttl Bernstein, Gerardo Díaz Godínez**

por su trabajo titulado: ***Producción de Iovastatina por Pleurotus ostreatus en fermentación sumergida utilizando diferentes fuentes de carbono.***

4o. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía
“Innovación para el Desarrollo Sustentable”, celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Zapopan, Jalisco, México, septiembre de 2013.

Ing. José Antonio Barriga de la Torre
Decano de la Unidad Académica de
Diseño, Ciencia y Tecnología

Ing. Tomás Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas





Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Otorga la presente

CONSTANCIA

A Idiana Ixchel Ayerdy Rudecindo
Estudiante Maestría en Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Tlaxcala

Por impartir el seminario

"Producción de lovastatina por *Pleurotus ostreatus*"

Tlaxcala, Tlax., mayo 30 de 2014

Dra. Margarita Martínez Gómez
Coord. General Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



CIBB-S4-P67

DETERMINACIÓN DE LOVASTATINA EN CUERPOS FRUCTIFEROS DESHIDRATADOS DE *Pleurotus ostreatus*

Gutiérrez-Hernández, I.D.^{1,2}, Ayerdy, I.^{1,2}, Díaz-Godínez, G.¹, Téllez-Téllez, M.³

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. E-mail: diazgd@hotmail.com

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

³Centro de investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos México. E-mail: ttlez2@hotmail.com.

La lovastatina es un hipocolesterolémico, inhibidor específico de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, enzima que cataliza la conversión a mevalonato en la colesterologénesis. Disminuye la concentración plasmática de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y por consiguiente la síntesis de receptores de LDL. Es un metabolito secundario producido por algunos hongos, principalmente *Aspergillus niger*. En este estudio se evaluó la concentración de lovastatina en cuerpos fructíferos secos de *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783). Para el desarrollo del inóculo primario se utilizó semilla de trigo hidratada por 24 h y esterilizada. Se inoculó con fragmentos de micelio desarrollado sobre agar papa-dextrosa. Para la producción se usó paja de trigo y bolsas de nylon, alternando capas de inóculo (0.1 kg) y de paja pasteurizada (0.5 kg). Se incubaron en la oscuridad por 15 días, posteriormente, se trasladaron al cuarto de producción en presencia de luz hasta la fructificación. Se tomaron cuerpos fructíferos por triplicado de 3.5, 7.0 y 10 cm de longitud. Se secaron a 60°C durante 48 h, posteriormente se molieron y almacenaron por separado en pila y estípites. Se determinó la lovastatina por HPLC y por espectrofotometría a 245 nm. Los valores más altos se encontraron en el pila de mayor tamaño (26.74 mg/g) y en el estípite de más pequeño (25.54 mg/g), sin embargo, la concentración en este último mantuvo sin diferencias significativas entre los tres tamaños analizados. *Pleurotus ostreatus* se considera un potencial productor de lovastatina.

Palabras clave: Lovastatina, *Pleurotus ostreatus*, cuerpo fructífero seco





CIBB-S5-P89

PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA POR *Pleurotus ostreatus* EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Ayerdy, I^{1,2}, Díaz, R¹, Tlecuitl-Beristain, S³, Díaz-Godínez, G¹, Téllez-Téllez, M⁴

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. E-mail: diazgd@hotmail.com.

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

³Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

⁴Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México. E-mail: tlelez2@hotmail.com;

La lovastatina es un hipocolesterolémico, es inhibidor específico de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coA reductasa en la biosíntesis del colesterol. Disminuye la concentración plasmática de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y por consiguiente la síntesis de receptores de LDL. Es producida por algunos hongos, principalmente *Aspergillus niger*. En este estudio se investigó si *Pleurotus ostreatus* (ATCC-32783) produce lovastatina en fermentación sumergida. La fermentación se realizó por triplicado durante 25 días en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo (glucosa, extracto de levadura, bactopectona y sales minerales). Se ajustó el pH a 6.5 con KOH 0.1 M. Cada matraz se inoculó con 3 pellets de 4 mm de diámetro tomados de la periferia de una colonia crecida por 7 días sobre agar papa-dextrosa y se incubaron en agitación orbital de 120 rpm a 25 °C. Se tomaron muestras cada 24 h. Se determinó la lovastatina por HPLC y por espectrofotometría a 248 nm, en el caldo de cultivo y en el micelio. Se encontró que la lovastatina se produce durante todo el cultivo, sin embargo solo se excreta en las primeras 200 h de fermentación. El valor más alto en el micelio y en el caldo de cultivo fueron (4.13 y 2.57 mg/g, respectivamente). *Pleurotus ostreatus* se considera un potencial productor de lovastatina, y es posible aumentar la producción realizando modificaciones en las condiciones de cultivo.

Palabras clave: Lovastatina, *Pleurotus ostreatus*, fermentación sumergida.





CIBB-S5-P93

DETERMINACIÓN DE LOVASTATINA EN CUERPOS FRUCTIFEROS DE *Pleurotus ostreatus*

Ayerdy, I.^{1,2}, Díaz, R.¹, Tlacuilli-Beristain, S.³, Díaz-Godínez, Gerardo¹, Téllez-Téllez, M.⁴

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. E-mail: diazgd@hotmail.com.

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

³Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

⁴Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México. E-mail: ttlez2@hotmail.com.

La lovastatina es un hipocolesterolémico, inhibidor específico de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa en la biosíntesis del colesterol. Disminuye la concentración plasmática de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y por consiguiente la síntesis de receptores de LDL. Es producida por algunos hongos, principalmente *Aspergillus niger*. En esta investigación se evaluó la concentración de lovastatina en cuerpos fructíferos frescos de *Pleurotus ostreatus* (ATCC-32783). Para el desarrollo del inóculo primario se utilizó semilla de trigo hidratada por 24 h y esterilizada. Se inoculó con fragmentos de micelio desarrollado sobre agar papa-dextrosa. Para la producción se usó paja de trigo y bolsas de nylon, alternando capas de inóculo (0.1 kg) y de paja pasteurizada (0.5 kg). Se incubaron en la oscuridad por 15 días; posteriormente, se trasladaron al cuarto de producción en presencia de luz hasta la fructificación. Se tomaron cuerpos fructíferos por triplicado de 3.5, 7.0 y 10 cm de longitud. Se determinó la lovastatina por HPLC y por espectrofotometría a 248 nm, en el pileo y estípite. En general, los valores mayores se observaron en el pileo. En el cuerpo fructífero pequeño (3.5 cm) reportó los valores más altos (pileo y estípite de 3.83 y 1.47 mg/g, respectivamente). *Pleurotus ostreatus* se considera un potencial productor de lovastatina.

Palabras clave: Lovastatina, *Pleurotus ostreatus*, cuerpo fructífero fresco.

