



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**INCIDENCIA DEL MEDIO Y DE LAS
CONDICIONES DE CULTIVO EN EL
POTENCIAL COMO NUTRICEÚTICO
DE TRES ESPECIES DEL GENERO
*Pleurotus***

M.Sc. Carolina Chegwin Angarita

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2014

**INCIDENCIA DEL MEDIO Y DE LAS
CONDICIONES DE CULTIVO EN EL
POTENCIAL COMO NUTRICEÚTICO
DE TRES ESPECIES DEL GENERO**
Pleurotus

M.Sc. Carolina Chegwin Angarita

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Química

Directora:

Dr. Sc. Ivonne Jeannette Nieto R

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de Hongos Macromicetos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2014

Resumen

El cultivo biotecnológico empleando fermentaciones en estado líquido de hongos del género *Pleurotus*, usando salvado de trigo y harinas de cereales y leguminosas como fuentes de carbono no convencionales, en busca de evaluar el efecto del cambio de algunas condiciones del proceso sobre la composición tanto de los micelios como de los caldos agotados y por ende del potencial como nutriceúutico del mismo, para posteriormente evaluar la aplicabilidad de dicho producto en la obtención de fructificaciones y comparar las composiciones de los tipos de biomasa obtenidos por los dos procesos, es un interesante tema de investigación que aporta en gran medida a diferentes ramas de la ciencia como son la tecnología de alimentos, la biotecnología y la química, entre otras. Los resultados totales permitieron determinar que efectivamente el empleo de una u otra fuente de carbono al igual que las condiciones del proceso inciden en el valor nutriceúutico del producto obtenido, llevando a direccionar el empleo tanto a una fuente de carbono específica, como de la elicitación con un LED determinado y el uso de un pH inicial óptimo en la fermentación dependiendo del empleo final que se le dará al producto biotecnológico como nutriceúutico, ya que lo que se desea promover biosintéticamente no es lo mismo si su posterior empleo se restringe a la utilización del micelio únicamente o al caldo de cultivo agotado por separado o a la combinación de los dos. Así mismo, si lo que se busca es obtener un producto con mayor variabilidad estructural de triterpenoides, y por ende de mayor número de potenciales acciones biológicas, lo que conlleva a un mayor valor nutriceúutico, se debe optar por el empleo de la FEL mientras que si lo que se desea es una biomasa con alto contenido de ergosterol, provitamina D2, el proceso elegido deber ser la FES. Con respecto a la producción de estatinas si bien no se logró confirmar la presencia de metabolitos con estructuras correspondientes a las tomadas como estándares en ninguno de los productos biotecnológicos, se desarrolló una metodología para su detección en matrices complejas que a la vez permitió encontrar metabolitos con comportamientos cromatográficos similares a los presentados por los estándares usados, resultado este que abre la puerta a futuras investigaciones que permitan establecer con claridad las características estructurales de los metabolitos detectados.

Palabras clave: *Pleurotus*, fermentaciones, estatinas, triterpenoides, nutriceúuticos, cromatografía, bioactivos.

Abstract

Biotechnological culture via liquid-state fermentation of fungi of the genus *Pleurotus*, using wheat bran and flour of cereals and legumes as unconventional carbon sources, in search of evaluating the effect of changing some process conditions on the composition of mycelia and broth and therefore the potential as nutraceutical of the biotechnological product, to later evaluate the applicability of the product in obtaining fructifications and compare the compositions of the types of biomass obtained by the two processes. It is an interesting research topic that contributes greatly to different branches of science such as food technology, biotechnology and chemistry, among others. The overall results have revealed indeed that the use of one or other carbon source the same as process conditions affect the nutraceutical value of the product obtained, allowing both direct employment to a specific carbon source, and the elicitation with LED determined and the use of optimal initial pH in the fermentation, depending on the final use that will be given to the biotechnological product as nutraceutical, since what it is wanted is to promote biosynthetically is not the same if the further use is only restricted to the use of mycelial biomass or to the broth separately or to the combination of the two. Likewise, if what is searched to obtain is a product with greater structural variability of triterpenoids, and as a result of larger potential biological actions, leading to greater nutraceutical value, it should be selected the use of the liquid state fermentation while if what it is wanted is biomass with a high contents of ergosterol, provitamin D2, the chosen process should be solid state fermentation.

Regarding the production of statins although it was not achieved to confirm its presence in any of the products obtained, a methodology was developed for the detection in complex matrices, that simultaneously allowed to find metabolites with similar chromatographic behavior to those presented by the used standards, a result that opens the door to further research to clearly establish the structural characteristics of the detected metabolites.

Keywords: *Pleurotus*, fermentations, statins, triterpenoids, nutraceuticals, chromatography, bioactives.

Indice general

Resumen.....	IV
Introducción	XVIII
Glosario.....	21
CAPITULO 1. INCIDENCIA DE FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>Pleurotus</i> OBTENIDO POR FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO.....	23
Lista de abreviaturas	24
1.1. ANTECEDENTES	25
1.1.1. Generalidades de los <i>Pleurotus</i>	26
1.1.1.1. Biología del género: características morfológicas	26
1.1.1.2. Farmacología de los <i>Pleurotus</i>	27
1.1.2. Carácter nutriceútico de los macrohongos	28
1.1.3. Métodos de producción de hongos.....	29
1.1.3.1. Efecto de los diferentes factores sobre una fermentación	31
1.1.4. Fermentaciones con <i>Pleurotus</i>	32
1.1.5. Medios de cultivo tradicionales y no convencionales empleados para la producción biotecnológica de <i>Pleurotus</i>	33
1.1.6. Técnicas para la determinación de biomasa.....	34
1.2. METODOLOGÍA	35
1.2.1. Obtención del material fúngico.....	35
1.2.2. Determinación de la biomasa	35
1.2.3. Análisis bromatológico de las fuentes de carbono	36
1.2.4. Análisis estadístico.....	36
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1.4. CONCLUSIONES	43
CAPITULO 2. INCIDENCIA DEL EMPLEO DE CEREALES Y LEGUMINOSAS EN LA PRODUCCIÓN FÚNGICA DE COMPUESTOS TRITERPENOIDALES.....	44
Lista de abreviaturas	45
2.1. ANTECEDENTES	46
2.1.1. Generalidades de los metabolitos fúngicos	46
2.1.2. Triterpenoides fúngicos.....	48
2.1.3. Estudios previos realizados por el grupo de Química de Hongos Macromicetos	48
2.1.4. Factores que afectan los procesos fermentativos	50

2.1.4.1. Factores físicos.....	50
2.1.4.1.1 <i>Temperatura</i>	50
2.1.4.1.2. <i>Fuerzas mecánicas</i>	51
2.1.4.1.3. <i>Contenido de oxígeno</i>	51
2.1.4.2. Factores biológicos.....	52
2.1.4.2.1. <i>Inóculo</i>	52
2.1.4.3. Factores químicos.....	52
2.1.4.3.1. <i>pH</i>	52
2.1.4.3.2. <i>Composición del medio</i>	52
2.1.5. Los procesos fermentativos y la obtención de Triterpenoides.....	53
2.2. METODOLOGIA.....	55
2.2.1. Material fúngico.....	55
2.2.2. Determinación de las condiciones óptimas de extracción.....	55
2.2.3. Obtención de los extractos de <i>Pleurotus</i>	56
2.2.4. Análisis de la incidencia de la fuente de carbono sobre la composición de los productos biotecnológicos.....	56
2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	58
2.2.6. Cromatografía en capa delgada (CCD).....	58
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
2.3.1. Determinación de las condiciones óptimas de extracción de los productos de la FEL..	58
2.3.2. Caracterización de las harinas.....	60
2.3.2.1. Composición global.....	60
2.3.2.2. Compuestos triterpenoidales.....	61
2.3.3. Composición de los productos biotecnológicos.....	64
2.3.3.1. Composición global.....	64
2.3.3.2. Compuestos triterpenoidales.....	66
2.4. CONCLUSIONES.....	76

CAPITULO 3. IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CLAE-UV PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ESTATINAS..... 78

Lista de abreviaturas.....	79
3.1 ANTECEDENTES.....	80
3.1.1 Las estatinas: generalidades.....	80
3.1.2. Técnicas de extracción, separación e identificación.....	85
3.2. METODOLOGÍA.....	87
3.2.1. Materiales.....	87
3.2.2. Optimización de las condiciones de hidrólisis de LOVL.....	88
3.2.3. Determinación analítica de las estatinas.....	88
3.2.3.1. Equipos.....	88
3.2.3.2. Evaluación de los parámetros analíticos del método CLAE-UV.....	89
3.2.4. Determinación del efecto del uso de alcoholes sobre soluciones de LOVL y SIML.....	89
3.2.5. Estabilidad de las estatinas durante 24 horas.....	89
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
3.3.1. Optimización de las condiciones de hidrólisis de LOVL.....	89
3.3.2. Determinación de las condiciones cromatográficas óptimas.....	92
3.3.3. Evaluación de los parámetros de cuantificación del método cromatográfico.....	94

3.3.3.1. Confiabilidad.....	94
3.3.3.2. Sensibilidad.....	95
3.3.3.3. Exactitud y precisión.....	95
3.3.4. Efecto del uso de alcoholes en la extracción.....	96
3.3.5. Estabilidad de las estatinas durante 24 horas	97
3.4. CONCLUSIONES	98
CAPITULO 4. DETERMINACIÓN POR MEDIO DE CLAE-UV DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE ESTATINAS POR <i>Pleurotus</i> CULTIVADOS POR FEL.....	100
Lista de abreviaturas	101
4.1. ANTECEDENTES	102
4.1.1. Procesos fermentativos en la obtención de estatinas en hongos micromicetos.....	102
4.1.2. Efecto de la composición del medio en la producción de estatinas en micromicetos..	103
4.1.3. Las estatinas en <i>Pleurotus</i>	105
4.2. METODOLOGÍA	108
4.2.1. Detección de la producción de estatinas en los productos de la FEL.....	108
4.2.2. Aproximación a la identidad de los compuestos detectados por CLAE-UV	109
4.2.3. Estudio de la aplicabilidad de la técnica de CLAE-UV a productos con presencia comprobada de estatinas	109
4.2.4. Determinación de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de los compuestos detectados por CLAE-UV	110
4.2.5. Evaluación del efecto del estadio de maduración del hongo en los metabolitos tipo estatina detectados por CLAE-UV.....	110
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	110
4.3.1. Detección de la presencia de estatinas en los productos de la FEL empleando FC no convencionales.....	110
4.3.2. Aproximación a la identidad de los componentes identificados por CLAE-UV en los extractos de los <i>Pleurotus</i> obtenidos por FEL	123
4.3.2.1. CG-EM en modo SIM para la detección de la producción de estatinas en los extractos de <i>Pleurotus</i>	126
4.3.3. Aplicabilidad de la técnica de CLAE-UV desarrollada a productos con la presencia comprobada de estatinas	130
4.3.4. Cambios en la composición del medio de cultivo para la producción de estatinas en <i>Pleurotus</i>	132
4.3.5. Evaluación del efecto del estadio de maduración en la producción de estatinas	134
4.4. CONCLUSIONES	137
CAPITULO 5. CONTRIBUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN GENERAL DEL PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO A SU CARÁCTER NUTRICEÚTICO.....	138
Lista de abreviaturas	139
5.1. ANTECEDENTES	141
5.1.1. Compuestos fúngicos bioactivos.....	141
5.1.1.1. Polisacáridos fúngicos	141
5.1.1.2. Ácidos grasos fúngicos	143
5.1.1.3. Otros compuestos fúngicos	143
5.2. METODOLOGÍA	144

5.2.1. Material fúngico.....	144
5.2.2. Evaluación de la incidencia de la fuente de carbono sobre la composición de los productos biotecnológicos.....	144
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	144
5.3.1. Constituyentes particulares de las fuentes de carbono	145
5.3.2. Determinación de los constituyentes de los productos biotecnológicos y el efecto de las FC en su producción.....	147
5.3.2.1. Ácidos	147
5.3.3.2. Ésteres	150
5.3.3.3. Aldehídos	153
5.3.3.4. Otros compuestos	155
5.3.3. Variación en la producción de EPS con las FC empleadas para el cultivo	158
5.4. CONCLUSIONES	163
CAPITULO 6. CORRELACIÓN ENTRE EL pH INICIAL DE LA FERMENTACIÓN Y LA COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS	164
Lista de abreviaturas	165
6.1 ANTECEDENTES.....	166
6.1.1. El papel del pH en los procesos fermentativos	166
6.2. METODOLOGÍA	168
6.2.1. Material fúngico.....	168
6.2.2. Obtención y análisis de los extractos de <i>Pleurotus</i>	168
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	168
6.3.1. Efecto del cambio en el pH inicial sobre la composición del producto biotecnológico de <i>Pleurotus ostreatus</i>	169
6.3.2. Efecto del cambio en el pH sobre la composición del producto biotecnológico de <i>Pleurotus djamor</i>	171
6.3.2. Efecto del cambio en el pH sobre la composición del producto biotecnológico de <i>Pleurotus pulmonarius</i>	174
6.3.3. Impacto del cambio del pH inicial en la producción de exopolisacáridos	178
6.4. CONCLUSIONES	180
CAPITULO 7. EFECTO DE LA ELICITACIÓN CON DIODOS EMISORES DE LUZ EN LA COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS DE <i>Pleurotus</i>	181
Lista de abreviaturas	182
7.1. ANTECEDENTES.....	183
7.1.1. Generalidades de los elicitores.....	183
7.1.2. Los diodos emisores de luz	184
7.1.3. LEDs y el reino fungi.....	185
7.1.4. Los elicitores y la producción de triterpenoides en hongos	189
7.2. METODOLOGÍA	190
7.2.1. Espectros de emisión de los LEDs	190
7.2.2. Material fúngico.....	190
7.2.3. Obtención y análisis de los extractos de <i>Pleurotus</i>	191
7.3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	191

7.3.1. LEDs y composición del <i>Pleurotus ostreatus</i>	192
7.3.2. LEDs y composición del <i>Pleurotus pulmonarius</i>	196
7.3.3. LEDs y composición del <i>Pleurotus djamor</i>	198
7.3.4. LEDs y producción de EPS.....	203
7.4. CONCLUSIONES	206
CAPITULO 8. FES vs FEL: ESTUDIO DE LA APLICABILIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO POR FEL COMO INOCULO PARA FES Y SUS EFECTOS SOBRE EL POTENCIAL NUTRICEUTICO DEL PRODUCTO FINAL	207
Lista de abreviaturas	208
8.1. ANTECEDENTES	209
8.1.1. FES vs FEL: una comparación entre las dos técnicas.....	209
8.1.2. Técnicas de inoculación empleadas para la obtención de fructificaciones	213
8.2. METODOLOGÍA	214
8.2.1. Obtención del inóculo líquido.....	214
8.2.2. Fermentación en estado sólido.....	214
8.2.3. Obtención y análisis de la composición de los extractos	215
8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	215
8.3.1. Producto de la FEL como inóculo líquido para FES.....	215
8.3.2. FEL vs FES: relación entre el tipo de fermentación y la composición del producto final	220
8.3.3. Fraccionamiento de los extractos en AcOEt del micelio y las fructificaciones de <i>Pleurotus djamor</i>	227
8.4. CONCLUSIONES	229
Conclusiones generales y perspectivas	231
Bibliografía.....	235
Anexos	270
Producción científica	298

Índice de figuras

Figura 1-1: Ejemplares de <i>Pleurotus djamor</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
Figura 1-2: Producción de biomasa de las tres especies de <i>Pleurotus</i> con las diferentes fuentes de carbono	37
Figura 1-3: Análisis proximal de las fuentes de carbono empleadas en la FEL.....	39
Figura 1-4: Efecto de la composición de las FC sobre la producción de biomasa de <i>Pleurotus</i> obtenidos por FEL.....	41
Figura 2-1: Número aproximado de metabolitos secundarios conocidos de origen microbiano	48
Figura 2-2: Compuestos triterpenoidales aislados de <i>Pleurotus sajor-caju</i> cultivado sobre pulpa de café	50
Figura 2-3: Compuestos triterpenoidales aislados de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado sobre diferentes residuos agrícolas	51
Figura 2-4: Factores que influyen en el desarrollo de un bioproceso	52
Figura 2-5: Protocolo para la determinación del efecto de la FC sobre la producción de los metabolitos de interés.....	58
Figura 2-6: CG de los extractos en diferentes disolventes del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado en harina de maíz amarillo.....	60
Figura 2-7: Comparación de la composición porcentual de los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y de las harinas de cereales para cada una de las fuentes de carbono empleadas.....	62
Figura 2-8: Contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y en las harinas de cereales.....	63
Figura 2-9: Comparación de la composición porcentual de los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de <i>P. ostreatus</i> , <i>djamor</i> y <i>pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	66
Figura 2-10: Efecto de la fuente de carbono sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de <i>Pleurotus</i>	67
Figura 2-11: Efecto de las propiedades de las FC sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos de los micelios de <i>Pleurotus</i> cultivados por FEL.....	68
Figura 2-12: Relación entre la biomasa y la producción de esteroides en <i>Pleurotus djamor</i> , <i>pulmonarius</i> y <i>ostreatus</i>	76
Figura 3-1: Estructuras de las estatinas tipo I que han sido reportadas hasta la actualidad.....	82
Figura 3-2: Estructuras de las estatinas tipo II	85
Figura 3-3: Esquema explicativo de los efectos pleiotrópicos de las estatinas	86
Figura 3-4: Espectros UV típicos de las estatinas tipo I.....	91
Figura 3-5: Cromatogramas CLAE-UV resultantes de algunos tratamientos empleados para la conversión de LOVL-LOVH.....	92
Figura 3-6: Efecto del cambio de las variables estudiadas sobre los parámetros cromatográficos.....	94

Figura 3-7: Cromatograma CLAE-UV de la mezcla de los estándares (0,1 mg/mL) en un sistema de elusión isocrático.....	95
Figura 3-8: Cromatograma CLAE-UV de la mezcla de los estándares (0,1 mg/mL) con un sistema de elusión por gradientes.....	95
Figura 3-9: Estabilidad de las estatinas durante 24 horas.....	98
Figura 3-10: Esquema de las potenciales transformaciones de pravastatina en medio ácido.....	99
Figura 4-1: Contenido de lovastatina en las partes de los esporocarpos de <i>Pleurotus ostreatus</i> de diferentes medidas.....	107
Figura 4-2: CG-EM de mezclas de compuestos triterpenoidales y estatinas.....	112
Figura 4-3: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	113
Figura 4-4: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	115
Figura 4-5: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt del producto de la hidrólisis a pH básico de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	116
Figura 4-6: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt del producto de la hidrólisis a pH neutro de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	118
Figura 4-7: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de <i>Pleurotus pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	119
Figura 4-8: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de <i>Pleurotus djamor</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	120
Figura 4-9: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de <i>Pleurotus pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	121
Figura 4-10: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de <i>Pleurotus djamor</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	122
Figura 4-11: Cromatograma CLAE de mezcla de compuestos triterpenoidales.....	124
Figura 4-12: Cromatograma CLAE-DAD de la mezcla de los patrones (0.1 mg/mL).....	125
Figura 4-13: Cromatograma CLAE-DAD de los extractos del micelio en AcOEt de A) <i>P. djamor</i> cultivado con harina de trigo integral B) <i>P. ostreatus</i> cultivado en harina de siete granos.....	126
Figura 4-14: Espectros de masas de los patrones de las formas lactónicas de A) lovastatina y B) simvastatina.....	127
Figura 4-15: Patrón de fragmentación de lovastatina y simvastatina en forma lactónica.....	128
Figura 4-16: Cromatograma CLAE del extracto en AcOEt de las muestras de arroz rojo fermentado comerciales.....	132
Figura 4-17: Cromatogramas de CLAE de los extractos de los productos biotecnológicos de las cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> de la Universidad del Bío-Bío cultivadas con el medio Hagen modificado.....	132
Figura 4-18: Cromatograma CLAE de los extractos en AcOEt de A) los micelios y B) los medios agotados de las tres especies de <i>Pleurotus</i> cultivadas en las condiciones especificadas por Alarcón et al. 2006.....	134
Figura 4-19: Cromatogramas de CLAE de los extractos de los productos biotecnológicos de las cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> de la Universidad del Bío-Bío cultivadas con salvado de trigo.....	135
Figure 4-20: Cromatograma CLAE de los extractos de A) Cuerpos fructíferos de 5cm de diámetro y B) lamelas de las tres cepas de <i>Pleurotus</i> cultivadas por FES.....	137
Figura 5-1: Comparación de los ácidos y ésteres presentes en los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y en las harinas de cereales.....	146
Figura 5-2: Aldehídos y otros compuestos presentes en los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y las harinas de cereales.....	147
Figura 5-3: Comparación de los ácidos determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de <i>P. ostreatus</i> , <i>djamor</i> y <i>pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	149

Figura 5-4: Estructuras de los ácidos determinados por CG-EM.....	151
Figura 5-5: Comparación de los ésteres determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de <i>P. ostreatus</i> , <i>djamor</i> y <i>pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	152
Figura 5-6: Estructuras de los ésteres determinados por CG-EM.....	153
Figura 5-7: Comparación de los aldehídos determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de <i>P. djamor</i> y <i>pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	155
Figura 5-8: Estructuras de los aldehídos determinados por CG-EM.....	155
Figura 5-9: Comparación de los compuestos catalogados como otros, determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de <i>P. ostreatus</i> , <i>djamor</i> y <i>pulmonarius</i> obtenidos por FEL con las diferentes FC.....	157
Figura 5-10: Estructuras de los componentes clasificados como otros determinados por CG-EM.....	159
Figura 5-11: Efecto de la fuente de carbono sobre el contenido de EPS para los <i>Pleurotus</i>	160
Figura 5-12: Efecto del contenido de carbohidratos sobre la producción de EPS en <i>Pleurotus</i> obtenidos por FEL.....	162
Figura 6-1: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de <i>P. ostreatus</i>	171
Figura 6-2: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de <i>P. ostreatus</i>	172
Figura 6-3: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de <i>P. djamor</i>	173
Figura 6-4: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de <i>P. djamor</i>	174
Figura 6-5: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de <i>P. pulmonarius</i>	176
Figura 6-6: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de <i>P. pulmonarius</i>	176
Figura 6-7: Influencia del pH en la producción de EPS en <i>Pleurotus</i>	180
Figura 7-1: Respuesta de diferentes hongos a la luz.....	184
Figura 7-2: Morfología de varios hongos en respuesta a diferentes colores de luz.....	189
Figura 7-3: Crecimiento hifal de <i>Pleurotus eryngii</i> en estado sólido bajo diferentes LEDs.....	190
Figura 7-4: Espectros de emisión de los LEDs empleados como elicitores.....	192
Figura 7-5: Efecto de los elicitores sobre el contenido total de esteroides por 100g de extracto en AcOEt para el micelio de <i>P. ostreatus</i> cultivado empleando como FC salvado de trigo.....	196
Figura 7-6: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de <i>P. ostreatus</i>	196
Figura 7-7: Efecto de los elicitores sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de <i>P. pulmonarius</i> cultivado empleando como FC salvado de trigo.....	198
Figura 7-8: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de <i>P. pulmonarius</i>	199
Figura 7-9: Efecto de los elicitores sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de <i>P. djamor</i> cultivado empleando como FC salvado de trigo.....	201
Figura 7-10: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de <i>P. djamor</i>	201
Figura 7-11: Cambios en la producción de EPS con los diferentes LEDs para <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> y <i>P. djamor</i>	204
Figura 8-1: Fructificaciones de <i>Pleurotus djamor</i> , <i>P. ostreatus</i> y <i>P. pulmonarius</i> obtenidas empleando inóculo líquido.....	217

Figura 8-2: Parámetros evaluados para el cultivo de los <i>Pleurotus</i> empleando el producto de la FEL fresco y refrigerado, como inóculo para FES.....	218
Figura 8-3: Tasa de producción calculada para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>pulmonarius</i> y <i>djamor</i> empleando el producto de la FEL fresco y refrigerado como inóculo para FES.....	221
Figura 8-4: Contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de los micelios y las fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> y <i>P. djamor</i>	222
Figura 8-5: Influencia del tipo de fermentación en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto del micelio y las fructificaciones para las tres especies de <i>Pleurotus</i>	223
Figura 8-6: CG del extracto en AcOEt del micelio de <i>P. djamor</i> cultivado con salvado de trigo.....	228
Figura 8-7: CG del extracto en AcOEt de la fructificaciones de <i>P. djamor</i> cultivado con salvado de trigo.....	229
Figura 8-8: CG de las fracciones separadas por cromatografía en columna del extracto en AcOEt del micelio de <i>P. djamor</i> cultivado con salvado de trigo.....	229
Figura 8-9: CG de las fracciones separadas por cromatografía en columna del extracto en AcOEt de la fructificaciones de <i>P. djamor</i>	230

Índice de tablas

Tabla 1-1: Efectos medicinales asociados al género <i>Pleurotus</i>	26
Tabla 1-2: Productos nutraceuticos y nutriceuticos de origen fúngico comercializados en la actualidad	29
Tabla 1-3: Estudios de la influencia de las variables del proceso fermentativo en la producción de <i>Pleurotus</i>	31
Tabla 1-4: Estudios realizados en Colombia sobre la influencia de las variables del proceso fermentativo en la producción de <i>Pleurotus</i>	32
Tabla 2-1: Obtención de triterpenoides mediante fermentaciones.....	55
Tabla 2-2: Fragmentaciones características en espectrometría de masas para los compuestos determinados en los blancos de las FC.....	64
Tabla 2-3: Compuestos triterpenoidales determinados en los blancos del proceso y en las harinas.....	64
Tabla 2-4: Fragmentaciones características en espectrometría de masas para los compuestos determinados en los micelios de <i>Pleurotus</i> cultivados con las diferentes FC.....	70
Tabla 2-5: Compuestos triterpenoidales determinados en los extractos de los micelios de <i>Pleurotus</i> cultivados por FEL empleando fuentes de carbono no convencionales.....	72
Tabla 2-6: Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de <i>P. ostreatus</i>	72
Tabla 2-7: Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de <i>P. djamor</i>	73
Tabla 2-8: Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de <i>P. pulmonarius</i>	74
Tabla 3-1: Métodos de extracción, separación e identificación empleados para el estudio de las estatinas	87
Tabla 3-2: Condiciones ensayadas para la optimización de la hidrólisis de LOVL.....	89
Tabla 3-3: Porcentaje de hidrólisis obtenidas con los métodos evaluados para la conversión de LOVL-LOVH.....	92
Tabla 3-4: Determinación de la relación lineal entre la concentración y el área de los analitos estudiados.....	96
Tabla 3-5: Determinación de la sensibilidad del método.....	96
Tabla 3-6: Determinación de la exactitud del método.....	97
Tabla 3-7: Determinación de la precisión del método.....	97
Tabla 4-1: Variables estudiadas en los procesos fermentativos para optimizar la obtención de estatinas en micromicetos.....	104

Tabla 4-2: Medios de cultivo utilizados para la producción de lovastatina por FEL con hongos micromicetos.....	106
Tabla 4-3: Medios de cultivo utilizados para la producción de lovastatina por FEL de <i>Pleurotus</i>	108
Tabla 4-4: Relación entre la producción de biomasa y la biosíntesis de lovastatina en <i>Pleurotus</i>	109
Tabla 4-5: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidos por FEL.....	129
Tabla 4-6: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de <i>Pleurotus pulmonarius</i> obtenidos por FEL.....	130
Tabla 4-7: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de <i>Pleurotus djamor</i> obtenidos por FEL.....	131
Tabla 5-1: Producción de ácidos grasos del genero <i>Pleurotus</i> mediante el empleo de FC tradicionales y no convencionales.....	149
Tabla 5-2: Contenido de EPS reportado en literatura para especies del género <i>Pleurotus</i>	161
Tabla 5-3: Cantidades reportadas en literatura de los principales monosacáridos presentes en las FC empleadas para las FEL de <i>Pleurotus</i>	162
Tabla 6-1: Estudios relacionados con el efecto de cambios en el pH en procesos fermentativos empleando hongos.....	168
Tabla 6-2: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de <i>P. ostreatus</i>	172
Tabla 6-3: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de <i>P. djamor</i>	175
Tabla 6-4: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de <i>P. pulmonarius</i>	177
Tabla 7-1: Materiales más comúnmente empleados en los chips de LEDs y color de luz emitida.....	186
Tabla 7-2: Estudios relacionados con el uso de LEDs en biotecnología fúngica.....	188
Tabla 7-3: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de <i>P. ostreatus</i>	193
Tabla 7-4: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de <i>P. pulmonarius</i>	197
Tabla 7-5: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de <i>P. djamor</i>	200
Tabla 7-6: Resumen del efecto de los diferentes LEDs empleados sobre la composición de los micelios y los caldos agotados para las tres especies de <i>Pleurotus</i>	202
Tabla 8-1: Comparación entre FEL y FES.....	211
Tabla 8-2: Comparación de los procesos de FES y FEL para la obtención de productos de interés comercial y/o farmacéutico en hongos.....	212
Tabla 8-3: Reportes en literatura de la eficiencia biológica para el cultivo de <i>Pleurotus</i> empleando inóculo líquido.....	219

Tabla 8-4: Influencia del tipo de fermentación en la composición porcentual de los componentes minoritarios presentes en el extracto del micelio y las fructificaciones obtenidas con inóculo líquido fresco y refrigerado para las tres especies de <i>Pleurotus</i>	226
Tabla 8-5: Composición por áreas relativas de los sustratos agotados empleados para las FES de los <i>Pleurotus</i> utilizando inóculo líquido.....	227

Introducción

En las últimas décadas se ha retomado con gran interés el concepto de alimento funcional que no es otra cosa que aquel que, dado sus componentes, tiene la capacidad no solo de nutrir sino de prevenir y/o tratar diferentes enfermedades. No se puede hacer alusión a esta clase de alimento sin introducir los conceptos de nutraceutico y nutriceutico. Se da la definición de nutraceutico a aquel alimento que puede ser consumido como parte de la dieta y que a la vez aporta nutrientes al organismo ayudando a prevenir la aparición de diferentes dolencias. El termino nutriceutico, que para el caso particular de la investigación fúngica, se utiliza para denominar los compuestos que han sido extraídos tanto de la seta como del micelio vegetativo, sin purificación ni separación de los mismos (extractos concentrados o liofilizados) y que por sus cualidades tanto medicinales como nutricionales se consumen como suplementos a la dieta normal. Los metabolitos de los nutriceuticos exhiben actividades biológicas tales como hipotensora, hipocolesterolemica, antibiôtica, antiinflamatoria, entre otras.

En este orden de ideas los hongos constituyen el alimento funcional por excelencia, debido a que además de tener propiedades nutraceuticas, muchos de los compuestos presentes en ellos conforman una amplia variedad de nutriceuticos. Sin embargo, una de las necesidades apremiantes cuando se trata de aprovechar este carácter multifuncional de los macrohongos es el hecho de contar con una buena producción de biomasa con la cual realizar los estudios químicos y farmacológicos. Si bien es cierto que este aspecto se ha contemplado con cierta profundidad en el caso de los micromicetos no es así para los macromicetos. En estos últimos se reportan pocas investigaciones y todas centradas en la producción de aquellos compuestos cuya aplicación se está implementando actualmente como coadyuvantes en la terapia anticáncer, como son los β - glucanos y los terpenoides tipo ácidos ganodéricos. El direccionamiento hacia estos metabolitos ha dejado de lado el estudio y por ende el potencial aprovechamiento de otros, dentro de los cuales están los triterpenoides y las estatinas, entre otros, poseedores de acciones biológicas comprobadas como son la antibiôtica, inmunoestimuladora e hipocolesterolemica.

Es así como surge la necesidad de realizar estudios de bioactivos de macromicetos comestibles, que por su naturaleza no presentan toxinas, las que se constituyen en contaminantes no deseados y difíciles de eliminar, con el objetivo de conseguir un protocolo de producción que permita llegar a la obtención de un producto que se posicione como una fuente eficiente en la biosíntesis de estos bioactivos y que además sea buen aportante de nutrientes. En respuesta a esta problemática se plantea la presente investigación con el objetivo de utilizar a la biotecnología como una herramienta para lograr la obtención de un hongo “mutante”, no en el sentido de cambios genéticos, sino en aumento en la biosíntesis de un grupo de metabolitos en particular. La selección lógica del proceso biotecnológico a emplear no es otra que la fermentación en estado líquido (FEL), la cual permite un control mucho más fácil de las variables del proceso, lo que conllevaría, mediante el estudio de la incidencia producida por variaciones en las fuentes de carbono, el pH y el uso de diodos emisores de luz (LEDs) como elicitores, a determinar cómo se afecta la producción de biomasa y de bioactivos, específicamente de triterpenoides y de estatinas, metabolitos éstos que, como se indicó anteriormente, revisten un importante valor a nivel farmacológico.

Para abordar lo planteado se hace necesario iniciar con el estudio de la incidencia que la fuente de carbono empleada podría presentar sobre la producción de biomasa, debido a que si se mira hacia la bioprospección la eficiencia del proceso es fundamental. Pero, dado que esta eficiencia debe presentar un equilibrio entre producción de biomasa y biosíntesis de bioactivos, el paso a seguir es el estudio químico de los compuestos de interés producidos con las diferentes fuentes de carbono, con la finalidad de determinar cómo las mismas son capaces de activar las rutas biosintéticas en el hongo, tanto en lo referente a cantidad como a variedad estructural de los mismos. De los resultados obtenidos se podrá determinar la(s) fuente(s) que proporcionan la mejor producción de los bioactivos de interés permitiendo así el manejar variables del proceso para optimizar la producción de los metabolitos objeto de estudio. Una de las variables determinantes es el pH inicial de la fermentación por lo que la modificación del mismo se convierte en una opción a explorar, con miras a la determinación del valor óptimo que conlleve a la consecución del objetivo primordial. Así mismo, y dado que la íntima relación existente entre el metabolismo secundario y la respuesta de defensa de los organismos está totalmente reconocida; y que éstos responden al estrés producido por factores tanto bióticos como abióticos activando sus mecanismos de defensa, dentro de los cuales se encuentra la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, se empleará la herramienta biotecnológica de la elicitación, utilizando para ello los elicitores abióticos conocidos como LEDs.

Como bien se dijo anteriormente lo que se busca en un cultivo biotecnológico es una buena eficiencia del proceso. Sin embargo, no se debe dejar de lado el costo del mismo y es aquí donde se hace latente

la preocupación de los diferentes investigadores en el área, como es el alto costo de los procesos cuando se lleva a cabo el escalamiento de los mismos. Una posible solución a este problema está en tratar de encontrar nuevos medios de cultivo en reemplazo de los comúnmente empleados, en los que las fuentes de carbono más usuales están constituidas por glucosa, maltosa, galactosa y lactosa, que incrementan los costos de obtención de biomasa micelial y de bioactivos. Con el fin de aportar resultados que puedan eventualmente dar solución en este aspecto y partiendo de lo reportado para *Grifola frondosa* y para *Ganoderma lucidum*, se abordó la realización del cultivo de los macromicetos seleccionados empleando fuentes de carbono no convencionales, como son las harinas de cereales, de leguminosas y el salvado de trigo, para poder determinar si el comportamiento es similar cuando se cultivan biotecnológicamente otros géneros de hongos medicinales o si por el contrario el comportamiento es género-dependiente. Los hongos seleccionados para el presente estudio corresponden a tres especies del género *Pleurotus*, basidiomicetos que recientemente han despertado el interés científico por sus cualidades nutricionales y medicinales y que han sido objeto de análisis dentro del Grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos desde hace algunos años, arrojando interesantes resultados que incentivan continuar con su estudio. Con los resultados obtenidos se está aportando en gran medida a la biotecnología en cuanto a la disminución de los costos del proceso fermentativo.

Otra necesidad real que se presenta en la producción comercial de *Pleurotus* por fermentación en estado sólido (FES), es la generación de “semilla” convirtiéndose en un aspecto medular que requiere atención debido a que representa un cuello de botella en el proceso de obtención de cuerpos fructíferos y es por ello que se necesita la implementación de tecnologías que permitan la generación de “semilla” de buena calidad. Una alternativa es la utilización de micelio crecido en medio líquido, que por el proceso mismo permitirá producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favoreciendo la adaptación y dispersión del hongo en el sustrato y facilitando su manipulación durante la siembra. Con la finalidad de encontrar solución a este problema y como complemento al cultivo en medio sumergido de los *Pleurotus*, se desarrolló una segunda fase en la cual se evaluó la viabilidad del empleo del producto biotecnológico total como inóculo líquido en la obtención de fructificaciones de estos hongos, teniendo en cuenta que los mismos se están posicionando en el campo de los alimentos funcionales tanto a nivel nacional como internacional.

Glosario

Ascocarpo:	cuerpo fructífero en los ascomicetos que lleva las ascas.
Basidiosporas:	semilla de los hongos que se desprende de los basidios cuando éstos están maduros.
Biorreactor:	sistema que provee un ambiente reproducible, óptimo y automatizado de todas las variables en un cultivo biotecnológico.
Caducifolio:	del latín decidere, caer. Dícese de los árboles o arbustos que pierden sus hojas durante una parte del año, la cual coincide en los climas templados o polares con la llegada del invierno, la época más desfavorable
Carpóforo:	aparato reproductor del hongo visible a simple vista (generalmente llamada seta) en oposición a su micelio, que se encuentra dentro del sustrato.
Conidias:	son esporas asexuales no móviles, que se forman (exógenamente) en el ápice o en el lado de una célula.
Conidióforos:	hifa que porta células conidiógenas productoras de conidias
Cuerpo fructífero:	también conocido como esporocarpo o fructificación, es una estructura multicelular sobre la que se forman otras estructuras productoras de esporas, como los basidios o ascos. El cuerpo fructífero de un Basidiomycota se conoce como un basidiocarpo, mientras el de un Ascomycota se conoce como un ascocarpo.
Elicitores:	de manera genérica se pueden definir a los elicitores como aquellos factores que pueden estimular la producción de ciertos metabolitos.
Esporangio:	estructura en forma de saco que contiene esporas.
Esporangioforos:	hifa que lleva uno o varios esporangios.
Esporas:	células especializadas producidas por el hongo, que son dispersadas principalmente por el viento y el agua y forman parte de la fase reproductiva del mismo.
Fotorreceptor:	cromoproteínas, proteínas unidas a compuestos generalmente de bajo peso molecular que absorben la luz.

Fructificación:	es una estructura multicelular sobre la que se forman otras estructuras productoras de esporas, como los basidios o los ascos. También llamado esporocarpio, cuerpo fructífero o cuerpo de fructificación.
Himenóforo:	parte del hongo donde nacen las esporas; por ejemplo, láminas, tubos, espinas, dientes, pliegues, etc.
Inóculo:	suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través del proceso de inoculación.
LED:	diodo emisor de luz
Micelio:	fase vegetativa de los hongos, formada por una masa de hifas que se desarrolla sobre el sustrato.
Pantropical:	organismo que debe aparecer en regiones tropicales en todos los continentes mayores para las plantas, la estación más fría.
Pellet:	anglicismo, denominación genérica utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido.
Peritecio:	ascocarpio cerrado y con un poro en la parte superior.
Pie:	también conocido como estípito. Soporte que sostiene el carpóforo o cuerpo fructífero de la seta.
Protoperitecio:	peritecio sin fertilizar o simplificado
Sustrato:	superficie sobre la cual se desarrollan los hongos.

**CAPITULO 1. INCIDENCIA DE FUENTES DE
CARBONO NO CONVENCIONALES SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Pleurotus*
OBTENIDO POR FERMENTACIÓN EN
ESTADO LÍQUIDO**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AV	Harina de avena
AZ	Harina de arroz
BT	Bienestarina
CB	Harina de cebada
EPS	Exopolisacáridos
FC	Fuente de carbono
FEL	Fermentación en estado líquido
FN	Fuente de nitrógeno
IPS	Intrapolisacáridos
MA	Harina de maíz amarillo
MP	Harina de maíz pinto
MZ	Harina de maíz
SG	Harina de siete granos
ST	Salvado de trigo
SY	Harina de soya
TI	Harina de trigo integral
TR	Harina de trigo

1.1. ANTECEDENTES

La producción biotecnológica de hongos es un campo que envuelve diferentes áreas de la ciencia que abarca desde la biología, la agronomía, la química, pasando por la biotecnología, la química farmacéutica e incluso la medicina. La intervención de una, dos o más, e incluso de todas estas ramas, depende del objetivo de la investigación, pero uno de los parámetros más importantes que se debe tener en cuenta, independiente del propósito, es la cantidad de biomasa generada a través de un determinado proceso de cultivo (2). Los investigadores dedicados a la producción fúngica consideran esta variable como la más importante para lograr un proceso productivo que pueda ser catalogado como eficiente o no. Sin embargo, estudios recientes relacionados con el tema llevan a concluir que no es una generalidad la relación directa entre la producción de biomasa y la de metabolitos tanto primarios como secundarios, y a la vez, todos estos comportamientos dependen del microorganismo, del medio de cultivo, de las condiciones ambientales, del tipo de proceso empleado (3) y de otras variables que se describirán a lo largo de este capítulo y se discutirán con mayor profundidad en el capítulo 2.

Uno de los factores que actualmente es tema de investigación prioritario en macrohongos con potencial nutriceútico es el de optimizar el proceso de obtención de biomasa, haciendo necesaria la realización de estudios tendientes a analizar la incidencia del medio de cultivo en la producción tanto de micelio como de bioactivos, cuando se emplean fermentaciones en estado líquido (FEL). Estos medios abarcan una amplia variedad dependiendo de la complejidad de su composición pero teniendo siempre como requisito la presencia de una fuente de carbono (FC), una fuente de nitrógeno (FN) y una mezcla de sales. Los cereales y sus subproductos son una FC no convencional que ha sido empleada recientemente para el cultivo de hongos con excelentes resultados en términos de la producción de polisacáridos y de biomasa en *Ganoderma lucidum* y en *Grifola frondosa* (4, 5), pero no ha sido explorada en especies del género *Pleurotus*, particularmente enfocado en su incidencia en la producción de biomasa y en la composición del producto biotecnológico obtenido.

En esta primera parte de la investigación se plantea como objetivo principal evaluar la aplicabilidad y la incidencia sobre la producción de biomasa del uso de harinas de cereales como FC para la producción por FEL de tres especies del género *Pleurotus*, con miras a realizar procesos fermentativos de menor costo aprovechando la facilidad de su consecución, lo que a su vez permitirá seleccionar la(s) FC que potencialmente proporcione (n) una mayor producción de metabolitos secundarios, aumentando así el valor nutriceútico de los hongos cultivados.

1.1.1. Generalidades de los *Pleurotus*

1.1.1.1. Biología del género: características morfológicas

Los hongos del género *Pleurotus* también conocidos como hongos ostra u orellanas, son especies generadoras de pudrición blanca en la madera, término que hace alusión al color que produce sobre ésta cuando la utiliza como medio de cultivo degradando sus componentes lignocelulósicos (6). De manera silvestre aparecen en racimos sobre árboles muertos, desde el otoño tardío hasta la primavera en países con estaciones y están distribuidos alrededor de casi todo el mundo. Las especies pertenecientes a este género son comestibles y gastronómicamente de primera calidad. Su color es blanco o castaño, aunque hay variedades azuladas y rosadas, con carne compacta en el carpóforo, fibrosa y blanca en el estípite, sabor y olor agradable (7). Su carpóforo es redondeado, con la superficie lisa, abombada y convexa en su juventud, aplanándose luego poco a poco. Tienen un diámetro que oscila entre 5 y 15cm, dependiendo de la edad y un himenóforo constituido por laminillas dispuestas radialmente, que van desde el pie que lo sostiene hasta el borde, las cuales son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Las esporas son pequeñas, oblongas, casi cilíndricas y su esporada es de color blanco con cierto tono grisáceo. El pie suele ser corto, lateral oblicuo, ligeramente duro, blanco y con el principio de las laminillas en la parte de arriba (8).

En relación a las tres especies objeto de este estudio, el *Pleurotus djamor* (Figura 1-1) es un hongo con distribución pantropical que crece de manera natural sobre troncos de varios árboles en proceso de descomposición. Esta especie se encuentra con frecuencia en zonas cálidas de África, América, Asia y Australia y su consumo se restringe a ejemplares silvestres debido a que su cultivo comercial es aún incipiente (9).

El *Pleurotus pulmonarius* (Figura 1-1) también conocido como Usuhiratake, es una variante de la seta ostra *Pleurotus ostreatus*, y sus fructificaciones se dan a temperaturas más altas por lo que es llamada Seta ostra de verano. Sus propiedades son muy parecidas a las del género anterior, por lo que también es catalogado como comestible. En cuanto al *Pleurotus ostreatus* este tiene una coloración variable, marrón grisáceo en las formas más típicas, a veces gris azulado o crema (Figura 1-1). Su carne es de olor agradable, de buena comestibilidad y es tradicionalmente cultivada con fines comerciales. Se puede confundir con otras especies de su género como *Pleurotus pulmonarius*, de color casi blanco o el *Pleurotus cornucopiae* con pie más desarrollado y láminas decurrentes, ambas comestibles. Vive sobre troncos o madera muerta de diversos árboles caducifolios como hayas, robles o chopos y raramente sobre coníferas. Aparece formando grupos comprimidos entre la

primavera y finales de otoño, pudiendo fructificar varias veces si las condiciones son propicias (<http://www.erotari.com/Micologia/especie.php?664>).

Figura 1-1: Ejemplares de *Pleurotus djamor*, *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus ostreatus*.



1.1.1.2. Farmacología de los *Pleurotus*

Desde hace más de cincuenta años se vienen realizando investigaciones en torno a la actividad biológica de las especies de este género. Kavanagh et. al en 1951 reportaron el aislamiento de Pleuromutilina de *Pleurotus mutilus* y *P. passeckerianus*, un antibiótico usado para el tratamiento de infecciones micoplasmáticas en animales y que sirvió para el desarrollo del primer medicamento comercial de este tipo de origen de un basidiomiceto (10). A partir de este descubrimiento se empezaron a realizar trabajos en este campo, arrojando como resultado la determinación de diferentes acciones tanto para extractos crudos de los micelios y de las fructificaciones, como para los compuestos aislados de ellos (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Efectos medicinales asociados al género *Pleurotus*

EFECTO MEDICINAL	ESPECIE	SUSTANCIA O PARTE DEL HONGO	REF.	
Antibiótico	<i>ostreatus</i>	Micelio Polisacáridos	(11, 12)	
	<i>japonicus</i>	Micelio	(13)	
Antibacterial	<i>ostreatus</i> <i>spp</i>	β -D-glucanos	(11)	
	<i>florida</i>	Extracto metanólico y acuoso	(14)	
	<i>sajor-cajú</i>	Extractos de diferente polaridad	(15)	
	<i>sajor-cajú</i>	Fructificaciones	(16)	
Antiviral	<i>spp</i> <i>citrinopileatus</i> <i>ostreatus</i>	Polisacáridos Ubiquitina	(11)	
	Inmunomodulador	<i>ostreatus</i>	Glucanos	(11)
		<i>ostreatus</i>	Proteoglicanos	(17)
<i>pulmonarius</i>		Extracto	(18)	
<i>tuber regium</i> , <i>ferulae</i> y <i>pulmonarius</i>		Extractos, triterpenoides y β -glucanos	(19)	
Antiinflamatorio	<i>spp</i>	-----	(11)	

Continuación tabla 1-1: Efectos medicinales asociados al género *Pleurotus*

EFEECTO MEDICINAL	ESPECIE	SUSTANCIA O PARTE DEL HONGO	REF.
Hipocolesterolémico	<i>eryngii</i> <i>ostreatus</i> <i>cornucopiae</i>	Lovastatina Fructificaciones Lovastatina	(11)
	<i>citrinopileatusis</i>	Fructificación	(20)
Hematoglutinante	<i>cornucopiae</i>	Lectina	(11)
Antioxidante	<i>ostreatus</i>	β -D-glucanos	(11)
	<i>florida</i> y <i>sajor-cajú.</i>	Fructificaciones	(21)
	<i>sajor-cajú, euos, platypus</i> y <i>florida</i>	Extracto metanólico	(22)
	<i>citrinopileatus</i>	Extracto etanólico	(23)
Antinociceptivo	<i>ostreatus</i>	Extractos polares	(24)
Hepatoprotector	<i>ostreatus</i>	Extracto etanólico	(25)
Estimula la formación de osteoblastos	<i>eryngii</i>	Extracto acuoso	(26)

Es así como la contribución de los hongos en general, y en el caso particular de las especies del género *Pleurotus*, tanto para el suministro de alimentos, control de la contaminación ambiental, la calidad de la salud y la economía social, está definida por la reunión de las características especiales que ellos exhiben (aportantes de nutrientes y metabolitos biológicamente activos, degradadores por excelencia y fáciles de cultivar); y ha incentivado la búsqueda de procesos más eficientes de cultivo para la obtención, bien sea del cuerpo fructífero, del micelio, del caldo (medio de cultivo agotado) o de los compuestos bioactivos presentes en ellos, con miras a su bioprospección, mediante el empleo de los mismos como alimento funcional o como productor de determinados compuestos que permitan su utilización terapéutica como nutriceúticos.

1.1.2. Carácter nutriceútico de los macrohongos

La investigación científica reciente ha demostrado que los productos nutriceúticos ofrecen una alternativa segura y eficaz a los fármacos tradicionales y son una forma de mantener y mejorar la salud. El término nutriceútico, derivado del inglés nutraceutical (en EE. UU ya es ampliamente aceptado), está comenzando a asentarse en la comunidad médica europea y alude a los productos asociados a la nutrición y la medicina ortomolecular, que consiste en proporcionarles a las células las moléculas o nutrientes adecuados para ayudarles a que funcionen lo más eficientemente posible.

En el caso de los macromicetos el término se utiliza para una nueva clase de compuestos que han sido extraídos tanto del cuerpo fructífero como del micelio. Los nutriceúticos poseen cualidades nutricionales y medicinales como: antitumorales, inmunoestimuladores, hipocolesterolémicos, antibióticos, hipotensivos por citar algunas. En consecuencia, los nutriceúticos de los macrohongos exhiben un gran potencial cuando tomados como suplementos alimenticios, sirven tanto para la prevención como para el tratamiento de varias enfermedades. Un nutriceútico corresponde a un extracto del micelio o del carpóforo, que puede ser purificado hasta cierto grado antes de ser

incorporado en una cápsula o una tableta que se consume como suplemento dietético con propósitos terapéuticos (27-29).

Dentro de los nutriceúuticos de los macrohongos los más utilizados son los obtenidos de *Ganoderma*, sin embargo hongos pertenecientes a otros géneros también biosintetizan compuestos similares que a su vez poseen acción farmacológica. Son estos hongos los que requieren ser estudiados con mayor profundidad, de manera que se pueda acceder a su potencial terapéutico.

Una gran ventaja que presentan los nutriceúuticos, al igual que los nutraceúuticos, frente a los fármacos es la poca probabilidad de efectos tóxicos puesto que son obtenidos de hongos comestibles y/o medicinales, empleados desde hace mucho tiempo en los países orientales para mejorar la salud.

De los estudios realizados sobre *Ganoderma* se ha determinado que los triterpenoides y los polisacáridos son los responsables de los efectos beneficiosos de dicho hongo (30). Sin embargo, no solamente estos compuestos dan el carácter funcional a los hongos. Es así como metabolitos estructuralmente diferentes como los ácidos grasos, polifenoles, lectinas, carotenoides, entre otros (31) aportan en buena medida, dadas sus acciones biológicas, al valor nutriceúutico y nutraceúutico total.

Si bien es cierto que los cuerpos fructíferos se constituyen en materia prima para la extracción de los nutriceúuticos en la actualidad, con el desarrollo de la biotecnología, se han aplicado los procesos fermentativos con la finalidad de aumentar la cantidad de compuestos bioactivos y disminuir tanto el tiempo de su producción como los procesos de su extracción y purificación. La tabla 1-2 presenta algunos de los compuestos nutraceúuticos y nutriceúuticos comercializados en la actualidad, obtenidos a partir de los hongos macromicetos.

En lo referente a la producción biotecnológica de hongos del género *Pleurotus* con la finalidad de aumentar la producción de bioactivos y por ende su carácter nutriceúutico, son pocas las investigaciones al respecto y las mismas están relacionadas principalmente con el empleo de medios alternativos para la producción de polisacáridos antitumorales (32-34), dejando de lado otros metabolitos con potencial terapéutico.

1.1.3. Métodos de producción de hongos

En busca de la producción de cantidades de biomasa suficientes para su comercialización, se han empleado diferentes formas de fungicultura convirtiéndola en una actividad económica de vital importancia para nuestra cultura. Generalmente, se utiliza el cultivo tradicional, basado en medios

de cultivos sólidos, en el cual el objetivo principal es la obtención de cuerpos fructíferos para la comercialización directa, ya sean frescos o deshidratados, y para la producción de suplementos dietarios.

Tabla 1-2: Productos nutraceúticos y nutraceuticos de origen fúngico comercializados en la actualidad (35).

PRODUCTO	USO
<p><i>Ganoderma lucidum</i> Concord Sunchih (1-2 cápsulas dos veces al día para promover la salud; 3 cápsulas tres veces al día durante la enfermedad)</p> <p>GLP (AI), GI</p> <p>Galopy (extracto acuoso) Rare Red Reishi™</p>	<p>Tratamiento de angina de pecho, bronquitis crónica, potenciación de sistema inmune, prevención de eventos cardiovasculares e hipercolesterolemia, promueve la circulación sanguínea y la agregación plaquetaria, protege el hígado, antibiótico y antiinflamatorio.</p> <p>Aumenta la vida útil de las células tumorales implantadas, vasodilatador y acelera la circulación sanguínea.</p> <p>Efecto inmunomodulador.</p> <p>Promueve la buena salud y la longevidad.</p>
<p><i>Lentinus edodes</i> Lentinan</p> <p>LEM y LAP</p>	<p>Agente anticancerígeno (especialmente carcinoma gástrico y colorectal), estimula la producción de linfocitos (asesino natural NK), control de cáncer y otras infecciones.</p> <p>Actividad antitumoral en modelos de xenoinjertos</p>
<p><i>Grigola frondosa</i> Grifon® (extracto líquido) (5 a 6 gotas tres veces al día para la salud general; 11 a 12 gotas tres veces al día para dosis terapéuticas) Maitake Gold 404™ (cápsulas 500mg)</p>	<p>Tomar oralmente y combinar con agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, inmunomodulador.</p> <p>Inhibe la metástasis especialmente la hepática.</p>
<p><i>Agaricus blazei</i> Cápsulas</p>	<p>Mejora el síndrome de fatiga crónica e inmunomodulador, reduce la pérdida de cabello y puede sanar heridas y aclarar problemas de la piel.</p>
<p><i>Cordyceps</i> Didanosine (cápsulas, micelio seco)</p>	<p>Tratamiento para SIDA.</p>
<p><i>Pleurotus spp.</i> Plovatin (extracto micelial)</p>	<p>Inhibe el metabolismo del colesterol en el cuerpo o suplemento dietario para reducir los niveles del colesterol, previene desórdenes cardiovasculares como la aterosclerosis.</p>
<p><i>Tremella mesenterica</i> Tremallastin (extracto micelial)</p>	<p>Modificador de la respuesta inmune, soporta el sistema nervioso, sistemas inmune y hormonal del cuerpo, previene desórdenes cardiovasculares.</p>
<p>Reishi Plus (50% <i>G. lucidum</i> + 50% <i>L. edodes</i>, 200 cápsulas/600mg cada una)</p>	<p>Suplemento dietario diario, buena vitalidad de la salud.</p>
<p>Trimyco-Gen™ (33% <i>C. sinensis</i>, 33% <i>G. lucidum</i> + 33% <i>L. edodes</i>, 100 cápsulas/600mg cada una)</p>	<p>Inmunomodulador, promueve la buena salud y la longevidad.</p>
<p>Mycoplex-7™ (14% <i>C. sinensis</i> + 14% <i>Tremella fuciformis</i> + 14% <i>A. blazei</i> + 14% <i>Coriolus versicolor</i> + 14% <i>Poria cocos</i> + 14% <i>S. commune</i> + 14% <i>Hericiium erinaceous</i>)</p>	<p>Promueve la buena salud</p>
<p>Garden of life (RM-20) (10 hongos medicinales + Aloe vera + <i>Uncaria tomentosa</i>)</p>	<p>Inmunomodulador, regula los niveles de colesterol, actividad antitumoral, tratamiento de enfermedades cardiovasculares, antiviral y antibiótico, protege contra efectos perjudiciales de la radiación, factores anti VIH.</p>

Hoy en día, aunque el cultivo tradicional sigue vigente, se buscan alternativas para obtener biomasa micelial y compuestos bioactivos de manera más rápida y eficiente, recurriendo a técnicas biotecnológicas, para dar respuesta a las necesidades actuales de producción, empleando ya sea la fermentación en estado líquido (FEL) o fermentaciones en estado sólido (FES) (36).

La FEL o fermentación sumergida es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de medio de cultivo sólido (nutrientes) en el proceso, es decir, que hay una solución de los nutrientes. En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, cuando hay agitación estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas «pellets», y sin ella crecen en la superficie. La principal diferencia con la FES radica en que el crecimiento de los hongos filamentosos en esta última, se efectúa en un medio de cultivo sólido cercano a la ausencia de agua, pero con la suficiente presencia de esta para soportar el crecimiento y el metabolismo. El primer tipo de fermentación es el más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse más variables que en la FES y el producto final es fácil de recuperar (37).

1.1.3.1. Efecto de los diferentes factores sobre una fermentación

En una fermentación de interés económico o científico, se deben conocer una serie de factores y estudiar la influencia de los mismos en la obtención del producto biotecnológico para lograr un buen control y manipulación del proceso, en aras de la mayor eficiencia. Algunas de estas variables han de medirse de manera continua, mientras que otras se miden a ciertos intervalos de tiempo. A las primeras corresponden temperatura, velocidad de agitación, presión, consumo y cantidad de oxígeno disuelto, adición de nutrientes y pH, mientras que en las de medición intermitente están biomasa, producto y consumo del medio de cultivo. Existen otras clasificaciones en las cuales estas variables se agrupan como factores químicos (pH, composición del medio, contenido de oxígeno), biológicos (tipo de inóculo, cepa, concentración del inóculo) y físicos (temperatura, fuerzas mecánicas) o los relacionados con la composición del medio (FC, FN, relación C:N, adición de vitaminas), factores ambientales (pH, temperatura, oxigenación, agitación) y factores dependientes de las cepas (tipo de cepa, tipo y concentración de inóculo) (38). El control de estas condiciones afecta tanto cualitativa como cuantitativamente los productos obtenidos. Para nombrar un ejemplo, Lee y colaboradores en 2007, teniendo en cuenta que para *Ganoderma applanatum* la producción de exopolisacáridos (EPS) a partir del micelio es más eficiente que desde el cuerpo fructífero, analizaron la influencia del periodo de cultivo, la temperatura, la concentración de glucosa y diferentes fuentes de carbono, tanto en la producción de biomasa micelial como en la de los polisacáridos, encontrando resultados tan

interesantes como que la producción de EPS se ve más afectada por la concentración de carbono y la de intrapolisacáridos (IPS) por la concentración de nitrógeno en el medio (39).

Las variables más importantes a tener en cuenta en un proceso fermentativo se describirán detalladamente en el capítulo 2.

1.1.4. Fermentaciones con *Pleurotus*

Las especies pertenecientes al género *Pleurotus* han despertado el interés de la comunidad científica debido a sus cualidades tanto nutricionales (40-42) como medicinales (17, 43) que unidas a la facilidad de su cultivo (44, 45) han incentivado las investigaciones en diferentes ramas de la ciencia generando un incremento considerable en el número de publicaciones relacionadas con los procesos que involucran la obtención de estas especies de hongos de una forma fácil, rápida y eficiente.

Tienen la particularidad de poseer un gran espectro enzimático, hecho que los ha llevado a ser catalogados como los macromicetos que pueden utilizar el mayor número de sustratos para su cultivo, con eficiencias biológicas superiores al 100% y requerimientos nutricionales simples para su desarrollo.

Las investigaciones reportadas sobre su producción biotecnológica se centran en el estudio de la influencia de algunas variables del proceso en la obtención tanto de biomasa como de metabolitos. Las tablas 1-3 y 1-4 ilustran, de manera resumida, los resultados de los estudios más relevantes en el ámbito internacional y a nivel nacional respectivamente.

Tabla 1-3: Estudios de la influencia de las variables del proceso fermentativo en la producción de *Pleurotus*.

ESPECIE	OBJETIVO	VARIABLE ESTUDIADA	REF.
<i>tuber-regium</i>	Biomasa	Cantidad de inóculo, duración de la fermentación, fuentes de C y N.	(46)
<i>tuber-regium</i>	Biomasa, fibra dietaria, monosacáridos	Relación C:N	(47)
<i>Ostreatus</i>	Biomasa	Concentración de glucosa, agitación, aireación y geometría del pellet	(48)
<i>dryinus</i>	Producción de enzimas	Residuos agrícolas como sustrato	(49, 50)
<i>sajor-cajú</i>	Contenido proteico	pH	(51)
<i>ostreatus</i> y <i>cornucopiae</i> var <i>citrinopileatus</i>	Producción de lípidos polares y no polares	Temperatura	(52)
<i>ostreatus</i>	Biomasa	Suplementación de nitrógeno	(53)
<i>spp</i>	Calidad nutricional y producción de metabolitos secundarios	Sustratos	(54)
<i>ostreatus</i>	Biomasa	Influencia de agitación, aireación y geometría del impulsor de un bioreactor	(48)

Continuación tabla 1-3: Estudios de la influencia de las variables del proceso fermentativo en la producción de *Pleurotus*.

ESPECIE	OBJETIVO	VARIABLE ESTUDIADA	REF.
<i>ostreatus</i>	Producción de enzimas	Sustrato	(55)
<i>pulmonarius</i> y <i>ostreatus</i>	Obtención de fructificaciones	Preparación y formulación del sustrato	(56)
<i>ostreatus</i>	Biomasa y actividad antioxidante	Fuentes de N y de C	(57)
<i>mutilus</i>	Producción de pleuromutilina	Estudios cinéticos	(10)
<i>ostreatus</i> , <i>eryngii</i> y <i>pulmonarius</i>	Producción de biomasa	Residuos agroindustriales	(58)
<i>ostreatus</i> , <i>eryngii</i> , <i>serotinus</i> y <i>sajor-cajú</i>	Producción de alimento para animales	Residuos agroindustriales	(11)
<i>ostreatus</i>	Biomasa y glucanos	Fuentes de C	(59)

Tabla 1-4: Estudios realizados en Colombia sobre la influencia de las variables del proceso fermentativo en la producción de *Pleurotus*.

ESPECIE	OBJETIVO DEL ESTUDIO	REF.
<i>cepentipes</i> , <i>djamour</i> y <i>spp</i>	Clasificación	(60)
<i>ostreatus</i>	Producción de sustitutos cárnicos	(61)
<i>sajor-cajú</i>	Evaluación de eficiencia biológica	(62)
<i>ostreatus</i> , <i>pulmonarius</i> y <i>sajor-cajú</i>	Determinación de la capacidad de síntesis de proteína utilizando residuos de la industria licorera	(63)
<i>ostreatus</i>	Consecución de medios alternativos para propagación	(64)
<i>ostreatus</i>	Producción de biomasa empleando residuos de ají	(65)
<i>ostreatus</i>	Producción de biomasa empleando residuos de la industria maderera y cocotera	(66)
<i>ostreatus</i>	Producción de biomasa empleando residuos de la industria agrícola	(67-69)
<i>ostreatus</i>	Obtención de alimento funcional enriquecido con calcio, selenio y vitamina C	(70)
<i>ostreatus</i>	Obtención de enzimas empleando residuos de palma	(71)
<i>ostreatus</i>	Determinación de la influencia de diferentes empaques y atmósferas sobre las propiedades fisicoquímicas de las fructificaciones	(72)
<i>ostreatus</i>	Producción de lacasas empleando cáscara de plátano	(73)

1.1.5. Medios de cultivo tradicionales y no convencionales empleados para la producción biotecnológica de *Pleurotus*

Los requerimientos nutricionales necesarios para el correcto desarrollo de un hongo, independientemente del tipo de fermentación empleado, son suministrados por el medio de cultivo y como se mencionó anteriormente siempre deben incluir una FC y una FN. Dentro de los componentes utilizados para el cultivo de *Pleurotus* empleando este tipo de fermentaciones, se incluyen como FC diferentes carbohidratos como glucosa, xilosa, galactosa, fructosa (59, 74), glicerol, etanol (49) y extracto de malta (57), entre otros. Con respecto a las FN se utilizan extracto de levadura, caseína, peptona (57, 75), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 y licor de maíz (76, 77). Como medios no convencionales se han reportado el almidón de maíz, residuos agrícolas como cáscaras

de mandarina y aserrín de vid, aguas residuales del tratamiento de la pulpa de café y de la obtención del aceite de oliva (43, 49, 77).

Un amplio porcentaje de los estudios realizados con *Pleurotus* se han centrado en la producción de biomasa y en la búsqueda de la optimización del proceso. Para determinar la calidad del método o del medio de cultivo utilizado, la cantidad de biomasa obtenida es la variable por excelencia que se debe evaluar.

1.1.6. Técnicas para la determinación de biomasa

La cantidad de biomasa es un parámetro esencial en estudios cinéticos y de crecimiento, muy útil para caracterizar las condiciones óptimas de obtención y esporulación en diferentes hongos durante FEL y FES. En este último tipo de procesos fermentativos se dificulta realizar una medida directa de la biomasa micelial, debido a que el hongo penetra y se adhiere fuertemente a las partículas del sustrato sólido. Por esta razón se han descrito diferentes métodos para la estimación indirecta de la biomasa producida que pueden ser clasificados en tres categorías: a) métodos en los que se miden constituyentes celulares como la quitina, ergosterol, ácidos nucleicos y más clásicamente la proteína por el método de Kjeldahl; b) métodos que miden una actividad biológica (ATP), actividad enzimática, o actividad inmune; y c) métodos que miden el consumo de nutrientes (78). La determinación del contenido de quitina es una técnica indirecta que ha sido empleada con un amplio rango de medios de cultivos sólidos. Es un procedimiento basado en la depolimerización del compuesto bajo condiciones alcalinas, cuantificando posteriormente la glucosamina resultante colorimétricamente. Sin embargo, esta metodología ha sido criticada debido a que conlleva importantes fuentes de error, como es la tendencia a la variación del contenido de quitina con la edad y la presencia de hexosaminas extrañas en el medio de cultivo, que generan interferencias en el ensayo. El contenido de ergosterol, considerado como el esteroide predominante de los hongos, puede ser calculado por sus características de absorbancia al UV, sin embargo esta técnica solo es aplicable a los hongos catalogados como verdaderos, ya que los hongos como los pertenecientes a los *Oomycetes* no sintetizan el triterpenoide. Con respecto a los métodos que miden una actividad biológica, se basan en el conocimiento de que las lacasas extracelulares y las estereasas están relacionadas con el crecimiento fúngico (79). Más recientemente se han reportado técnicas como el empleo del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), catalogado, para algunos hongos como el *Aspergillus niger* (80), como una técnica sensible y específica para la determinación de biomasa obtenida por FES, en la que se cuantifica la reactividad del anticuerpo a la pared celular del micelio creciente, cuyos componentes se sabe que no dependen de las condiciones de crecimiento.

Estas metodologías igualmente son aplicables a FEL, haciendo necesario un proceso de filtración con el que se separa el micelio del medio agotado y se realizan los procedimientos particulares de cada determinación. No obstante, el cálculo de masa seca de micelio obtenido por FEL es la técnica predilecta para conocer la cantidad de biomasa obtenida a través de estos procesos, debido a que elimina los errores antes descritos que se pueden derivar del proceso.

1.2. METODOLOGÍA

1.2.1. Obtención del material fúngico

El material fúngico fue cultivado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Antioquia. Las cepas de *Pleurotus ostreatus* (BioVeg Fungi-002), *Pleurotus pulmonarius* (BioVeg Fungi-001) y *Pleurotus djamor* (BioVeg Fungi-005), provenientes del cepario de dicho laboratorio, se mantuvieron en Agar Papa Dextrosa y se almacenaron a 4°C (cepas de trabajo, primer repique de una cepa madre). Luego, inóculos de 0.5 a 1 cm de diámetro de micelio y agar fueron transferidos a cajas de Petri con el medio de la siguiente composición (g/L): harina de cereal 30; extracto de levadura 3, sacarosa 5, agar 8, pH a 5.5 ± 0.1 . Los cultivos fueron incubados a 26°C, en la oscuridad por 15 días. Las harinas de cereales empleadas corresponden a: harina de cebada (*Hordeumvulgare* L) (**CB**), harina de avena (*Avena sativa* L) (**AV**), harina de trigo (*Triticumaestivum* L) (**TR**), harina de arroz (*Orzya sativa* L) (**AZ**), bienestarina (**BT**), harina de maíz (*Zea mays* L) (**MZ**), harina de soya (**SY**), salvado de trigo (**ST**), harina de trigo integral (**TI**), harina de maíz pinto (**MP**), harina de siete granos (**SG**) y harina de maíz amarillo (**MA**).

Posteriormente en matraces de 250mL, 62 mL de medio de cultivo con la composición de sales siguiente: NaNO₃ 80 mg/L, MgSO₄.7H₂O 20 mg/L, KH₂PO₄ 30 mg/L, KCl 10 mg/L, fueron suplementados con 30g/L de las harinas de las doce FC. Se ajustó el pH a 5.6 ± 0.1 y se esterilizó en autoclave a 15 psi y 121 °C por 15 minutos. Como inóculo se utilizaron discos de 1 cm de diámetro con micelio y agar. Los matraces se llevaron a un agitador orbital a 100 rpm, durante 9 días a 25 °C ± 1 .

1.2.2. Determinación de la biomasa

La determinación de la cantidad de biomasa obtenida en cada ensayo se realizó filtrando con un tamiz de malla N°35 y lavando con agua destilada. Posteriormente sobre una caja de Petri se depositó la biomasa que fue posteriormente cubierta con papel parafilm, y llevada a sequedad en un horno de convección a 70°C hasta peso constante. Los pesos fueron registrados y se tomó como unidad experimental el promedio obtenido de la biomasa de los erlenmeyers con igual tratamiento. Estos

ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Antioquia, por triplicado y en días diferentes.

1.2.3. Análisis bromatológico de las fuentes de carbono

El contenido de C y N se calculó en un equipo Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer. Los lípidos, cenizas y materia seca se determinaron siguiendo las normas AOAC (81). En cuanto a los carbohidratos fueron extraídos con agua caliente y el extracto acuoso posteriormente enfriado en nevera y precipitado con etanol frío, expresando su contenido como el porcentaje en base seca (82).

1.2.4. Análisis estadístico

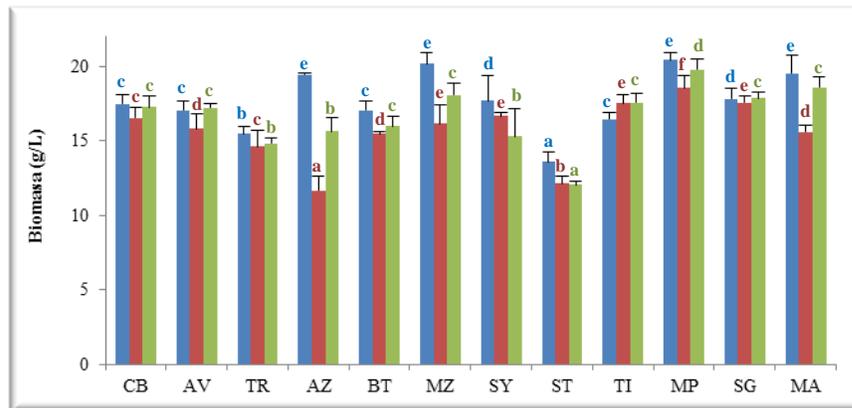
Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis multivariante con el programa Statgraphics 5.1, con base en los resultados de los triplicados realizados para cada caso.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del uso de las diferentes harinas de cereales, que en adelante se denotarán como FC, sobre la producción de biomasa se encuentra representado en la figura 1-2. De su análisis se deduce que el comportamiento es similar para *P. djamor* y *P. ostreatus* el ser cultivadas con salvado de trigo, obteniendo los valores más bajos de biomasa, que para el caso del *P. pulmonarius* se produce con la harina de arroz. La FC más eficiente, en términos de esta variable, es el maíz pinto para las tres especies, acompañado por las harinas de maíz, maíz amarillo y arroz para el caso del *P. ostreatus*. Las diferencias más notorias entre especies se evidencian en el comportamiento usando la harina de arroz, con la que la producción de biomasa es la más baja para *P. pulmonarius*, la intermedia para *P. djamor* y la más alta para el caso del *P. ostreatus*. El efecto más marcado del cambio de las harinas se observa para la especie *P. pulmonarius* que genera, en términos estadísticos, seis grupos homogéneos diferentes, mientras que para el caso del *P. ostreatus* y del *P. djamor* son cinco y cuatro grupos respectivamente.

De igual forma del análisis de la figura 1-2, se puede concluir que en términos generales la especie *ostreatus*, independiente del medio de cultivo, es la que produce la mayor cantidad de biomasa, seguida por la *djamor* y por último la *pulmonarius*. Al realizar las comparaciones múltiples entre las doce harinas y las tres especies, la menor producción micelial se consigue con el *P. pulmonarius* cultivado con harina de arroz y las mayores cantidades con el *P. ostreatus* empleando las harinas de arroz, maíz, maíz amarillo, maíz pinto y con *P. djamor* en esta última.

Figura 1-2: Producción de biomasa de las tres especies de *Pleurotus* con las diferentes fuentes de carbono *.



* Datos suministrados por el Grupo de investigación en Biotecnología. Universidad de Antioquia (1).

Pleurotus ostreatus ■ *P. pulmonarius* ■ *P. djamor* ■

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo. Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la f basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Comparando estos resultados con los reportes que se encuentran en literatura para especies de este mismo género, Stanley en el 2010, empleando granos de trigo, de maíz blanco y maíz amarillo como soportes para obtener semilla de *P. tuber regium* y *pulmonarius* reporta que para las dos especies, tanto la extensión micelial como el peso de micelio fresco son mayores con maíz blanco, seguido por el maíz amarillo y en menor proporción el trigo (83). Este comportamiento es concordante con la tendencia observada para los *Pleurotus* estudiados. Así mismo, Lomberh et. al. en el 2002, emplearon cerca de 70 cepas de 20 especies de hongos comestibles y medicinales, con el objetivo de evaluar diferentes condiciones de cultivo, entre las que se encontraba la composición del medio. Dentro de los hongos estudiados se encuentran tres especies de *Pleurotus* (*dryinus*, *eryngii* y *ostreatus*), con medios que contenían el producto de la decocción de trigo y avena después de ser filtrados, evaluando el tiempo óptimo para la obtención de inóculo. Los resultados mostraron que el efecto que produce la FC es dependiente de la especie y de la cepa utilizada (84).

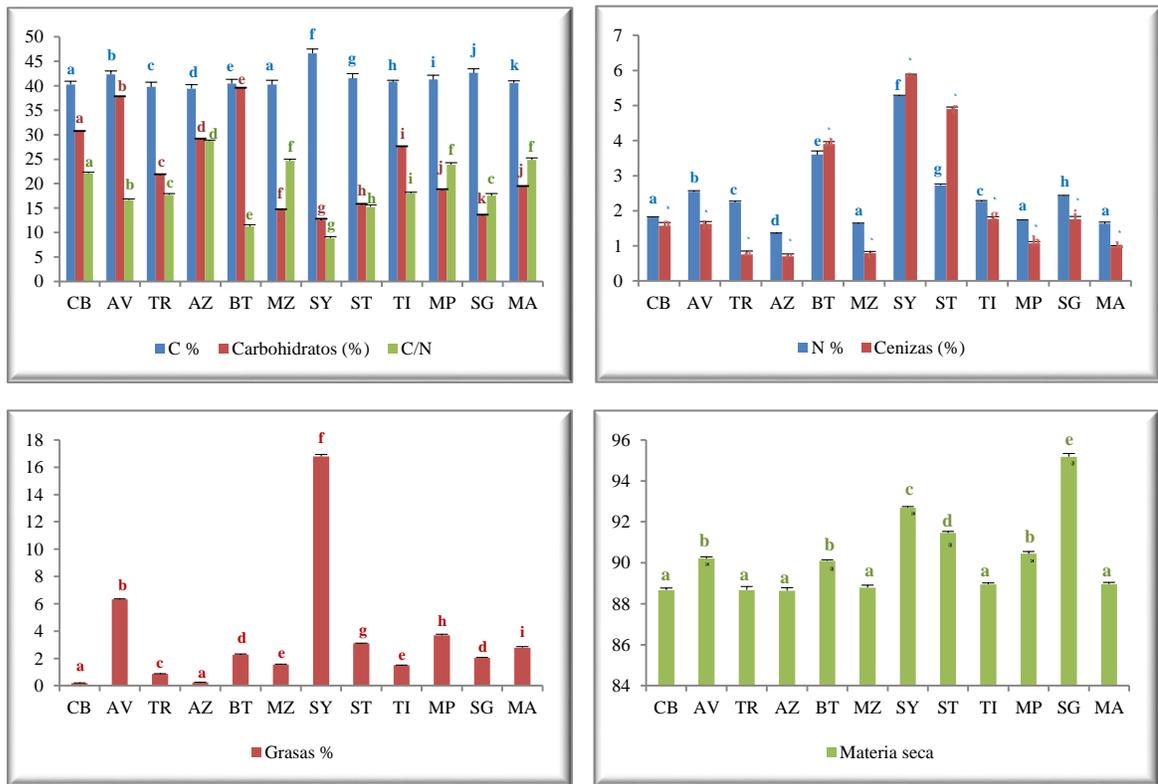
En lo que respecta al empleo de este tipo de FC para la producción de hongos de otros géneros, más específicamente *Ganoderma lucidum*, la mayor eficiencia se obtiene con harina de cebada (17,12g/L) que para el caso de las especies de *Pleurotus*, a pesar de estar en un rango cercano (16,55-17,50g/L), no es ésta la FC más eficiente. Caso contrario ocurre con la harina de maíz en la que para *ostreatus* y *djamor* está dentro de las FC más eficientes, con promedios de producción de biomasa entre 18,07 y 20,17g/L, mientras que para el *Ganoderma* se reportan valores bajos (1,280g/L) (4).

La comparación de lo encontrado en el presente estudio con los reportes antes descritos, lleva a la conclusión de que, además de haber una diferenciación entre especies, el comportamiento en términos de producción de biomasa, es dependiente del género, lo cual es lógico teniendo en cuenta que cada organismo tiene una forma particular en su biosíntesis al ser cultivado en diferentes medios, ya que su desarrollo depende de aspectos como su contenido enzimático, que a la vez limita o extiende la composición y la variedad de los mismos que puedan ser empleados para su obtención. En el caso del género *Pleurotus* se sabe que tienen un alto contenido de enzimas con gran variabilidad estructural, por lo que son catalogados como los macromicetos en cuya obtención se puede emplear el mayor número de sustratos, con aprovechamiento máximo de los mismos. Esta particularidad permite explicar las altas producciones de biomasa obtenidas aquí cuando se comparan con lo realizado para *Ganoderma lucidum*, empleando la misma composición de los medios de cultivo.

Otro aspecto importante que se debe analizar es si las diferencias en la producción de biomasa están directamente relacionadas con la composición de las FC. En primer lugar, de los resultados del análisis proximal (Figura 1-4) se pone de manifiesto que hay diferencias notorias entre las FC, siendo las más significativas las correspondientes al contenido de carbono y al de carbohidratos. Las harinas de cereales empleadas en esta investigación se desempeñan como aportantes de C y N, mayoritariamente del primero de estos elementos (39,42% – 42,63%) que del segundo (1,37% - 5,27%), razón por la que la denominación de FC es apropiada. En cuanto a la relación C/N, datos que son reportados por primera vez para todas las FC empleadas, ésta oscila entre $8,84 \pm 0,04$ para la harina de soya y $28,72 \pm 0,01$ para la harina de arroz. Las diferentes investigaciones reportadas sobre este tópico demostraron que del rango de valores en que se encuentre esta relación dependen variables como la producción de biomasa (85-87), de metabolitos secundarios (88), de enzimas (89, 90), de polisacáridos (34, 39, 91, 92) e incluso incide en la lipogénesis (93).

Con respecto al porcentaje de grasas cabe indicar que en general los cereales tienen cantidades relativamente pequeñas de lípidos comparados con otros alimentos. Para las FC utilizadas las diferencias entre estos contenidos fluctúan entre $0,196\% \pm 0,001$ para la harina de cebada hasta $16,794 \pm 0,140$ para la harina de soya, datos que en su mayoría se encuentran dentro del rango reportado en literatura (2,1%-18,1%) (94).

Figura 1-3: Análisis proximal de las fuentes de carbono empleadas en la FEL.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo. Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la k basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

En lo referente a la cantidad de N de las FC empleadas en este estudio los valores encontrados van desde $1,37 \pm 0,13$ para la harina de arroz hasta $5,28 \pm 0,02$ para la harina de soja, correspondiente a contenidos proteicos del 8,6% y 33,0% respectivamente, valores que se encuentran dentro del rango reportado en literatura (7,4%-36,%) (94). Al igual que en el caso del contenido graso, la tendencia para las FC concuerda con los valores de literatura, clasificando a la soja y a todos sus subproductos como una fuente proteica ideal (95).

Con relación al contenido de carbohidratos su variación se encuentra dentro de un rango más amplio que en los casos anteriores, abarcando desde $12,5\% \pm 0,3$ para la harina de soja hasta $39,6 \pm 0,1$ para la bienestarina, valores que están por debajo de lo esperado con base en los reportes de literatura (50-80%), pero que se puede explicar por las diferencias metodológicas empleadas en las determinaciones. En este estudio el cálculo se hizo con base en el porcentaje del material precipitado con etanol, que corresponde únicamente a mono y oligosacáridos, mientras que para los datos reportados generalmente se emplea una técnica analítica que implica la determinación de todos los

carbohidratos, incluidos polisacáridos y carbohidratos indigeribles (96, 97). Sin embargo, los valores relativos del contenido de carbohidratos concuerdan con los resultados obtenidos por Barikmo et. al, (arroz > trigo > maíz), y por ende los datos, a pesar de las diferencias con literatura, son útiles para hacer los análisis posteriores de la posible incidencia que la concentración de estos compuestos en la FC presente sobre la producción de los metabolitos en los *Pleurotus*.

Finalmente los contenidos de cenizas se encuentran en un rango entre $0,708 \pm 0,053$ y $5,871 \pm 0,009$ y el de materia seca entre $88,74 \pm 0,15$ y $95,23 \pm 0,16$ siendo los límites superiores correspondientes a las harinas de soya y de siete granos respectivamente.

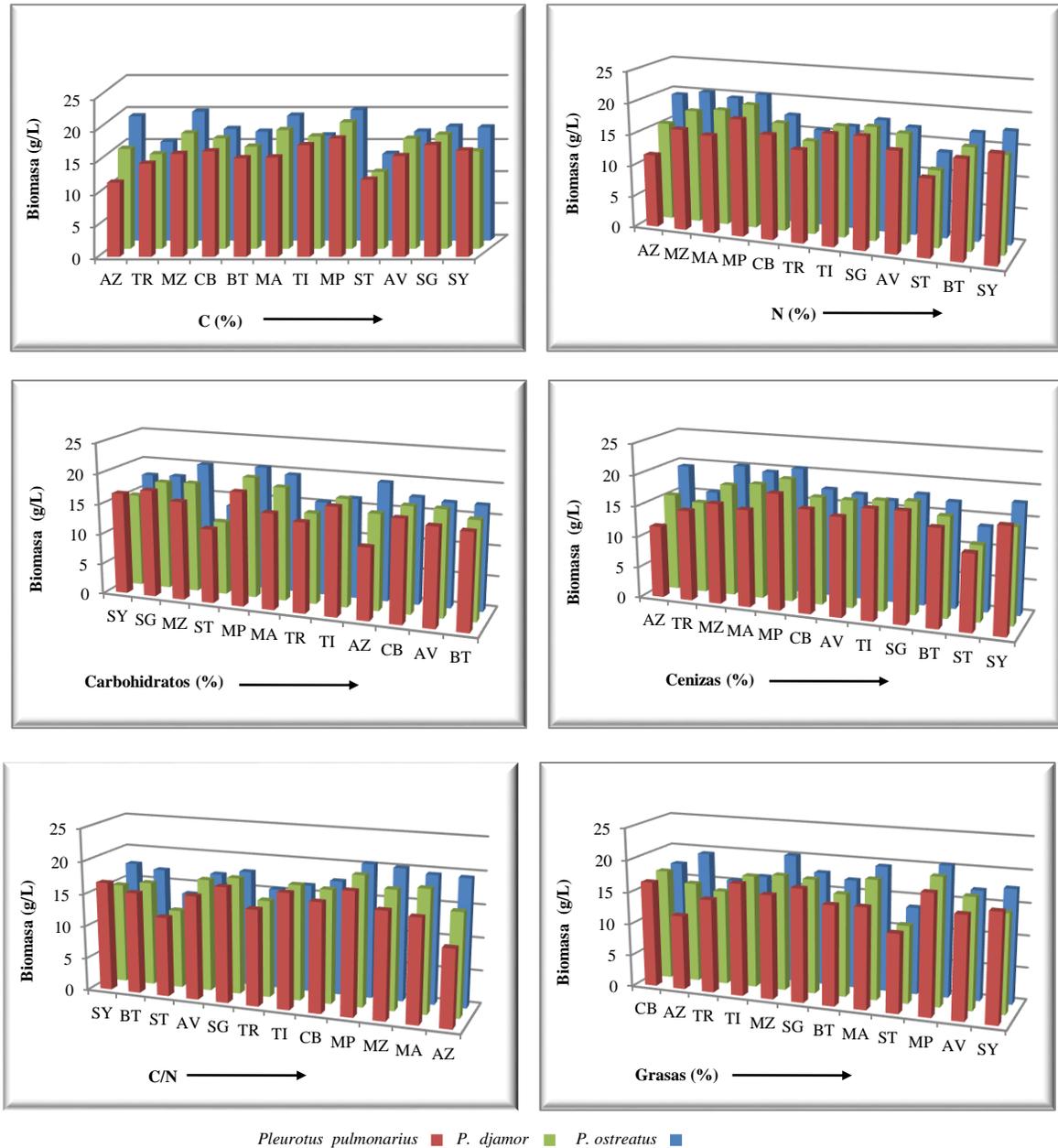
El efecto de la composición proximal sobre la producción de biomasa, está representado en la figura 1-4. El %C influye en la cantidad de biomasa obtenida. La mayor producción para las tres especies es la obtenida empleando maíz pinto que contiene un %C de valor intermedio (41,2%). Sin embargo, pequeños cambios afectan de forma drástica la eficiencia del proceso, ya que el empleo de salvado de trigo, que presenta contenidos de carbono cercanos (41,5%), genera una reducción apreciable en la producción de biomasa que decrece valores entre el 33,5% y el 39,1%. No obstante, el efecto de esta variable no es general con producciones de biomasa muy cercanas empleando FC que tienen valores estadísticamente diferentes en el %C, como es el caso de arroz y salvado de trigo para *pulmonarius*, arroz y maíz amarillo para *ostreatus* y maíz y siete granos para *djamor*. La incidencia del contenido de N en la obtención de biomasa en las especies estudiadas no permite establecer una relación directa, ni una tendencia clara de su comportamiento. Rizki et. al (69) reportaron que altos contenidos de N como los presentes en la harina de soya y la bienestarina producen inhibición en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* (87), resultados que contrastan con lo encontrado en esta investigación y cuyas diferencias se pueden deber a que estos comportamientos son dependientes tanto del género como de la especie y de las cepas estudiadas.

Del análisis de la gráfica en donde se representa la relación C/N de las FC y la producción de biomasa, se puede inferir que no hay una relación directa entre ellas. De una forma generalizada y sin observar a fondo las particularidades de cada caso, aparentemente la relación C/N de $23,60 \pm 0,19$ del maíz pinto favorece la producción de biomasa en las tres especies. Sin embargo, del análisis estadístico de esta relación (Figura 1-3), se estableció que no hay diferencias significativas entre los valores calculados para maíz pinto, maíz amarillo y maíz, por lo que se esperarían comportamientos similares con respecto a la eficiencia en la producción de los micelios. Estos resultados conducen a la conclusión de que la producción de biomasa para las especies *pulmonarius* y *djamor* es afectada por pequeñas variaciones en esta relación. Este tipo de comportamientos, en donde no se puede

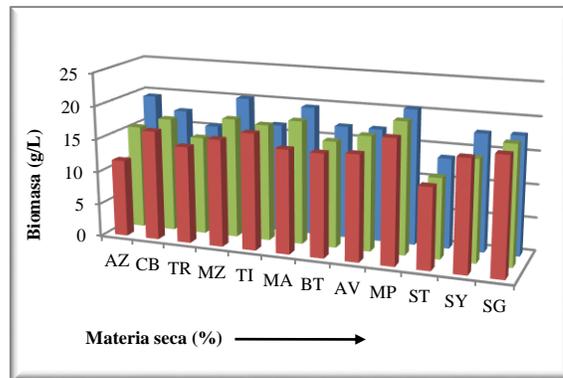
establecer una relación directa C/N vs producción de biomasa, ya ha sido reportada por otros autores específicamente en el género *Pleurotus* usando como FC glucosa (47).

El contenido de grasas, carbohidratos, materia seca y cenizas de las FC no ejercen una influencia directa sobre la producción de biomasa en ninguna de las tres especies empleadas en este estudio.

Figura 1-4: Efecto de la composición de las FC sobre la producción de biomasa de *Pleurotus* obtenidos por FEL.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.



Pleurotus pulmonarius ■ *P. djamor* ■ *P. ostreatus* ■

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

La comparación de lo aquí expuesto permite determinar que la efectividad de las FC no convencionales como componentes del medio de cultivo para la producción de biomasa de *Pleurotus* por FEL, puede ser catalogada como alta, debido a que las cantidades obtenidas son, en la mayoría de los casos, superiores a las reportadas en literatura. A modo de ilustración se puede hacer referencia al estudio de Smiderle et. al en el 2012, quienes usaron diferentes carbohidratos para la producción de micelio de *P. pulmonarius* con lo que se generan valores de 0,94g/L con arabinosa y de 9,07g/l cuando se emplea glucosa como FC (74). Así mismo, otras investigaciones reportan cantidades de 10,7g/L para el *P. dryinus* con glicerol como FC (49), de 4,5 a 9,1g/L para *P. tuber-regium* cambiando la relación C/N con diferentes proporciones de glucosa (47) y entre 7,60 y 13,5g/L con la misma especie variando el tipo de la FC y de la FN (46). Hasta el presente sólo el estudio de Papisyridia et.al. del 2010, en el que se trabajó con *Pleurotus ostreatus*, reporta producciones más altas que las determinadas en la presente investigación, las cuales varían entre 2,5 y 23.7 g/L dependiendo del tiempo del cultivo y utilizando xilosa como FC en una proporción de 60g/L, cantidad que corresponde al doble de la cantidad de la FC empleada en la presente investigación. En dicho reporte se resalta el hecho de que después del día 6, en el que se obtiene la máxima producción de biomasa, se presenta un fenómeno de autólisis del micelio con reducciones cercanas al 50% en el día 7 del cultivo. Si bien la producción de biomasa reportada por los autores antes mencionados es superior a la encontrada en este estudio, la utilización de FC no convencionales sigue siendo una mejor opción, no sólo por requerirse menor cantidad de ellas (reducción de costos) sino por la ausencia de autólisis, lo que posiblemente conlleve a una muy poca producción de los metabolitos secundarios, los que tienen su mayor biosíntesis en la fase estacionaria y por ende en una disminución del valor nutriceúutico del hongo. La no observación de la autólisis durante la FEL de los hongos

plantea la importancia de realizar el estudio de la cinética de crecimiento de las tres especies de *Pleurotus* utilizando los medios de cultivos no convencionales evaluados.

Todo lo anterior, sumado al hecho de que las fuentes de carbono empleadas son de fácil consecución, poseedoras de los requerimientos básicos para el crecimiento del hongo, de bajo precio, y que las mismas han conllevado a reducciones en el costo de la FEL, comparado con medios de cultivo convencionales (36), cataloga al empleo de estas fuentes de carbono en procesos fermentativos como una excelente alternativa para la obtención de micelio de *Pleurotus*.

1.4. CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos se puede concluir que la producción de biomasa de las tres especies de *Pleurotus* estudiadas, es dependiente tanto de la especie como de la fuente de carbono empleada para su cultivo.
- La especie que genera la mayor cantidad de biomasa, independientemente de la FC utilizada, es la *ostreatus*, seguida por *djamor* y por último *pulmonarius*.
- El salvado de trigo y el trigo son las fuentes de carbono menos eficientes en términos de producción de biomasa para las tres especies.
- La mayor producción de biomasa para las especies *ostreatus* y *djamor* se obtienen empleando como fuente de carbono las harinas de maíz (MZ, MP y MA).
- La especie *pulmonarius* cultivada con maíz y maíz amarillo presenta una producción de biomasa intermedia con relación a las demás fuentes de carbono.
- Si bien el análisis bromatológico de las FC, arrojó diferencias notorias entre los contenidos de nitrógeno, relación C/N, cenizas, grasa, materia seca, carbono y carbohidratos no se evidenció una incidencia directa ni generalizada entre estas características y la producción de biomasa.
- Las cantidades de biomasa obtenidas empleando las fuentes de carbono no convencionales son, en la mayoría de los casos, superiores a las reportadas en literatura independientemente del tipo de la fuente de carbono, hecho que las posiciona con un excelente potencial en la producción biotecnológica de *Pleurotus*.

**CAPITULO 2. INCIDENCIA DEL EMPLEO DE
CEREALES Y LEGUMINOSAS EN LA
PRODUCCIÓN FÚNGICA DE COMPUESTOS
TRITERPENOIDALES**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AV	Harina de avena
AZ	Harina de arroz
B	Extractos en AcOEt de los productos provenientes de la de la hidrólisis a pH básico
N	Extractos en AcOEt de los productos obtenidos de la hidrólisis a pH neutro
BP	Blancos del proceso
BT	Bienestarina
CB	Harina de cebada
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
E	Extractos en AcOEt de los medios agotados
EM	Espectrometría de masas
EPS	Exopolisacáridos
FC	Fuente de carbón
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
HC	Harina de cereal
I	Extractos en AcOEt de los micelios
IPS	Intrapolisacáridos
IR	Infrarrojo
LB	Liebermann-Burchard
MA	Harina de maíz amarillo
MP	Harina de maíz pinto
MZ	Harina de maíz
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SG	Harina de siete granos
ST	Salvado de trigo
SY	Harina de soya
TI	Harina de trigo integral
TIC	Total Ion Chromatogram
t_R	Tiempo de retención
TR	Harina de trigo

2.1. ANTECEDENTES

La composición química de los hongos depende de diferentes variables entre las que se encuentran la especie estudiada, la clase y las condiciones de cultivo (2, 98), entre otras. Dentro de los constituyentes químicos aislados de hongos están ciertos compuestos que, por sus cualidades nutricionales o de actividad biológica, han despertado el interés de la comunidad científica, aumentando de forma exponencial el número de estudios de las especies pertenecientes al reino Fungi. En especial el interés se ha centrado en los macromicetos, dado que pueden ser obtenidos a través de procesos fermentativos, metodología que permite optimizar la producción de biomasa y de bioactivos como es el caso de los polisacáridos, ácidos ganodéricos, triterpenoides en general y enzimas (99).

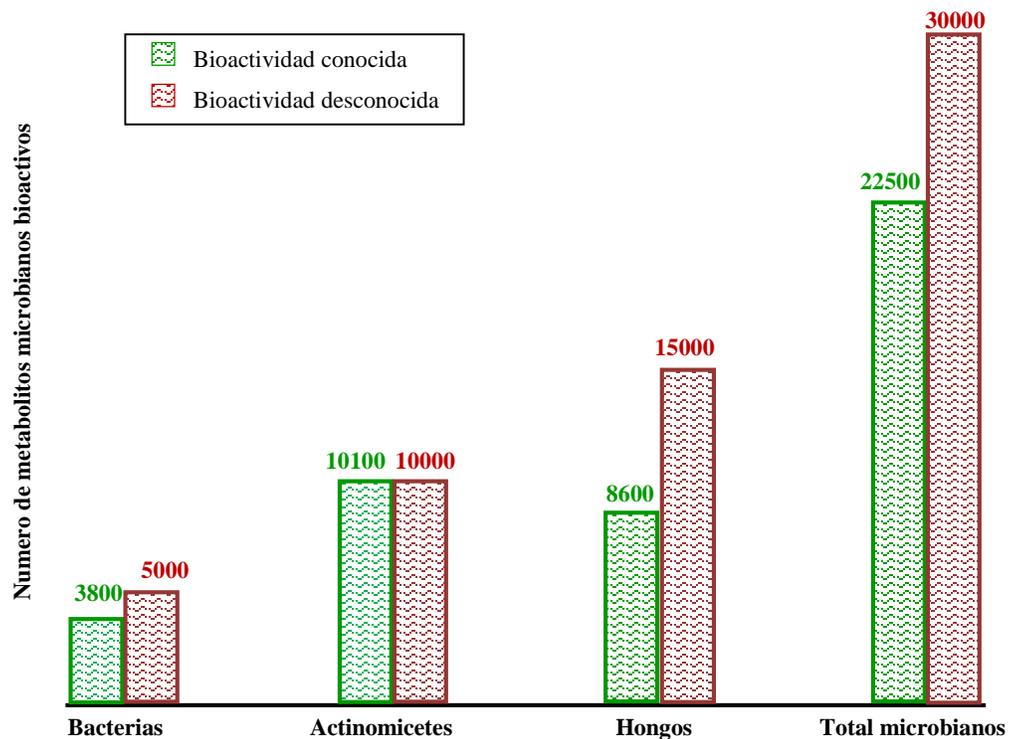
Los triterpenoides son un amplio grupo de productos naturales derivados de precursores C₃₀. Se conocen cerca de 200 esqueletos diferentes, provenientes de fuentes naturales o de reacciones enzimáticas, con estructuras generadas por la ciclación del escualeno, el oxidosqualeno o el bis-oxidoscualeno, llevando a la formación de esteroides, ceto esteroides, esteroides y saponinas esteroidales (100). Se destacan por sus actividades biológicas y las propiedades medicinales que confieren a los basidiomicetos (101), dentro de las que cuentan actividad hipocolesterolémica (102, 103), antibiótica (104), antiinflamatoria (105, 106), antifúngica, antitumoral (107) e insecticida (108) por citar algunas. Estos metabolitos son catalogados como uno de los más abundantes en macromicetos, lo que hace que su estudio químico y la determinación de la influencia que la composición del medio de cultivo tiene en su producción, sea un tema de investigación prioritario.

2.1.1. Generalidades de los metabolitos fúngicos

Los hongos superiores se reconocen como fábricas productoras de diversos compuestos bioactivos. Sus metabolitos poseen características similares en su estructura química a algunos fármacos, lo que les permite catalogarse como una “biblioteca importante de compuestos naturales” en cuanto al descubrimiento de nuevos medicamentos (30). En general, la semejanza fármaco - metabolitos secundarios fúngicos incluye principalmente las siguientes similitudes: su peso molecular está en el intervalo de 150-1,000 Da; los metabolitos por lo general contienen C, H, O y N, incluso S, P, Cl, Br, y F; su estructura química posee algunos grupos funcionales importantes tales como hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amino, etc, que pueden proporcionar puntos multi farmacóforos; sus propiedades moleculares tales como la masa molecular relativa, el valor de log P y el número de uniones donador - receptor de hidrógeno satisfacen las normas de fármaco-semejanza.

Según datos estadísticos, desde 1980 el número total de metabolitos secundarios microbianos, reconocidos por su bioactividad, se ha duplicado cada 10 años. Como se muestra en la figura 2-1 de cerca de 22.000 clases de estos metabolitos más del 38% (aproximadamente 8.600) son de origen fúngico. El conocimiento actual de estos compuestos de origen microbiano ha permitido dividirlos en 20 grupos principales de acuerdo con sus estructuras químicas, es así como dentro de ellos se cuentan compuestos heterocíclicos, policétidos, esteroides, terpenos, carbohidratos, entre otros (109), que a su vez le otorgan a los hongos actividades tales como antibacteriales, antifúngicas, antivirales, inmunomoduladoras, antitumorales, adyuvantes de las terapias tumorales, citostáticas, inmunosupresoras, antialérgicas, antiaterogénicas, antioxidantes, hipoglicémicas, antiinflamatorias y hepatoprotectoras (105).

Figura 2-1: Número aproximado de metabolitos secundarios conocidos de origen microbiano (109).



Con el descubrimiento de la penicilina (1929) los hongos micromicetos fueron catalogados durante varias décadas como ricas fuentes de antibióticos naturales y de otros compuestos bioactivos. Sin embargo, hoy en día se sabe que las moléculas constituyentes de los organelos celulares de los macromicetos, también producen dentro de sus metabolitos componentes conocidos por sus excelentes acciones biológicas. Un reciente estudio sobre los metabolitos fúngicos, el cual se enfocó en 1.500 compuestos que han sido aislados y caracterizados entre 1993 y 2001, mostró que más de

la mitad de estas moléculas tienen actividad antibacteriana, antifúngica o antitumoral (110). Estos compuestos se han aislado de los cuerpos fructíferos, del micelio, de las esporas y más recientemente de algunos de los medios de cultivo (111).

2.1.2. Triterpenoides fúngicos

El metabolismo secundario de los basidiomicetos es rico en terpenoides, muchos de los cuales poseen estructuras que hasta ahora sólo han sido detectadas en estos organismos y que han demostrado tener actividad antibiótica, destacándose sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos (105, 112). Los terpenoides forman una gran familia estructuralmente diversa de productos naturales derivados a partir de unidades de isopreno (C_5) unidos cabeza-cola y se clasifican como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) (100).

Dentro del grupo de los terpenos están los triterpenos y triterpenoides, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en el reino fungi, que se pueden encontrar como glicósidos, ésteres o en forma libre (113) En sólo el género *Ganoderma* se ha reportado el aislamiento de más de 130 triterpenoides (30), tanto en cuerpos fructíferos como en micelios, incluyendo ácidos ganodéricos, ácidos ganoderénicos, ácidos ganolucídicos, ácidos lucidénicos, ganoderioles, ganoderales, entre otros (114)

Estos metabolitos secundarios forman parte de los componentes grasos, generalmente derivados del ergosterol, que han recibido considerable atención por los excelentes resultados presentados en las pruebas farmacológicas a que han sido sometidos (115).

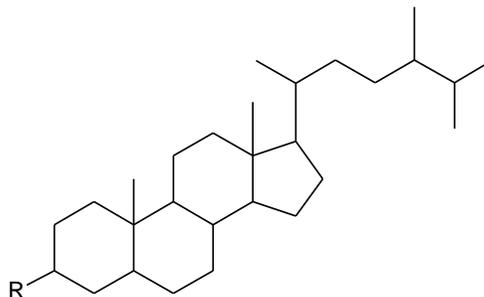
2.1.3. Estudios previos realizados por el grupo de Química de Hongos Macromicetos

Relacionado con los metabolitos secundarios de tipo triterpenoidal presentes en las especies del género *Pleurotus*, se han adelantado en el grupo de investigación de Química de Hongos Macromicetos dos trabajos. En el primero de ellos se estudiaron las fructificaciones de *P. sajor-cajú* cultivado sobre pulpa de café, determinando un triterpeno (I), siete esteroides (II-VIII), y dos cetosteroides (VII y VIII) (Figura 2-2) (116).

Así mismo, con la ayuda de IR, RMN¹H y EM, se determinó la presencia de cafeína en el extracto, resultado que evidenció la singularidad de esta seta al incorporar dicho producto a partir del sustrato sobre el que se cultivó (117).

Figura 2-2: Compuestos triterpenoidales aislados de *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café (116).

- | | | |
|--------------|--------|--|
| I. | R= H, | $\Delta^{2,5,7,9(11),22}$ |
| II. | R= OH, | $\Delta^{5,7,9(11),22}$ |
| III. | R=OH, | $\Delta^{6,22}$, 5 α ,8 α -epidioxi |
| IV. | R=OH, | $\Delta^{5,7,22}$ |
| V. | R=OH, | $\Delta^{7,22}$ |
| VI. | R=OH, | $\Delta^{5,7,9,22}$,19-Nor |
| VII. | R=OH, | Δ^7 |
| VIII. | R=OH, | $\Delta^{7,22}$, C6 y C7 -OH |
| IX. | R=O, | $\Delta^{4,6,8(14),22}$ |
| X. | R=O, | $\Delta^{4,6,15(16),22}$ |

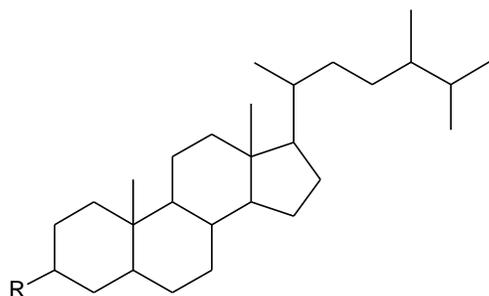


En el segundo trabajo se determinó el efecto que sobre el valor nutricional y la producción de triterpenoides produce el empleo como sustratos en el cultivo tradicional por FES de *Pleurotus*, de residuos de la industria agrícola. En términos del valor nutricional, la especie *sajor-cajú* cultivada sobre residuos de la industria cafetera y el *P. ostreatus* cultivado en una mezcla de salvado, aserrín, CaCO₃, viruta y melaza, presentaron los valores más altos, convirtiendo así a estos sustratos en una excelente opción para obtener un producto alimenticio de buena calidad. El *P. pulmonarius* en términos generales no tiene propiedades nutricionales altas. En cuanto al empleo de la cáscara de cacao como parte de la composición del sustrato, éste no aporta beneficios notorios (118).

Respecto a los triterpenoides su presencia también se ve afectada por el sustrato empleado para el cultivo. La especie *P. ostreatus* tiene un mayor contenido de triterpenoides, seguida por la *P. pulmonarius* y finalmente la *P. sajor-cajú*. En el *P. ostreatus* cultivado sobre una mezcla de caña, fríjol y cáscara de cacao, se determinaron dos triterpenos (I, XI), trece esteroides (II-V, XII-XIX) y dos cetosteroides (IX y X). En contraste con esto en el *P. ostreatus* cultivado sobre mezcla de tallos y vainas de fríjol, capacho, tallos y hojas de maíz, tamo de arroz, cascarilla de arroz y CaCO₃, se encontraron un triterpeno (I), cinco esteroides (II, IV, V, XV, XX) y un cetosteroide (X) (Figura 2-3). De los resultados anteriores se dedujo que el uso de cáscara de cacao como sustrato para el cultivo del *P. ostreatus* favoreció la biosíntesis de compuestos de carácter triterpenoide, en términos de variedad de este tipo de estructuras (119).

Si bien el cultivo en medio sólido y el tradicional no han perdido vigencia, la necesidad de obtener mayor contenido de bioactivos en un menor tiempo ha incentivado al desarrollo de algunas investigaciones encaminadas a la optimización de procesos fermentativos para favorecer la producción de estos metabolitos secundarios.

Figura 2-3: Compuestos triterpenoidales aislados de *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre diferentes residuos agrícolas (119, 120).



- | | | |
|---------------|--------|--|
| XI. | R= H, | $\Delta^{2,5,7,9(11),14,22}$ |
| XII. | R= OH, | $\Delta^{6,22}$, 5 α ,6 α -epoxi, C7-OH |
| XIII. | R=OH, | $\Delta^{7,22}$, C5 y C6 -OH |
| XIV. | R=OH, | Δ^{24} , C4 -(CH ₃) ₂ |
| XV. | R=OH, | Δ^{22} , C4 -(CH ₃) ₂ |
| XVI. | R=OH, | $\Delta^{5,7,9,22}$,19-Nor |
| XVII. | R=OH, | $\Delta^{5,7,22}$, C24 -(CH ₂ CH ₃) |
| XVIII. | R=OH, | $\Delta^{7,14,24}$, C4 -(CH ₃) |
| XIX. | R=OH, | $\Delta^{8,22}$, C24 -OH, C4 -(CH ₃) ₂ |
| XX. | R= OH, | $\Delta^{8(14),22}$, 5 α ,6 α -epoxi, C7-OH |

Los mecanismos de regulación de la biosíntesis, en términos generales, están estrechamente relacionados con los nutrientes en el medio de cultivo y las condiciones bajo las cuales se realiza el proceso biotecnológico. La manipulación de las variables en los bioprocesos permite obtener las condiciones óptimas para la producción de los metabolitos fúngicos. Sin embargo, la consecución de un producto biotecnológico con características determinadas (mayor producción de un bioactivo dado o compuestos con mayor variedad estructural o diferentes actividades biológicas) se rige por una adecuada coordinación de factores químicos, físicos y biológicos (121), algunos se detallan brevemente a continuación, con énfasis en FEL en donde el manejo de las variables presenta una relativa facilidad comparada con FES.

2.1.4. Factores que afectan los procesos fermentativos

Como se había señalado en el capítulo anterior, la realización de un proceso fermentativo exitoso requiere del conocimiento de una serie de factores físicos, químicos y biológicos que deben ser controlados tal como se muestra en la figura 2-4 (38).

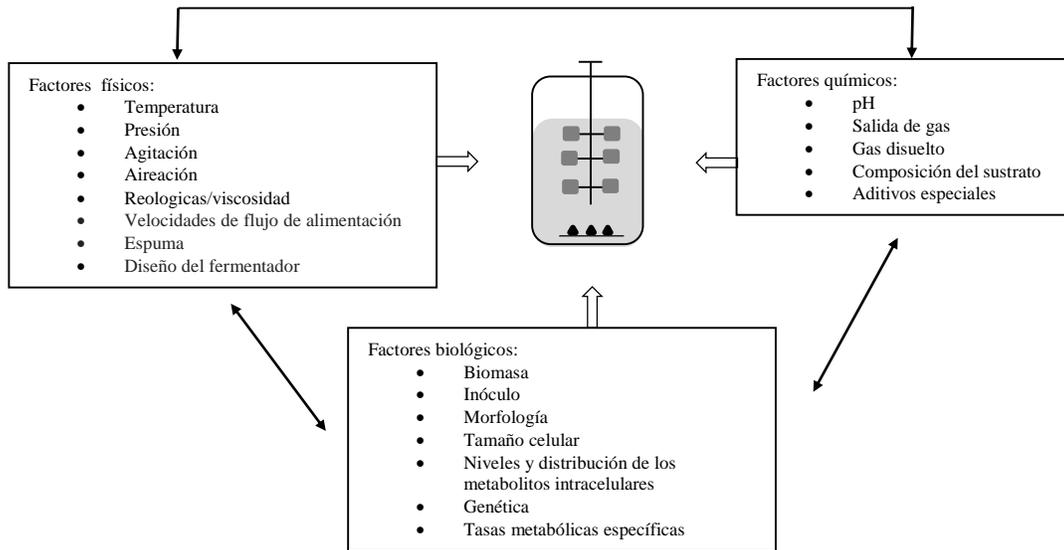
2.1.4.1. Factores físicos

2.1.4.1.1. Temperatura

La temperatura a la cual se realiza el bioproceso es clave para la fermentación de cualquier tipo de organismo. Los macromicetos, al igual que los micromicetos, poseen la habilidad de crecer en la naturaleza bajo un amplio rango de temperaturas, pero cuando su producción se realiza mediante FEL el más adecuado está entre 26 °C y 36 °C. Si bien se ha evidenciado que un incremento de la temperatura puede influir en el aumento del metabolismo del hongo, dicha variación disminuye la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio, conllevando a que la disponibilidad de éste sea menor en el interior del caldo o medio de cultivo y por consiguiente el crecimiento y el metabolismo

disminuirían debido a que los micetozoa son organismos aerobios estrictos y son muy sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno (37). Este parámetro afecta de manera importante tanto el crecimiento del hongo como su biosíntesis, siendo especie y género-dependiente (39, 122).

Figura 2-4: Factores que influyen el desarrollo de un bioproceso (38).



2.1.4.1.2. Fuerzas mecánicas

La agitación permite mantener una distribución homogénea en el recipiente de fermentación, facilita la transferencia de oxígeno, nutrientes y calor. Aplicar agitación durante una fermentación puede crear fuerzas cortantes dañando la estructura de la célula, generando cambios morfológicos, variando la velocidad de crecimiento y la formación de los productos. En el caso de los hongos, si es muy intensa puede partir el micelio y una agitación muy lenta limita la actividad durante la fermentación. Felse et. al afirman que esta variable se establece dependiendo de la resistencia del organismo al corte, de su estado morfológico, de la composición de los nutrientes y del pH, entre otras factores (123).

2.1.4.1.3. Contenido de oxígeno

Es uno de los factores de mayor importancia en las fermentaciones aeróbicas. La oxigenación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO₂, establece una demanda de oxígeno inicial que se debe satisfacer a través de la aireación y mezclado del cultivo (109). La cantidad de oxígeno afecta el crecimiento y la morfología celular, el consumo de nutrientes y la biosíntesis de metabolitos (124).

2.1.4.2. Factores biológicos

2.1.4.2.1. *Inóculo*

Dentro de los factores que determinan la morfología y el curso general de una fermentación fúngica, la cantidad, la edad del inóculo y el tipo (esporas o micelio vegetativo) son de prima importancia. El uso de micelio presenta ventajas importantes, tales como colonización más rápida y menor tiempo de incubación, aumentando la capacidad de competencia del hongo y reduciendo la posibilidad de colonización del sustrato por microorganismos contaminantes. Sin embargo, algunos investigadores reportan como ideal el uso de suspensiones de esporas, debido a que se reducen costos en la etapa de propagación del microorganismo, pero con esta práctica se corre el riesgo de una alta variabilidad genética a consecuencia de los sistemas de reproducción de los hongos (36). Cuando los hongos son cultivados por FEL, se presentan diferentes formas morfológicas que van desde filamentos miceliales dispersos hasta pellets. La forma particular es determinada no solamente por el material genético de la especie fúngica sino también por la naturaleza del inóculo, de los constituyentes del medio y de las condiciones físicas del cultivo (122). Sobre el efecto de esta variable en las FES se profundizará en el capítulo 8.

2.1.4.3. Factores químicos

2.1.4.3.1. *pH*

Diversas investigaciones ponen de manifiesto la capacidad de los macromicetos de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo, recomiendan usar un pH de 5 o inferior para evitar la contaminación bacteriana. Asimismo, cuando el pH es bajo ($\text{pH} < 4$) se incentiva la producción de biomasa y el consumo de glucosa, mientras que un pH más básico ($\text{pH} > 6$) puede estimular la producción de exopolisacáridos (37). Esta variable tiene un marcado efecto sobre la velocidad de crecimiento, el rendimiento del cultivo, el transporte de nutrientes, la solubilidad de los mismos, la eficiencia de las reacciones enzimáticas, la función de la membrana celular, la morfología y la estructura celular, el estado iónico de los sustratos, la fijación de varios nutrientes y la biosíntesis de los productos (125). Sobre el efecto de este factor se profundizará en el capítulo 6.

2.1.4.3.2. *Composición del medio*

Esta variable en FEL influye tanto en el crecimiento fúngico como en la formación de distintos productos. Cerca de trece elementos diferentes son esenciales para el desarrollo de hongos: oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, magnesio, manganeso, hierro, zinc y cobre

entre otros. Los primeros ocho son necesarios en cantidades relativamente altas (macronutrientes) y los últimos en pequeñas cantidades (micronutrientes) (122).

La mayoría de las fuentes de carbono y energía son azúcares, sin embargo también se utilizan polisacáridos, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, proteínas, alcoholes e hidrocarburos, entre otros. Se pueden adicionar pequeñas cantidades de carbono exógenas si hay problemas de crecimiento durante la fermentación. El nitrógeno puede provenir de sales de amonio, como nitratos o de compuestos orgánicos, como aminoácidos o proteínas. La remolacha o melaza de caña, el líquido de maíz, el suero en polvo, la harina de soya y el extracto de levadura son usadas como materias primas ricas en nitrógeno. Los fosfatos son una fuente conveniente y comúnmente utilizada de fósforo. Ambos desempeñan un papel importante en la sobreproducción de metabolitos y afectan la morfología fúngica (122).

Con respecto a la relación C/N, es de vital importancia para el cultivo de macromicetos, dado que ejerce marcada influencia tanto en el rendimiento de la biomasa obtenida como en la composición química de los micelios. La mayoría de los reportes relacionados con el tema, se enfocan sobre dos tópicos: eficiencia biológica (87, 126) y/o producción de polisacáridos (74, 109, 127). Smiderle et. al en el 2012 evaluaron diferentes carbohidratos como fuentes de C manteniendo una relación constante C/N de 24:1 para cultivar, por fermentación sumergida, *Pleurotus pulmonarius* concluyendo que tanto la producción de biomasa como la de EPS varía de acuerdo al carbohidrato empleado .

2.1.5. Los procesos fermentativos y la obtención de Triterpenoides

Con respecto a los procesos fermentativos para obtener triterpenoides a partir de hongos macromicetos, la mayoría de reportes están relacionados con ácidos ganodéricos. El ergosterol, es el componente triterpenoidal más común encontrado en los hongos, aunque existen reportes recientes de su ausencia en algunas especies (128). Es el estero principal en las membranas celulares de las especies del reino y debido a su especificidad para estos organismos, la determinación de su contenido ha sido ampliamente utilizada como un indicador de la biomasa fúngica, como se mencionó en el capítulo 1. Es comercialmente producido por la fermentación de cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, razón por la que existe un amplio número de investigaciones encaminadas a la búsqueda de procesos para enriquecer su biosíntesis en este organismo, que incluyen la utilización de diferentes carbohidratos (129), el efecto de la limitación de N y el porcentaje de esporulación (130), la cantidad de oxígeno disponible (131) y la manipulación genética

para la expresión desregulada de los genes envueltos en la biosíntesis del esteroles, la sobreexpresión del gen de la esteroles C-24(28) reductasa y de la esteroles aciltransferasa, así como el uso de FC no convencionales de bajo costo como la melaza de caña, como una combinación de estrategias genéticas y biotecnológicas (132). Dado que las rutas biosintéticas en los micro y macromicetos son similares, es fácil deducir que la producción de compuestos triterpenoidales puede estar igualmente determinada por los factores antes mencionados, razón que incentiva a explorar la incidencia que pueda ejercer el uso de las harinas de cereales y de leguminosas como los componentes principales del medio de cultivo, sobre la producción de compuestos triterpenoidales en los productos biotecnológicos obtenidos por FEL de tres especies de *Pleurotus*.

En la tabla 2-1 se encuentran consignados algunos de los estudios relacionados la obtención de triterpenoides mediante fermentaciones en especies pertenecientes al reino fungi, junto con la finalidad de los mismos.

Tabla 2-1: Obtención de triterpenoides mediante fermentaciones.

ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	OBJETIVO DEL ESTUDIO	REF.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	Efecto del pH y tensión de oxígeno disuelto	(133)
		Efecto de fuentes de C y N	(134)
		Suministro de oxígeno	(124)
		Efecto del tamaño del pellet	(135)
		Incidencia del pH inicial	(125)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phlebia radiata</i> , <i>Physisporinus rivulosus</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Gloeophyllum trabeum</i> , <i>Poria (Postia) placenta</i> ,	Ergosterol	Suplementos del sustrato con nitrógeno y glucosa	(136)
<i>Phomopsis sp</i>	Derivados del oleano	Estudio de los componentes del medio de cultivo para su obtención por FEL	(137)
<i>Antrodia camphorata</i>	Triterpenoides en extracto crudo	Determinación de la actividad antioxidante al ser obtenido por FEL	(138)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Peróxido de ergosterilo y peróxido de 9,11-dehidroergosterol	Determinación de citotoxicidad de los componentes activos del extracto etanólico del micelio obtenido por FEL	(139)
<i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>cystidis</i>	Ergosterol	Variación del contenido en diferentes partes de la fructificación	(140)
<i>Hyphomycetes</i> acuático	Ergosterol	Incidencia de calidad del inóculo, medio de crecimiento y agitación	(141)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Ergosterol	Efecto de diferentes fuentes de C y concentración inicial de azúcares	(142)
<i>Monascus purpureus</i>	Esteroles	Variación de FEL vs FES	(143)
<i>Cantharellus</i>), <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Morchella spp.</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinus edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	Esteroles	Determinación del contenido de esteroles en los diferentes macromicetos	(144)

Continuación tabla 2-1: Obtención de triterpenoides mediante fermentaciones.

ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	OBJETIVO DEL ESTUDIO	REFERENCIA
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Triterpenoides	Estudiar el efecto de hacer una fermentación sumergida en dos etapas con elicitación sobre la producción de los metabolitos en bioreactor	(145)

Los cereales y las leguminosas de los que provienen las harinas empleadas como FC, así como sus subproductos, son considerados como alimentos funcionales y nutraceuticos, debido a que proveen fibra dietaria, proteínas, energía, minerales, vitaminas y antioxidantes que son requeridos para el mantenimiento de la salud humana. Son útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares, reducen la incidencia de algunos tipos de cáncer, así como la proporción de absorción del colesterol, grasas y regulan la presión arterial. La presencia de estas propiedades potencia el valor de los productos biotecnológicos (micelio mediante posible incorporación y medio de cultivo agotado por contenido) obtenidos a través del empleo de FEL de *Pleurotus* con este tipo de FC, debido a que los mismos no solo poseerían mayor cualidad nutraceutica, sino que se podrían emplear directamente sin necesidad de una previa purificación, lo que desde el punto de vista de aplicación biotecnológica disminuiría los costos.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Material fúngico

Para esta parte del análisis se empleó el material fúngico cultivado según la metodología descrita en el capítulo 1 numeral 1.2.1.

2.2.2. Determinación de las condiciones óptimas de extracción

Con el objetivo de establecer un protocolo eficiente para la extracción de los metabolitos, tanto del micelio como del medio agotado, se emplearon disolventes de diferente polaridad (AcOEt, CH₂Cl₂ y MeOH), se determinó su complejidad por CCD y la composición de cada extracto por CG-EM (numeral 2.2.5 y 2.2.6). Luego de seleccionar el disolvente más apropiado, se empleó el protocolo descrito en la figura 2-5 con el objetivo de hacer una extracción selectiva separando los triterpenoides de las posibles estatinas que pudieran estar presentes.

Este procedimiento se diseñó debido a que en el marco de la investigación interdisciplinaria con el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia se debía detectar, como parte del trabajo de dicho grupo, la presencia de las estatinas empleando sus propiedades antifúngicas, para lo que se

requería la ausencia de triterpenos y/o ácidos grasos que han demostrado presentar también esa actividad (102, 146-148).

2.2.3. Obtención de los extractos de *Pleurotus*

Los productos de la FEL se filtraron separando el micelio del medio agotado. Los medios agotados se liofilizaron y al igual que los micelios frescos se extrajeron con AcOEt a temperatura ambiente, hasta Lieberman Burchard negativo. Los extractos se desecaron con Na₂SO₄ anhidro y se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio.

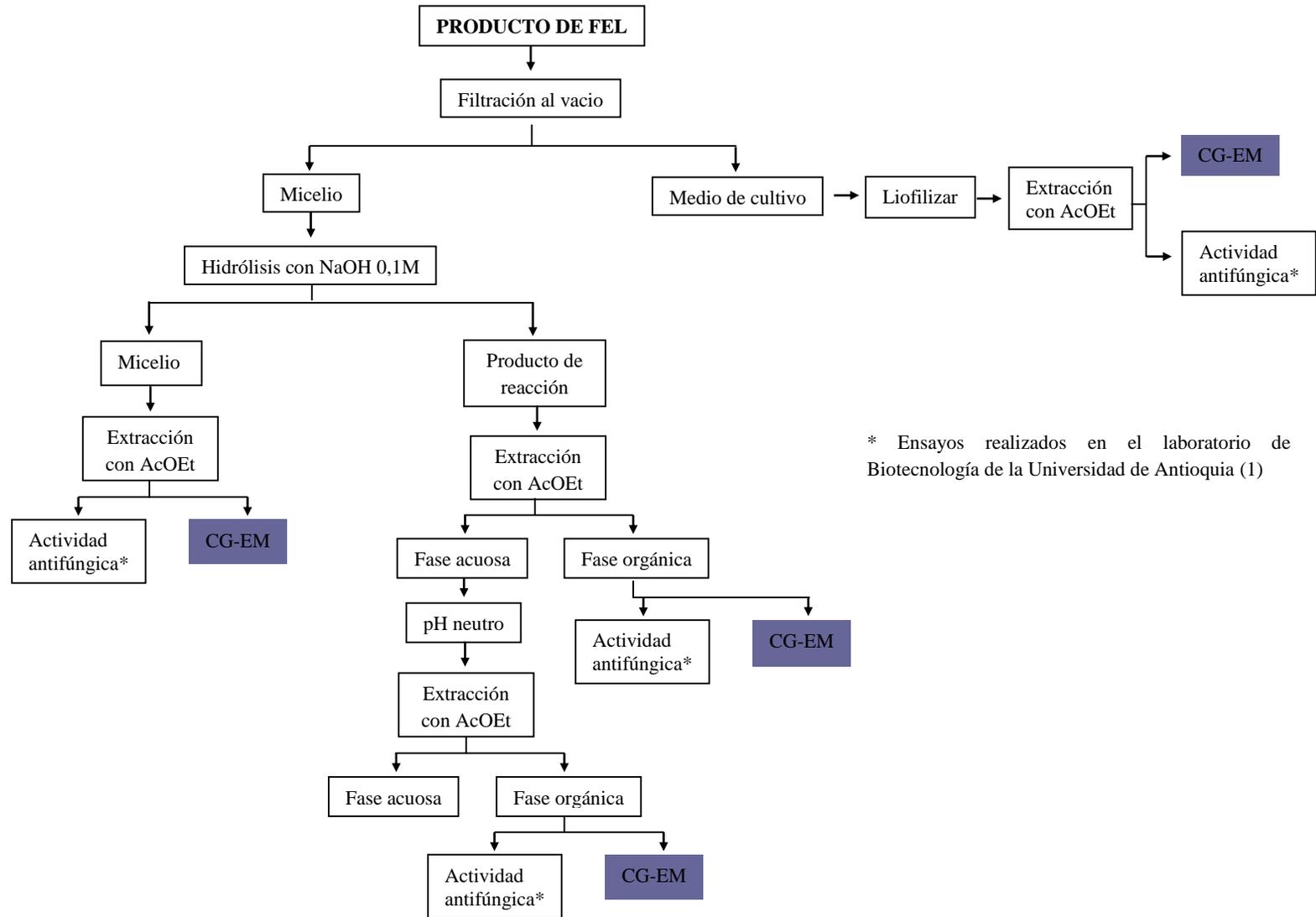
2.2.4. Análisis de la incidencia de la fuente de carbono sobre la composición de los productos biotecnológicos

La determinación de la composición de las harinas se realizó a partir del extracto en AcOEt tanto los blancos del proceso (**BP**, harinas con mezcla de sales), como de las harinas (**HC**), que posteriormente, al igual que los extractos de los micelios y de los medios agotados de *Pleurotus*, se caracterizaron por CG-EM.

La determinación de las estructuras de los componentes constituyentes de cada extracto, se realizó mediante comparación con la base de datos contenida en el software del equipo, así como con los análisis del patrón de fragmentación dado por sus espectros de masas. Para el caso particular de los triterpenoides se tuvieron en cuenta las fragmentaciones típicas de los núcleos, los reportes de literatura y la biblioteca del grupo de investigación. La composición porcentual del extracto se determinó por áreas relativas a partir de los TIC.

El cálculo del contenido de esteroides totales tanto de los extractos de los micelios como de BP y HC, se realizó empleando el método colorimétrico de Lieberman-Burchard (149) a partir de una curva de calibración con estigmasterol en un rango de concentraciones entre 0,071 mg/ml y 0,71 mg/ml con 9 niveles. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca Varian modelo Cory 50 Con a 640 nm. Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis multivariante con el programa Statgraphics 5.1, con base en los resultados de los triplicados realizados para cada caso.

Figura 2-5: Protocolo para la determinación del efecto de la FC sobre la producción de los metabolitos de interés.



* Ensayos realizados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Antioquia (1)

2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con las siguientes características: columna capilar HP5 30 m, 0.33 mm de diámetro interno y 25 μm de espesor; gas de arrastre Helio 4.5 a 1 ml/min; modo Split 1:10; temperatura desde 90 °C hasta 300 °C a 5 °C/min. Este cromatógrafo, está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70 eV. Se inyectaron 1 μL de soluciones de 2 mg/ml de cada extracto a analizar disueltos en CH_2Cl_2 .

2.2.6. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Fueron realizadas en cromatofolios Al de Sílica gel 60F254 Merck® (0.040 mm y 0.060 mm de diámetro de partícula), como reveladores universales se emplearon vapores de yodo y luz ultravioleta (254 nm y 366 nm) y como específico para esteroides se utilizó una solución de ZnCl_2 al 30% en metanol que fue asperjada sobre las placas el cual produce, después de ser calentadas a 100 °C, coloraciones azules y verdes como resultado positivo.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocido que la composición química es el factor determinante para el empleo de los hongos comestibles como alimentos terapéuticos o funcionales, (109, 127), hecho que hace relevante y pionera esta parte del estudio en el que se pretende establecer el efecto que sobre dicha composición tiene el uso de FC no convencionales en la producción mediante FEL de *P. ostreatus*, *djamor* y *pulmonarius*. En este capítulo la presentación de los resultados y su discusión se inicia con la composición tanto general, como específica para la producción de triterpenoides presentes en los BP y HC, para posteriormente enfocarse en la composición de los micelios y los medios agotados. Finalmente en capítulos posteriores lo relacionado con las estatinas y otros componentes que son aportantes al valor nutriceútico de los productos biotecnológicos.

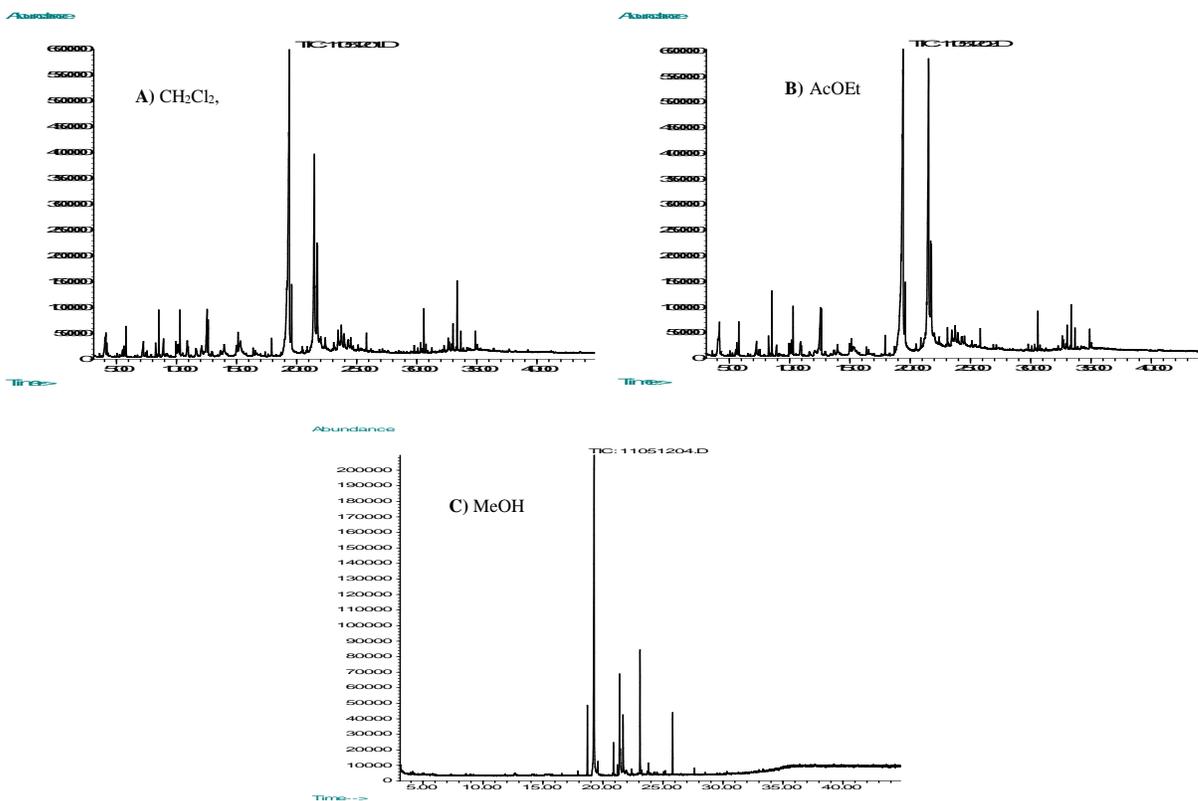
2.3.1. Determinación de las condiciones óptimas de extracción de los productos de la FEL

La elección de un sistema eficiente de extracción es la etapa inicial y quizás la más importante cuando se realizan estudios de productos naturales. En los reportes de literatura se encuentran diferentes procedimientos generales con relación a la extracción de metabolitos generados a partir de FEL como son: tratar únicamente el micelio dejando de lado los caldos de cultivo o viceversa (150, 151), liofilizar el producto biotecnológico completo y posteriormente extraer (152) o separar el micelio del caldo de cultivo y extraer individualmente los dos productos (153). Para la presente

investigación se optó por la última opción con el objetivo de determinar el efecto de cada una de las variables analizadas sobre la producción de los intra y los exometabolitos.

Para realizar los estudios preliminares se seleccionaron como disolventes extractantes CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH, teniendo en cuenta que tanto los triterpenoides como las estatinas son solubles en ellos. En la figura 2-6 se pueden observar los cromatogramas de gases para los tres extractos de los micelios de *Pleurotus ostreatus* cultivados empleando maíz amarillo como FC. La selección de este prototipo se hizo con base en los siguientes criterios: es la especie que independiente de la FC genera la mayor cantidad de biomasa (Figura 1-2) y con esta FC hay una alta producción de micelio y baja contaminación durante el proceso fermentativo. Los perfiles cromatográficos muestran las similitudes entre los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 y con AcOEt, en contraste con el empleo de MeOH, en donde la extracción es menos eficiente, en términos del número de compuestos en general y especialmente en el rango de t_R entre 30 y 40min, en el que eluyen los triterpenoides y las estatinas, éstas últimas en su forma lactónica. Con base en el comportamiento cromatográfico se seleccionó el AcOEt no sólo por la eficiencia en la extracción de los triterpenos sino porque los reportes de literatura indican altas solubilidades de las estatinas en este disolvente (154).

Figura 2-6: CG de los extractos en diferentes disolventes del micelio de *Pleurotus ostreatus* cultivado en harina de maíz amarillo.



Habiendo seleccionado el disolvente más apropiado se procedió a la obtención y posterior análisis por CG-EM de los extractos de los BP, HC, los micelios y de los caldos de cultivo (medio de cultivo agotado) de *Pleurotus ostreatus* con las doce FC, siguiendo la metodología esquematizada en la figura 2-5. Con este procedimiento se buscaba una extracción selectiva para obtener de una forma independiente los triterpenoides y las estatinas, aprovechando la propiedad de estas últimas de ser hidrolizadas en un 100% a pH básico, bajo las condiciones previamente establecidas, que serán detalladas y discutidas en el capítulo 3. La formación de la sal de las correspondientes formas hidroxiladas de las estatinas, facilita la separación de los triterpenoides mediante extracción con AcOEt. La recuperación de las estatinas se realiza por la neutralización del medio, regenerando la forma hidroxilada soluble en el disolvente extractante. En el anexo 2A se encuentran los cromatogramas de los extractos en AcOEt de los micelios (**I**), de los extractos de los productos provenientes de la de la hidrólisis a pH básico (**B**) y de los extractos de los productos obtenidos de la hidrólisis a pH neutro (**N**). En términos generales no hay cambios significativos en los perfiles cromatográficos y la mayor cantidad de componentes de tipo triterpenoidal y/o estatinas (t_R 30 a 40 min) se encuentran en los micelios. Con base en estos resultados para el *P. djamor* y el *P. pulmonarius* se eliminó el paso de la hidrólisis.

2.3.2. Caracterización de las harinas

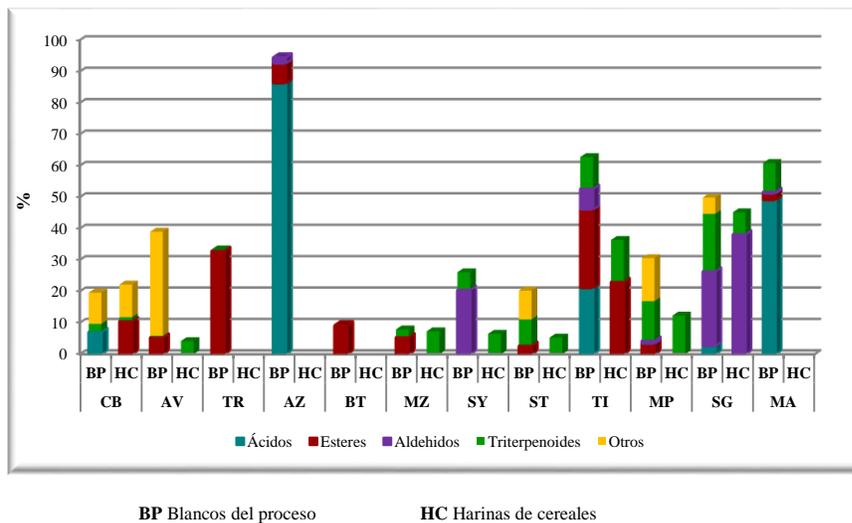
2.3.2.1. Composición global

La composición general de las FC fue determinada a partir del análisis proximal (capítulo 1) y mediante los estudios por CG-EM de los extractos en AcOEt de los BP y HC. Si bien la composición química de los cereales varía dependiendo de factores ambientales, hay rangos reportados en literatura que son usados para comparar los valores encontrados para las FC empleadas y de esta forma permiten cotejar con respecto a reportes similares, la incidencia que los contenidos de estos compuestos presenten en la producción de los metabolitos secundarios en *Pleurotus*, cuando las harinas de dichos cereales se emplean en la producción biotecnológica del hongo.

Para tener la certeza de determinar qué compuestos son producidos por los hongos durante la fermentación y descartar la incorporación desde el medio de cultivo, se realizó el mismo procedimiento de extracción y caracterización por CG-EM con los BP y HC, estos resultados son presentados y catalogados por grupos funcionales en la figura 2-7. Los componentes más comunes en las harinas son los triterpenoides y los ésteres (83% de las harinas), seguidos por los aldehídos (50% de las harinas), con contenidos que van entre el 0,6% al 18,3% y el 2,7% al 32,9% para los primeros y el 0,5% y 38,2% para los segundos. Un resultado atípico es el observado para la

bienestarina, que al ser una mezcla de harinas de cereales, debería tener una composición similar a aquellas harinas que la conforman (arroz, maíz y soya). Sin embargo, la no aparición de los componentes esperados (ácidos grasos, triterpenoides, aldehídos) puede ser atribuida a que algunos de los otros compuestos adicionales a las harinas y que se agregan a la bienestarina para aumentar su valor nutricional, pueden presentar una solubilidad parcial en el AcOEt los cuales, posterior a la evaporación, dificultaban la disolución en diclorometano, disolvente empleado para la inyección en el cromatógrafo de gases, por la presencia de un precipitado. Se podría hipotetizar que el precipitado formado engloba parte de los compuestos extraídos inicialmente. Si bien uno de los constituyentes de la bienestarina es la harina de arroz, que presenta un 85% de ácidos grasos, no se conoce en qué proporción la misma está presente. Partiendo del contenido de grasa tanto determinado en este trabajo por análisis proximal, como el reportado por el ICBF (3%), la proporción de la harina de arroz debe ser muy baja, consideración que permite inferir que la cantidad de ácidos grasos presentes en esta harina debe ser mínima.

Figura 2-7: Comparación de la composición porcentual de los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y de las harinas de cereales para cada una de las fuentes de carbono empleadas.



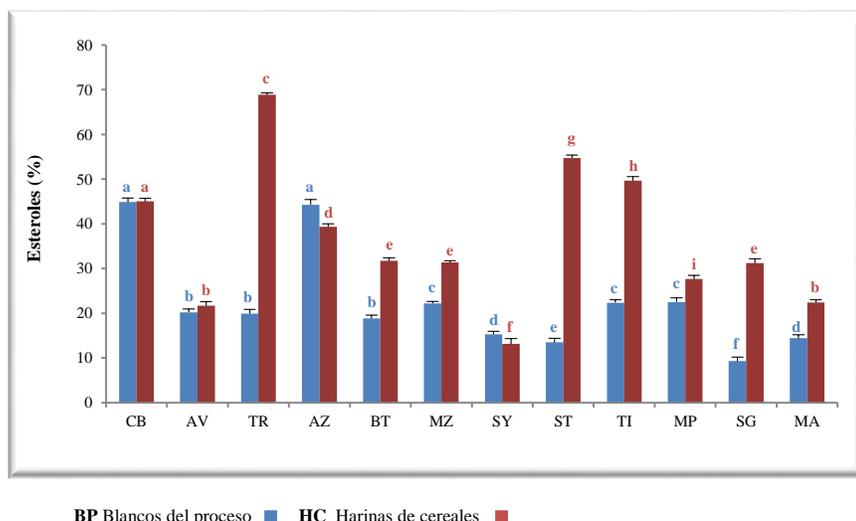
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soya; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

2.3.2.2. Compuestos triterpenoidales

De reportes en literatura se sabe que uno de los componentes más valiosos de los cereales, que sumado a sus cualidades nutricionales les da un valor agregado, son los denominados fitoesteroles, término colectivo empleado para esteroides de plantas. En estas matrices se encuentran como esteroides libres, esteroides de ácidos grasos o de ácidos fenólicos, esteroides glicosidos y glicosidos esteroides acilados y sus niveles varían tanto entre los diferentes cereales como en las partes del núcleo (155, 156).

Para este estudio se calculó el contenido total de esteroides presentes en las harinas por el método de Lieberman-Burchard (LB) (Figura 2-8) y se determinaron las estructuras de los componentes triterpenoidales, con base en el análisis del patrón de fragmentación dado por sus espectros de masas (Anexo 2D), así como por la presencia de los picos diagnósticos (Tablas 2-2 y 2-3) y por comparación con los reportes de literatura. El estigmast-5-en-3-ol (**I**) más conocido como sitosterol es el más común de los esteroides presentes en las harinas de cereales, hecho que coincide con lo reportado en literatura (157, 158), así como la generalidad de que la harina de avena y sus subproductos tienen contenidos menores de este grupo de compuestos con relación a los derivados del trigo (ST y TR) (158, 159). Los esteroides restantes ya han sido reportados por otros investigadores como componentes minoritarios de las FC utilizadas (156, 157, 160).

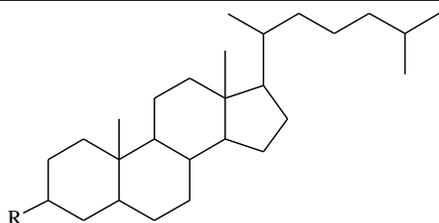
Figura 2-8: Contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y en las harinas de cereales.



CB harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soja; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo. Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la **a** a la **i** basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Tabla 2-2: Fragmentaciones características en espectrometría de masas para los compuestos determinados en los blancos de las FC.

NUMERO	COMPUESTO	M ⁺	FRAGMENTOS CARACTERISTICOS
I	Estigmast-5-en-3-ol	414	399 (M ⁺ -CH ₃), 396 (M ⁺ -H ₂ O), 381 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 273 (M ⁺ -CL), 255 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 213 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O-CH ₃), 163 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃), 145 (M ⁺ -Fisión anillo C-H ₂ O-CH ₃).
II	Ergost-5-en-3-ol	400	382 (M ⁺ -H ₂ O), 315 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃), 367 (M ⁺ -H ₂ O-CH ₃), 273 (M ⁺ -CL), 213 (M ⁺ -H ₂ O-CH ₃ -Fisión anillo D).
III	Estigmast-5,22-dien-3-ol	412	394 (M ⁺ -H ₂ O), 327 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃), 369 (M ⁺ -C ₃ H ₇), 351 (369-H ₂ O), 300 (M ⁺ -C ₈ H ₅), 255 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 213 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O-CH ₃), 159, 145.
IV	Estigmast-3,5-dien-7-ona	410	395 (M ⁺ -CH ₃), 269 (M ⁺ -CL), 242 (M ⁺ -Fisión anillo D), 227 (242-CH ₃), 174 (M ⁺ -Fisión anillo C), 159 (-CH ₃), 55, 43, 81.
V	Estigmast-3-ol	416	401 (M ⁺ -CH ₃), 398 (M ⁺ -H ₂ O), 383 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 275 (M ⁺ -CL), 273 (M ⁺ -CL-2H), 257 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 233 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 215 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O), 180, 147.



- I. R= OH Δ⁵ C24 - (CH₂-CH₃)
- II. R= OH Δ⁵ C24 - (CH₃)
- III. R=OH Δ^{5,22} C24 - (CH₂CH₃)
- IV. R=O Δ^{3,5} C24 - (CH₂CH₃)
- V. R=OH Δ⁰ C24 - (CH₂CH₃)

Tabla 2-3: Compuestos triterpenoidales determinados en los blancos del proceso y en las harinas.

	TRITERPENOIDES (%) ^a					
	HARINAS	I	II	III	IV	V
BLANCOS DEL PROCESO	Cebada	1,2	0,9		0,5	
	Avena	0,6				
	Trigo	0,3	0,2			
	Arroz					
	Bienestarina					
	Maíz	2,1				0,6
	Soya	5,6				
	Salvado de trigo	6,3	2,0			
	Trigo integral	10,1				
	Maíz pinto	12,6				
	Siete granos	18,3				
Maíz amarillo	9,2					
HARINAS	Cebada	1,0	0,3		0,1	
	Avena	3,3		1,1		
	Trigo					
	Arroz					
	Bienestaina					
	Maíz	4,0			3,3	
	Soya	6,5				
	Salvado de trigo	4,0	1,3			
	Trigo integral	13,4				
	Maíz pinto	12,3				
	Siete granos	7,0				
Maíz Amarillo						

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

2.3.3. Composición de los productos biotecnológicos

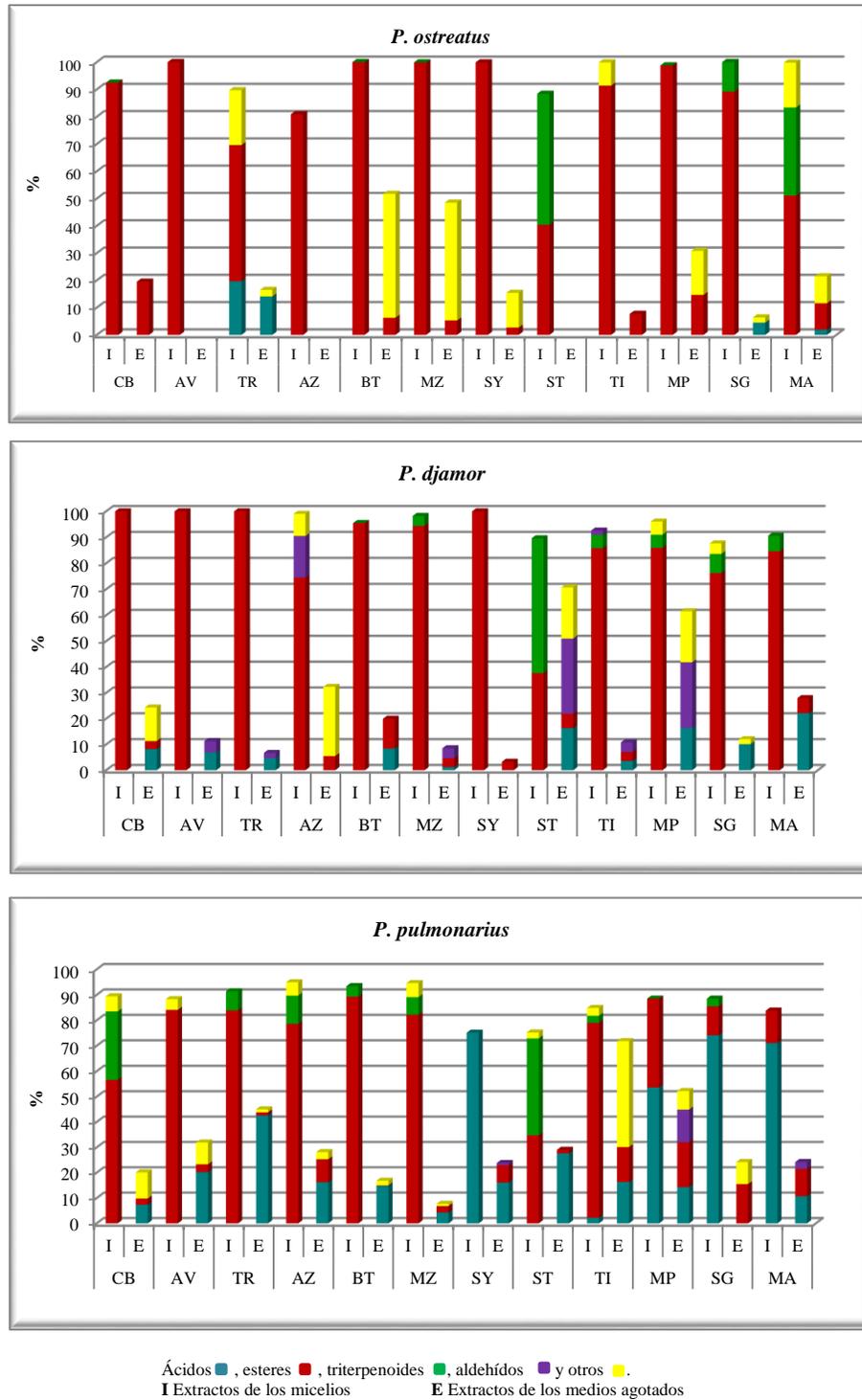
2.3.3.1. Composición global

Los anexos 2A, 2B y 2C recopilan los cromatogramas de gases de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados para las especies *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. pulmonarius* respectivamente, obtenidos empleando las 12 FC. En estos cromatogramas se pueden diferenciar básicamente tres zonas de interés: la primera de ellas entre 0 y 18 min en la que se determinaron una variedad de estructuras con diferentes grupos funcionales entre los que están ácidos de bajo peso molecular, alcoholes, fenoles, compuestos heterocíclicos y fosforados; una segunda comprendida entre 20 y 30 min t_R en el cual aparecen los ácidos grasos y sus esteres y finalmente entre 30 y 40 min, zona correspondiente a los compuestos triterpenoidales.

En la figura 2-9 se encuentra la representación gráfica del efecto de las doce FC, sobre los compuestos determinados, agrupados como ácidos, esteres, aldehídos, triterpenoides y un grupo heterogéneo denominado “otros”. Del análisis de dicha figura se puede concluir que, independientemente de la FC y de la especie del hongo, los compuestos mayoritarios presentes en los micelios y producidos por los hongos en el mayor número de FC, son los esteres. Un comportamiento particular es el que presenta el *P. pulmonarius* cultivado con harina de soya, ya que en su micelio no se determinaron ésteres y en contraste los componentes mayoritarios son los ácidos. Con respecto este último grupo de compuestos, están presentes en mayores proporciones en *P. pulmonarius*, seguido por el *djamor* y finalmente el *ostreatus*, con la peculiaridad de que su distribución es restringida a algunas de las FC empleadas.

En lo referente a los triterpenoides el hongo que los produce en el mayor número de FC es el *P. pulmonarius*, seguido por el *djamor* y por último el *ostreatus*. Del estudio comparativo se ve que independiente de la especie el empleo de salvado de trigo como FC proporciona las mayores cantidades de éstos metabolitos. Los componentes clasificados como otros tienen una distribución limitada a ciertas FC en *ostreatus* y *djamor*, pero para el caso del *pulmonarius* su presencia está mas generalizada.

Figura 2-9: Comparación de la composición porcentual de los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de *P. ostreatus*, *djamor* y *pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



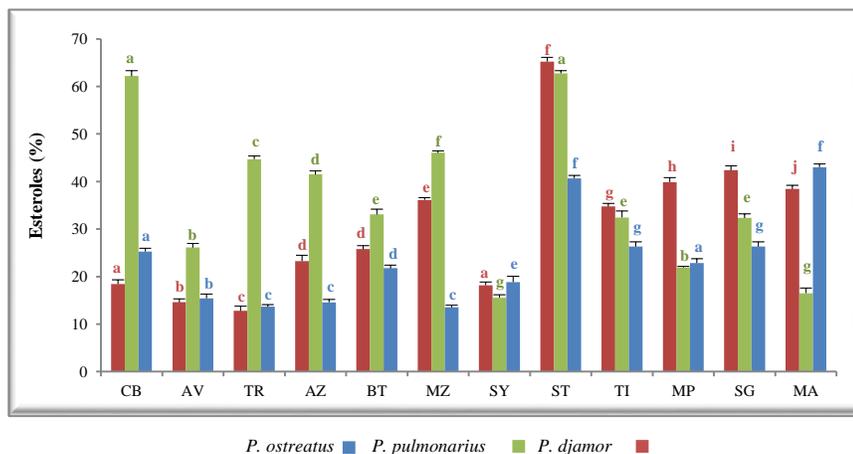
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

2.3.3.2. Compuestos triterpenoidales

Para el caso particular de este grupo de compuestos, no se identificaron en los medios agotados, independientemente de las fuentes de carbono y de las especies empleadas, por lo que se descarta la ocurrencia de procesos de excreción por parte de los hongos, particularidad que ya ha sido observada en el género *Ganoderma* obtenido mediante FEL (datos sin publicar) y en *Rhizopus oligosporus* en proporciones cercanas al 4%, específicamente para el ergosterol (161). De igual forma para el *P. ostreatus*, en los extractos de los productos de la hidrólisis básica y a pH neutro, no se comprobó la presencia de este grupo de metabolitos (CG-EM Anexo 2A).

La incidencia que tiene el empleo de las FC sobre el contenido total de esteroides presentes en los micelios, calculado por el método de LB, aparece representada en la figura 2-10. El efecto depende tanto de la especie como de la FC empleada. El *P. pulmonarius* supera en cantidad de esteroides biosintetizada a las demás especies al usar siete de las FC (cebada, avena, trigo, arroz, bienestarina y maíz); utilizando el *P. djamor* se generan mayores contenidos al comparar con *pulmonarius* y *ostreatus*, únicamente con cuatro FC (salvado de trigo, trigo integral, maíz pinto y siete granos) y finalmente para esta última especie únicamente con una FC (maíz amarillo) se produce la mayor cantidad de esteroides.

Figura 2-10: Efecto de la fuente de carbono sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de *Pleurotus*.



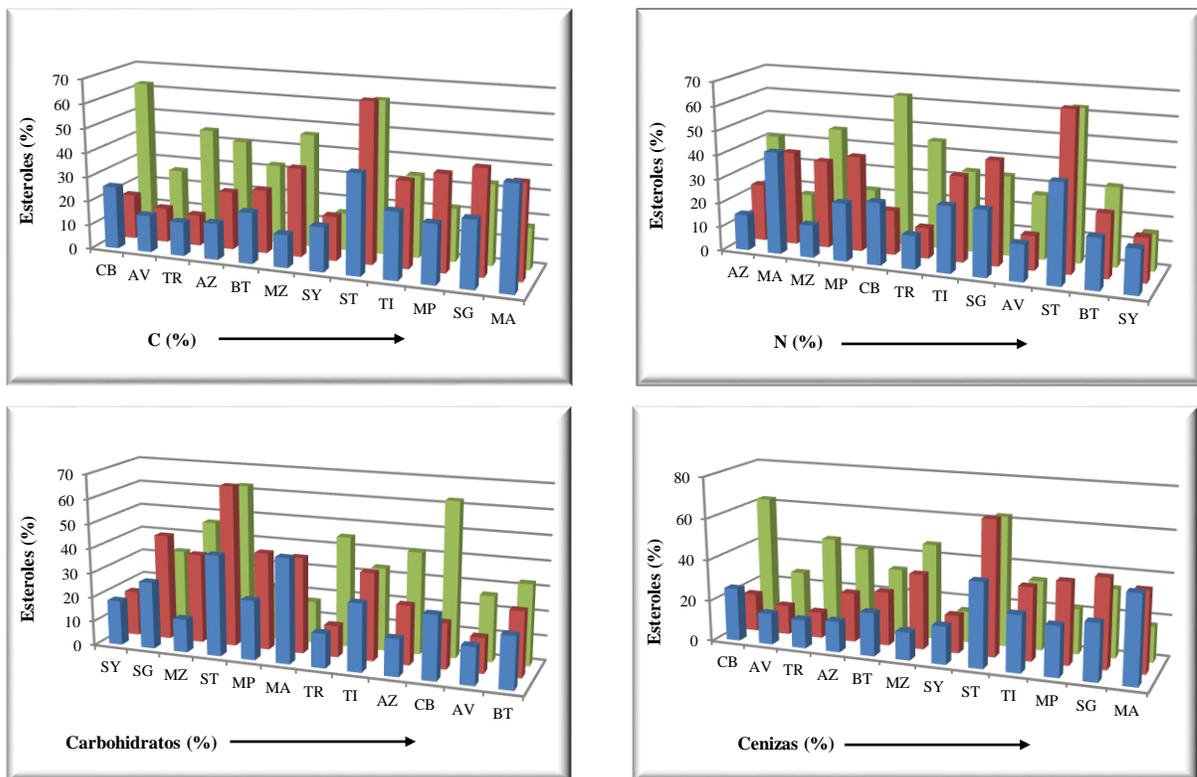
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo. Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la j basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

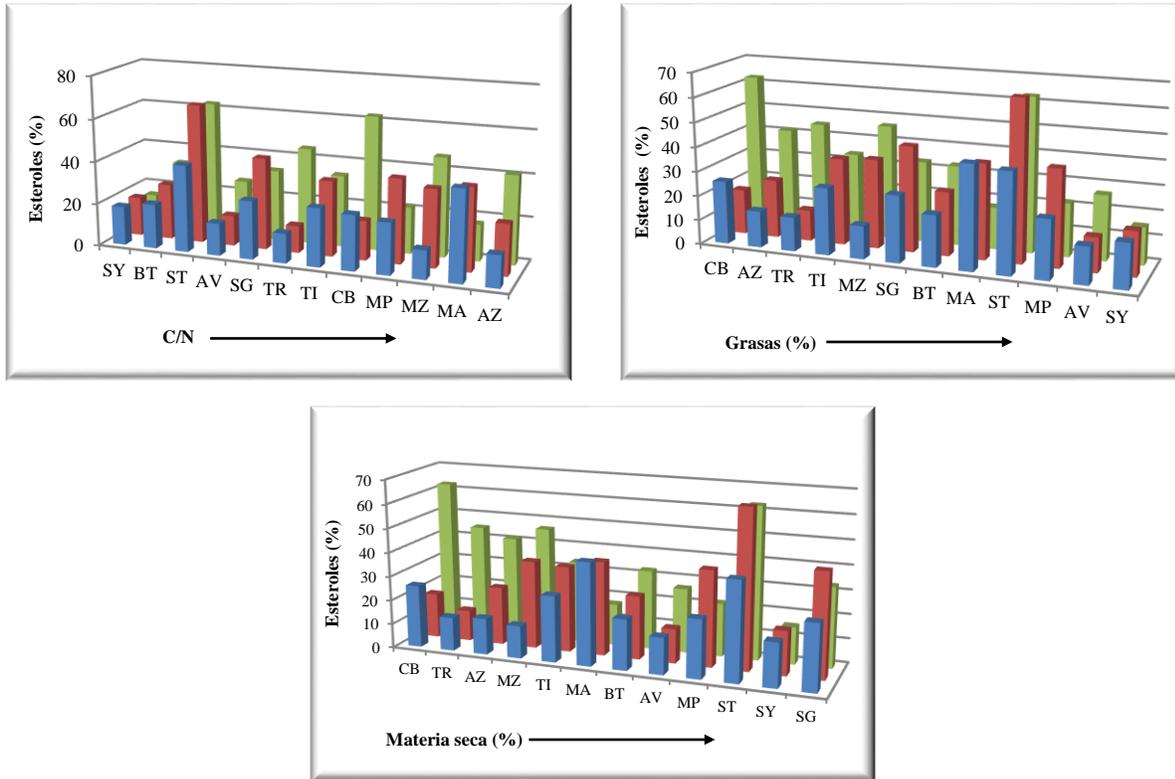
Relacionado con el efecto de las FC, el uso de salvado de trigo estimula la biosíntesis de esteroides en las tres especies con ciertas particularidades: para la especie de *P. djamor* es la FC que genera la

mayor producción de los metabolitos; en el caso de la especie *P. pulmonarius* el contenido no tiene diferencias estadísticamente significativas al emplear salvado de trigo y cebada; para el *P. ostreatus* de igual forma no hay diferencias significativas entre las cantidades obtenidas con salvado de trigo y maíz amarillo.

En busca de una explicación al efecto de las FC sobre la producción de los compuestos esterólicos, se graficaron cada una de las propiedades determinadas para las harinas (capítulo 1, numeral 1.2.3) contra la producción de esteroides (Figura 2-11). En términos generales el contenido de C, N, materia seca, cenizas, carbohidratos y grasas de las FC, no tienen un efecto directo sobre la producción de los compuestos esteroidales para ninguna de las tres especies cultivadas. Relacionado con la incidencia del contenido de grasas, Nout et. al mencionaron que la biosíntesis de ergosterol en *Rhizopus oligosporus* obtenido por FES, se favorece al emplear como sustrato semillas de soya, atribuyendo este resultado al alto contenido de ácidos grasos de este material, los cuales pueden ser incorporados en la ruta sintética del esteroide (161), aseveración contradictoria con el comportamiento observado para los *Pleurotus* cultivados por FEL con harinas ya que, si esto aplicara, se obtendrían altos contenidos de esteroides con el empleo de soya, avena y maíz pinto.

Figura 2-11: Efecto de las propiedades de las FC sobre el sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos de los micelios de *Pleurotus* cultivados por FEL.





P. ostreatus ■ *P. pulmonarius* ■ *P. djamor* ■

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

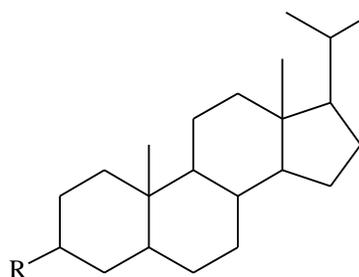
En cuanto a la relación C/N, que se ha determinado como una de las variables primordiales a tener en cuenta cuando se busca fomentar la biosíntesis de un compuesto en particular a través de procesos fermentativos, tampoco se observa una tendencia clara de su efecto sobre la producción de esteroides. Es así como para el caso de las harinas de trigo y de siete granos, las cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas para sus relaciones C/N (Figura 1-3 capítulo 1), se esperaría que la producción de esteroides fuera similar, pero para las tres especies de *Pleurotus* tanto las cantidades como las estructuras de los compuestos determinados son diferentes, como se verá más adelante. Otra evidencia de que no hay una correspondencia entre la relación C/N y la producción de este tipo de metabolitos, es el hecho de que para el *pulmonarius* el salvado de trigo y cebada, que presentan valores de C/N diferentes, favorecen la mayor producción. De igual forma ocurre con salvado de trigo y maíz amarillo para *P. ostreatus* y *P. djamor*.

Hacer una comparación con lo que está reportado en literatura resulta una tarea poco útil, si se tiene en cuenta que los comportamientos son específicos y dependientes del organismo y del metabolito, como ya ha sido descrito por otros autores (86) y que, adicionalmente, es la primera vez que se estudian este tipo de compuestos en *Pleurotus*, empleando harinas de cereales como FC. Relacionado

con las estructuras de los compuestos triterpenoidales, además de los ya enumerados en la tabla 2-2, fueron determinados con el mismo criterio los descritos en la tabla 2-4 (EM en el Anexo 2D).

Tabla 2-4. Fragmentaciones características en espectrometría de masas para los compuestos determinados en los micelios de *Pleurotus* cultivados con las diferentes FC.

NUMERO	COMPUESTO	M ⁺	FRAGMENTOS CARACTERISTICOS
VI	Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	394	379 (M ⁺ -CH ₃), 376 (M ⁺ -H ₂ O), 361 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 269 (M ⁺ -CL), 251 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 209 (M ⁺ -CH ₃ -Fisión anillo D)
VII	Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno	376	361 ((M ⁺ -CH ₃), 251 (M ⁺ -CL), 235 (M ⁺ -CL-CH ₃ -H), 225 (M ⁺ -Fisión anillo D), 209 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 156 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃), 141 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃).
VIII	Ergost-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno	374	359 (M ⁺ -CH ₃), 303 (M ⁺ -C ₅ H ₁₁), 275 (M ⁺ -C ₇ H ₁₅), 249 (M ⁺ -C ₉ H ₁₇), 233 (M ⁺ - C ₉ H ₁₇ -CH ₃ -H), 217 (M ⁺ - C ₉ H ₁₇ -2CH ₃ -H).
IX	Ergost-5,7,22-trien-3-ol	396	381 (M ⁺ -CH ₃), 378 (M ⁺ -H ₂ O), 363 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 337 - C ₄ H ₁₁), 271 (M ⁺ -CL), 253 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O), 211 (M ⁺ -CH ₃ - Fisión anillo D), 159 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O), 143 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O- CH ₃), 128 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O-2CH ₃).
X	Ergost-7,22-dien-3-ol	398	383 (M ⁺ -CH ₃), 300 (M ⁺ -C ₇ H ₁₄ -2H), 273 (M ⁺ -CL), 271 (M ⁺ -CL-2H), 253 (M ⁺ - CL-2H-H ₂ O), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 231 (M ⁺ -Fisión anillo D), 213 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O), 160 (M ⁺ -Fisión anillo C-H ₂ O), 145 (M ⁺ -Fisión anillo C-H ₂ O-CH ₃).
XI	Estigmast-3-ona	414	399 (M ⁺ -CH ₃), 273 (M ⁺ -CL), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 231 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 217 (M ⁺ -CO-H).
XII	6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona	428	413 (M ⁺ -CH ₃), 410 (M ⁺ -H ₂ O), 287 (M ⁺ -CL), 245 (M ⁺ -Fisión anillo D-C ₃ H ₆), 227 (M ⁺ -Fisión anillo D- C ₃ H ₆ -H ₂ O).
XIII	Ergost-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	392	377 (M ⁺ -CH ₃), 267 (M ⁺ -CL), 265 (M ⁺ -CL-2H), 293 (M ⁺ - CH ₃ -C ₆ H ₁₂), 251 (M ⁺ -CH ₃ -C ₆ H ₁₂ -C ₃ H ₆), 240 (M ⁺ -Fisión anillo D), 225 (M ⁺ -CL-2H-Fisión anillo D), 223 (M ⁺ -CL-2H-Fisión anillo D-2H).
XIV	4,4-Dimetilcolest-5,7,14,22-tetraen-3-ol	408	393 (M ⁺ -CH ₃), 390 (M ⁺ -H ₂ O), 375 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 365 (M ⁺ -C ₃ H ₇), 297 (M ⁺ -CL), 281 (M ⁺ -CL-CH ₃ 2H), 271 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 253 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃ -H ₂ O), 191 (M ⁺ -Fisión anillo C), 185 (M ⁺ -Fisión anillo C-H ₂ O-2H).
XV	Estigmast-4-en-3-ona	412	397 (M ⁺ -CH ₃), 370 (M ⁺ -C ₃ H ₆), 355 (M ⁺ - C ₃ H ₆ -CH ₃), 314 (M ⁺ -C ₃ H ₆ -CH ₃ -CO-CH), 271 (M ⁺ -CL), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D), 124.
XVI	Ergost-3-ona	400	385 (M ⁺ -CH ₃), 273 (M ⁺ -CL), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 231 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 217 (M ⁺ -Fisión anillo D-CO-H), 163 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃).
XVII	Ergost-4-en-3-ona	398	383 (M ⁺ -CH ₃), 271 (M ⁺ -CL), 244 (M ⁺ -Fisión anillo D), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 147 (M ⁺ -Fisión anillo C-C ₂ H ₅), 133 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃ -CO), 124.
XVIII	Estigmast-4,22-dien-3-ona	410	367 (M ⁺ -Isop), 325 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃), 271 (M ⁺ -CL), 244 (M ⁺ -Fisión anillo D), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃).



VI.	R=OH	$\Delta^{5,7,9(11),22}$	C24 - (CH ₃)
VII.	R=H	$\Delta^{2,5,7,9(11),22}$	C24 - (CH ₃)
VIII.	R=H	$\Delta^{2,5,7,9(11),14,22}$	C24 - (CH ₃)
IX.	R=OH	$\Delta^{5,7,22}$	C24 - (CH ₃)
X.	R=OH	$\Delta^{7,22}$	C24 - (CH ₃)
XI.	R=O	Δ^0	C24 - (CH ₂ CH ₃)
XII.	R=O	Δ^4	C24 - (CH ₂ CH ₃), C6-OH
XIII.	R=O	$\Delta^{4,6,8(14),22}$	C24 - (CH ₃)
XIV.	R=OH	$\Delta^{5,7,14,22}$	C4 - (CH ₃) ₂
XV.	R=O	Δ^4	C24 - (CH ₂ CH ₃)
XVI.	R=O	Δ^0	C24 - (CH ₃)
XVII.	R=O	Δ^4	C24 - (CH ₃)
XVIII.	R=O	$\Delta^{4,22}$	C24 - (CH ₃)

La mayoría de los triterpenoides ya se han reportado en *Pleurotus*, en otros basidiomicetos y/o en líquenes y plantas como se observa en la tabla 2-5. De los diecisiete triterpenoides (Tablas 2-2 y 2-4) nueve corresponden al núcleo ergostano, siete al estigmastano y uno al colestano. Con respecto a la funcionalización se tienen dos triterpenos, ocho esteroides y siete cetonas esteroidales. Cabe en este punto anotar que en cuanto al último grupo, del estigmast-3-ona (**XI**), el estigmast-4-en-3-ona (**XV**), el ergostan-3-ona (**XVI**) y el 4-ergosten-3-ona (**XVII**) no se encontraron reportes en literatura de su presencia en hongos, pero existe una hipótesis muy interesante para el caso de las bacterias en las cuales se observa la formación de algunas de estas cetonas esteroidales como productos de la oxidación de los esteroides. Un caso particular ocurre con el sitosterol que genera la cetona esteroideal estigmast-4-en-3-ona, por oxidación del 3 β -OH a un grupo oxo, así como una isomerización del doble enlace del C5 al C4 llevando a la formación del 4-en-3-ona derivado. Esta reacción la cataliza una enzima bifuncional colesterol oxidasa que tienen algunas bacterias no patógenas, que les permite utilizar los esteroides como fuente de carbono y otras patógenas que la emplean para infectar a los macrófagos del huésped, alterando la estructura física de las membranas lipídicas debido a la oxidación del colesterol al derivado ceto (162). Este derivado del sitosterol es un candidato promisorio en el tratamiento de desórdenes endocrinos (163). La presencia de esas cetonas esteroidales en las especies de *Pleurotus* cultivadas por FEL, lograría abrir el campo a otros estudios que profundicen en sus rutas biosintéticas y en la búsqueda de las enzimas antes mencionadas que promueven esta clase de transformaciones, hasta ahora exclusivos de bacterias, lo que podría determinar si reacciones de esta clase pueden también ocurrir en macrohongos a partir de los correspondientes esteroides: estigmasterol, ergostanol y ergost-5-en-3-ol.

Tabla 2-5: Compuestos triterpenoidales determinados en los extractos de los micelios de *Pleurotus* cultivados por FEL empleando fuentes de carbono no convencionales.

NUMERO	COMPUESTO	PREVIAMENTE REPORTADOS EN:	REF.
I	Estigmast-5-en-3-ol	<i>Laetiporus sulphureus</i> e <i>Inonotus obliquus</i> nativos	(164, 165)
II	Ergost-5-en-3-ol	<i>Pleurotus sajor-cajú</i> nativo.	(166)
V	Estigmastanol	<i>Pleurotus djamor</i> nativo	(167)
VI	Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	<i>Pleurotus sajor-cajú</i> cultivado por FES	(116)
VII	Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno	<i>Pleurotus sajor-cajú</i> cultivado por FES	(116)
VIII	Ergost-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno	<i>Suillus luteus</i> y <i>Laetiporus sulphureus</i> nativos	(168, 169)
IX	Ergost-5,7,22-trien-3-ol	<i>Pleurotus sajor-cajú</i> cultivados por FES y nativos, <i>P. ostreatus</i> nativos	(116, 144, 166, 170)
X	Ergost-7,22-dien-3-ol	<i>Pleurotus sajor-cajú</i> cultivados por FES y nativos, <i>P. ostreatus</i> nativos	(116, 144, 166, 170)
XI	Estigmast-3-ona	NR	NR
XII	6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona	Plantas y bagazo de caña	(171, 172)
XIII	Ergost-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	<i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pleurotus sajor-cajú</i> cultivados por FES	(116, 173)
XIV	4,4-Dimetilcolest-5,7,14,22-tetraen-3-ol	<i>Aphyloporal</i>	(174)
XV	Estigmast-4-en-3-ona	Líquenes, plantas y <i>Papulaspora immersa</i> H. H. <i>Hotson</i>	(163, 175)
XVI	Ergost-3-ona	NR	NR
XVII	Ergost-4-en-3-ona	NR	NR

NR no hay reportes de su presencia en hongos

Acerca de los compuestos determinados en el micelio de *P. ostreatus*, en los resultados mostrados tanto en los cromatogramas del Anexo 2A como en la tabla 2-6, se observa claramente el efecto producido por los sustratos, posicionando al salvado de trigo como la FC que favorece la producción de triterpenoides, tanto en abundancia como en variedad estructural, los cuales alcanzan título del 49,0%; seguido del maíz amarillo con un valor del 32,3%, calculados por LB. El estigmast-5-en-3-ol (I) es el esteroles con aparición más generalizada en las FC empleadas.

Tabla 2-6. Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de *P. ostreatus*.

	TRITERPENOIDES (%) ^a													
	I	II	V	VI	VII	IX	X	XI	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	TOTAL
CB				NC	NC		NC	NC	NC	NC	NC			NC
AV														----
TR														----
AZ														----
BT	NC			NC										NC
MZ	NC							NC						NC

Continuación tabla 2-6. Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de *P. ostreatus*.

	TRITERPENOIDES (%) ^a													TOTAL	
	I	II	V	VI	VII	IX	X	XI	XIII	XIV	XV	XVI	XVII		
SY															-----
ST	4,7	1,5	1,1	2,0	2,9		1,4	16,0			6,1	11,9	1,4	49,0	
TI				NC	NC									NC	
MP	NC							NC			NC			NC	
SG	12,8				NC									12,8	
MA	8,3		2,3	2,9	1,7	17,1								32,3	

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

CB harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soja; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo.

La variación en la composición de los extractos de *Pleurotus djamor* con las diferentes FC empleadas para su cultivo, se observa en los CG-EM del Anexo 2B y específicamente para los triterpenoides en la tabla 2-7, en la cual se ve claramente que es el salvado de trigo la FC que favorece la biosíntesis de este grupo de bioactivos, con un porcentaje del 52,0% del total de los compuestos determinados en el extracto, representado por 14 estructuras diferentes. Con relación al compuesto estigmast-5-en-3-ol (**I**), como en el caso anterior, es el triterpenoide de aparición más generalizada en las FC

Tabla 2-7: Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de *P. djamor*.

	TRITERPENOIDES (%) ^a														TOTAL
	I	II	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XV	XVI	XVII	XVIII	
CB															-----
AV															-----
TR															-----
AZ	NC														NC
BT								NC							NC
MZ	3,8			NC											3,8
SY															-----
ST	5,7	1,4	1,7	1,9	NC	NC	3,3	1,3	12,0	9,7	5,2	7,2	1,5	1,1	52,0
TI	5,1			NC											5,1
MP	5,1			NC											5,1
SG	7,4				NC	NC									7,4
MA	6,0	NC	NC												6,0

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

CB harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soja; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo.

En lo concerniente con el *P. pulmonarius*, de nuevo es el salvado de trigo el que genera una producción importante de los bioactivos tanto en términos de cantidad como de variación estructural; mientras que al emplear avena y maíz pinto, a pesar de determinar diferentes estructuras, las cantidades en las que estos se producen son no cuantificables por áreas relativas. Con bienestarina, trigo integral y siete granos se genera una producción baja (2,8%-4,1%) y con las harinas de trigo, arroz y maíz la proporción es intermedia (6,9%-11,1%), mayoritariamente representada por el ergosta-5,7,22-trien-3-ol (**IX**). Finalmente empleando soya y maíz amarillo no se favorece la producción de triterpenos (cromatogramas en el Anexo 2D, espectros de masas en el Anexo 2C y Tabla 2-8).

Tabla 2-8: Influencia de las FC no convencionales en la composición porcentual de los triterpenoides presentes en el extracto del micelio de *P. pulmonarius*.

	TRITERPENOIDES ^a									
	I	VI	VII	IX	X	XI	XII	XV	XVI	TOTAL
CB	2,4	1,2	1,6	21,7						26,9
AV	NC		NC	NC		NC		NC		NC
TR			1,5	6,0						7,5
AZ	NC		1,5	9,6						11,1
BT			NC	4,1						4,1
MZ	1,9		1,7	3,3						6,9
SY										-----
ST	3,2	1,5	1,3	16,3	0,7	5,2	3,3	3,2	3,4	38,1
TI			2,8							2,8
MP	NC	NC					NC		NC	NC
SG	1,5	NC					NC		1,5	3,0
MA										-----

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

CB harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soya; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo.

El triterpenoide común encontrado en las especies estudiadas es el estigmast-5-en-3-ol (**I** sitosterol), que aunque se ha aislado de hongos macromicetos (164), se le conoce como el esteroles típico del reino plantae y corresponde al triterpenoide mayoritario determinado en la mayoría de las FC empleadas en este estudio (Tabla 2-3). El ergost-5-en-3-ol (**II** campesterol) y el estigmastanol (**V** sitostanol), también se han reportado como componentes de algunos cereales como el salvado de arroz, salvado de trigo, trigo, cáscara y salvado de avena y fibra fina de maíz (157, 159, 160), e igualmente fueron determinados en el producto biotecnológico, lo que permite considerar la posibilidad de que la presencia de los mismos en las especies de *Pleurotus* obtenidas por FEL, corresponda no solamente a su biosíntesis por parte de los hongos sino también a procesos de incorporación a partir del sustrato,

fenómeno ya reportado por nuestro grupo en FES para este género (117). En los extractos de los BP se determinó **I** en todas las FC a excepción de la harina de arroz y bienestarina, resultado que soportaría lo propuesto, pero que no permite realizar una generalización puesto que en algunos casos, como ocurre con *pulmonarius* y *djamor* cultivados empleando arroz y en *ostreatus* con bienestarina, este compuesto parece ser biosintetizado por el hongo. A pesar de estas observaciones, únicamente se podrían confirmar los procesos de incorporación realizando una fermentación con marcaje del sitosterol empleado como componente del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos demuestran que hay una incidencia apreciable de la FC empleada para el cultivo biotecnológico en la biosíntesis de compuestos triterpenoidales en las tres especies de *Pleurotus*, que se refleja tanto en términos de variaciones estructurales como en las cantidades biosintetizadas por los organismos.

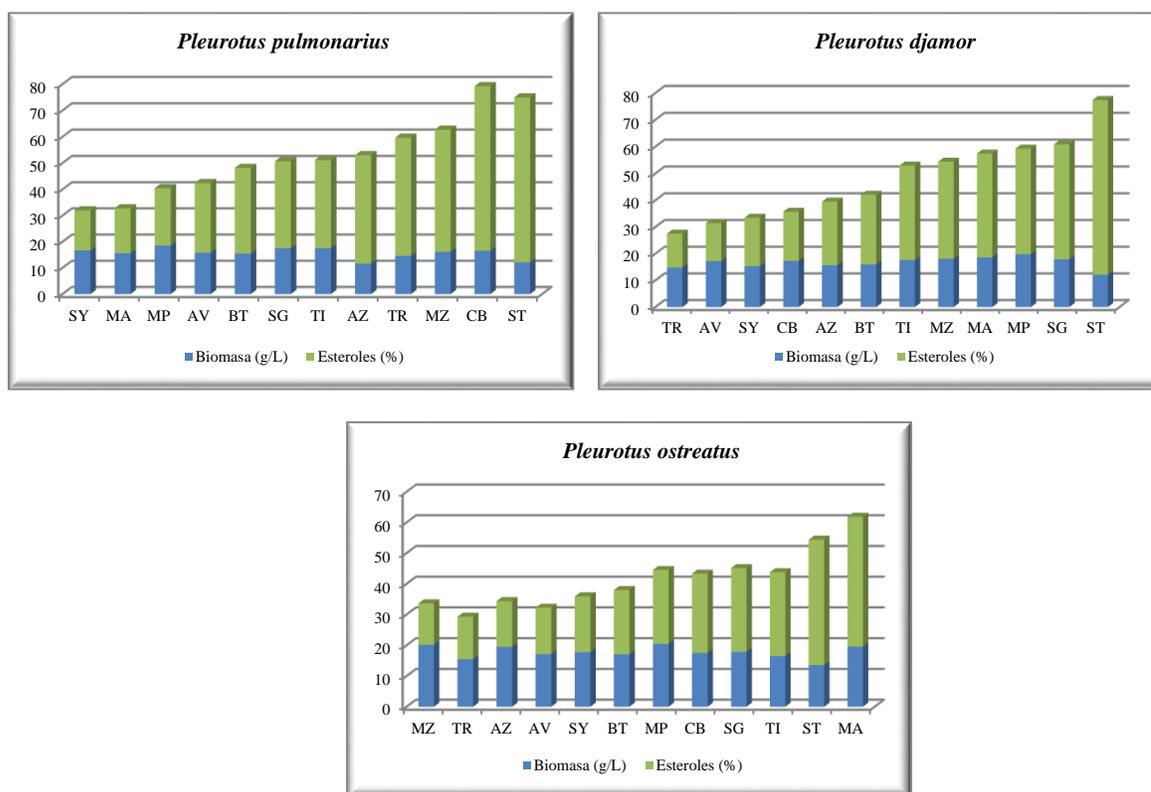
Si bien estudios similares se han realizado en *Pleurotus*, estos se han centrado en la producción de polisacáridos, proteínas, lípidos y biomasa micelial, empleando diferentes carbohidratos como fuente de carbono, variando el contenido de nitrógeno de los sustratos (87) o evaluando la producción de ácidos grasos y triterpenos, pero en fructificaciones obtenidas por FES con residuos de la industria agrícola (119). Éste es el primer reporte enfocado en la producción de compuestos triterpenoidales para este género utilizando en FEL medios de cultivo no convencionales.

En el estudio hecho por Zapata et. al se evaluó la incidencia del uso de las harinas de cebada, avena, trigo, maíz, arroz, mijo y bienestarina, sobre la producción de EPS, IPS y ácidos ganodéricos en *Ganoderma lucidum*. Los autores determinaron que la producción de los tres grupos de metabolitos es mayor al emplear 50 g/L de cebada, resultados que contrastan con lo encontrado en este estudio para *Pleurotus djamor* y *ostreatus* en los que con esa FC no hay una producción alta de esteroides (Figura 2-10) y los que fueron determinados están en proporciones no cuantificables. Caso contrario se observa con *P. pulmonarius*, con el cual el empleo de la harina de cebada, si favorece la biosíntesis de los triterpenoides e incluso, como se mencionó anteriormente, es la FC junto con el salvado de trigo con la que se obtiene la mayor producción de los metabolitos. Estos resultados confirman una vez más que el comportamiento de cada organismo es particular, produciendo respuestas diferentes a las variables que afectan una FEL, para este caso la variación de la composición del medio de cultivo, y que este comportamiento cambia incluso entre especies del mismo género.

Del análisis de la figura 2-12 se puede deducir con facilidad que hay una mayor incidencia de las harinas en la producción de esteroides que en la biomasa. Se presentan casos particulares como el de

P. pulmonarius cultivado con harina de arroz que genera la más baja producción de biomasa pero un contenido de esteroides intermedio; el *P. djamor* obtenido empleando maíz pinto, maíz amarillo y maíz en el que hay la más alta producción de biomasa y asociada a ésta el contenido de esteroides es intermedio. La ausencia de una relación entre estas dos variables es también evidente en el *P. ostreatus* en el que la producción de biomasa es alta con maíz amarillo, pinto y maíz pero las cantidades de esteroides están en tres límites diferentes entre alto (42,3%), bajo (13,4%) y medio (24,0%) respectivamente. Estos resultados son contrastantes con los estudios realizados sobre la producción de ácidos ganodéricos, en los que se ha determinado una relación directa biomasa – bioactivos (3, 4), lo que corrobora que la producción es dependiente del género y de la especie.

Figura 2-12: Relación entre la biomasa y la producción de esteroides en *Pleurotus djamor*, *pulmonarius* y *ostreatus*



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Teniendo siempre presente que objetivo primordial de la presente investigación como es la evaluación de la incidencia de cada una de las FC estudiadas sobre el potencial nutriceútico de los productos biotecnológicos obtenidos a través de FEL de *Pleurotus*, que en este caso particular está dado por los compuestos triterpenoidales, metabolitos producidos en mayor proporción, la unión de

todos los resultados hasta aquí obtenidos permiten determinar que el empleo del salvado de trigo, independientemente de la especie, genera la mayor variedad estructural de los metabolitos, así como altas producciones en términos de esteroides, resaltando el micelio del *P. djamor* en el que se determinaron catorce estructuras diferentes, lo que se reflejaría bien sea en un espectro más amplio de actividades biológicas de los micelios o en la potenciación de las ya reconocidas bioacciones para los triterpenoides presentes en él, mediante fenómenos de sinergismo. Lo anterior proporcionaría un mayor valor nutriceúutico a esta especie de *Pleurotus*. Sin embargo, no sólo la cantidad de bioactivos define ésta cualidad ya que también debe proporcionar buen aporte de nutrientes, parámetro que se mide en función de la biomasa producida. Si bien es cierto que las producciones de micelio con esta FC son bajas frente a las harinas restantes, cabe recordar que la eficiencia empleando los medios de cultivo de la presente investigación es alta comparada con lo reportado en literatura. En este orden de ideas y contemplando la importancia de tener un equilibrio entre producción de potenciales bioactivos y de biomasa, teniendo en cuenta que esta última es la contribuyente de las características nutricionales de los hongos comestibles, un nutriceúutico ideal se obtendría, como primera opción, con *P. djamor* cultivado en salvado de trigo, quedando abierta la posibilidad de obtenerlo a partir de *Pleurotus ostreatus* empleando harina de maíz amarillo para su cultivo o de *P. pulmonarius* en harina de cebada. La selección final estaría condicionada a estudios tanto de actividad biológica como de la incidencia del cambio de FC en los costos finales del proceso.

2.4. CONCLUSIONES

- No existe una relación directa entre la producción de biomasa y la de los compuestos triterpenoidales, no obstante, en términos generales el empleo del salvado de trigo, independientemente de la especie, estimula la biosíntesis de una mayor variedad estructural de los triterpenoides pero con una producción de biomasa baja. Sin embargo su potencial como nutriceúutico es alto debido precisamente a esa variación estructural que se puede ver reflejada en una mayor diversidad de acciones biológicas.
- Se determinaron diecisiete triterpenoides: nueve con núcleo ergostano, siete estigmastano y un colestano; correspondientes a dos triterpenos, ocho esteroides y siete cetonas esteroidales.
- No hay excreción de triterpenoides a los medios agotados.
- Tanto la especie como la fuente de carbono afectan la producción de triterpenoides.
- Para la especie *P. pulmonarius* la harina de cebada y el salvado de trigo son una buena alternativa para favorecer la producción de esteroides con la ventaja en el primer caso de que se obtiene una mayor cantidad de biomasa.

- Para *P. ostreatus* la harina de maíz amarillo y el salvado de trigo serían las FC de elección destacándose la primera de ellas por la generación de una mayor biomasa.
- Para *P. djamor* el salvado de trigo se constituye en la fuente de carbono ideal para la obtención de un producto biotecnológico con buena calidad nutriceútica
- Con respecto al comportamiento de las especies, *Pleurotus pulmonarius* produce la mayor cantidad de esteroides en seis de las FC utilizadas, seguido por el *P. djamor* en el que este comportamiento se observó en cinco de las FC y por último el *P. ostreatus* únicamente para el caso del uso de la harina maíz amarillo.
- No hay una correlación directa entre el contenido de carbohidratos, C, N, cenizas, materia seca, grasas y relación C/N de las harinas sobre la producción de triterpenoides.

**CAPITULO 3. IMPLEMENTACIÓN DEL
MÉTODO DE CLAE-UV PARA DETERMINAR
LA PRESENCIA DE ESTATINAS**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CV	Coefficiente de variación
DAD	Arreglo de diodos
EM	Espectrometría de masas
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril CoA reductasa
LD	Límite de detección
LLE	Extracción líquido-líquido
LOVH	Lovastatina hidroxiaácido
LOVL	Lovastatina en forma lactónica
LQ	Límite de cuantificación
PRA	Pravastatina
SIMH	Simvastatina hidroxiaácido
SIML	Simvastatina en forma lactónica
SOE	Extracción con disolventes orgánicos sobre matrices sólidas
SPE	Extracción en fase sólida
UV	Ultravioleta

3.1. ANTECEDENTES

En la comunidad científica día a día se trabaja en la búsqueda de medicamentos que ayuden a la solución de diferentes dolencias que aquejan a la sociedad, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares, en particular la enfermedad coronaria, considerada la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, siendo la aterosclerosis el común denominador dentro de la mayoría de los pacientes. Aunque el desarrollo de esta enfermedad depende de una compleja interacción entre diversos factores y procesos, se ha establecido una clara asociación entre los niveles elevados de colesterol en plasma y su evolución (176). Las estatinas han demostrado ser una excelente alternativa para reducir los niveles de colesterol y adicionalmente presentan un importante número de efectos pleiotrópicos, definidos éstos como todas aquellas bioacciones de un medicamento que son independientes de las originales para la que fue concebido (177). Las primeras estatinas descubiertas fueron aisladas de hongos micromicetos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus* (151, 178-187) y posteriormente se evidenció que las especies del género *Pleurotus*, son los macromicetos productores por excelencia de este tipo de compuestos (188-193). La mayoría de los reportes actuales están relacionados con la optimización de procesos para su producción biotecnológica a partir de micromicetos, así como su determinación en aguas residuales, orina y sangre. Estos antecedentes dirigen la necesidad de explorar la producción de estos metabolitos en especies de *Pleurotus*, lo que hace prioritario desarrollar un método

que sea aplicable a los productos biotecnológicos obtenidos por FEL, con el objetivo de lograr detectar de una forma, selectiva, específica y sensible el mayor número de las estatinas que se pudieran obtener como producto de este tipo de procesos.

3.1.1. Las estatinas: generalidades

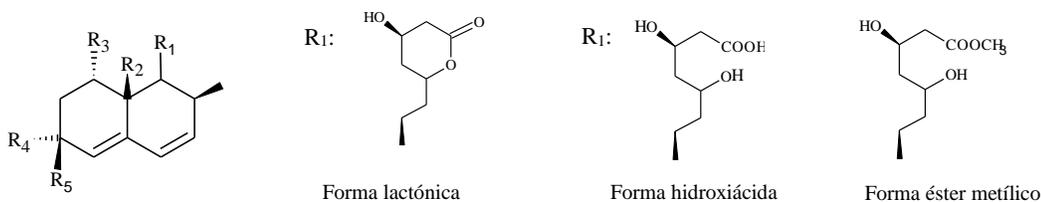
Las estatinas son un grupo de compuestos bioactivos empleados principalmente para reducir los niveles de colesterol a través de la inhibición competitiva de la Hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) por la similitud estructural entre la enzima y el medicamento.

En términos generales dependiendo de su procedencia se las ha clasificado en dos grupos: las naturales o generadas desde procesos fermentativos conocidas como tipo I y las sintéticas o de tipo II. Con respecto a la primera de estas agrupaciones han sido reportadas y se encuentran

comercialmente disponibles la lovastatina (Mevacor®, Merck Frosst), pravastatina (Pravachol®, Bristol-Meyers Squibb) y simvastatina (Zocor®, Merck Frosst) (194). De igual forma se han encontrado otras estructuras, bien sea acompañando a las anteriores y en proporciones más bajas o generadas por transformaciones microbianas llevadas a cabo en busca de análogos más activos o con mejores propiedades farmacocinéticas. Como consecuencia de esto han sido reportadas cerca de 40 estructuras diferentes, dentro de las que se encuentran tanto los metabolitos secundarios (57%) como productos de bioconversión (43%) obtenidos generalmente a partir de lovastatina, compactina o simvastatina, empleando micromicetos y bacterias (195).

En la figura 3-1 se encuentran las estructuras de las estatinas tipo I, que poseen una mayor porción policétida que las del tipo II y que presentan en común el anillo hexahidronaftaleno funcionalizado con un éster α -metilbutírico y una β -hidroxi- δ -lactona enlazada por un puente etilénico, pero difieren las unas de las otras en la posición y el tipo de sustituyentes sobre los anillos y la cadena lateral (154, 196). El anillo de la β -hidroxi- δ -lactona de estos compuestos puede sufrir una apertura hidrolítica y convertirse en los correspondientes ácidos 3',5'-dihidroxiheptanoicos, que son las formas activas y las responsables del efecto inhibitor de la HMG-CoA reductasa (197).

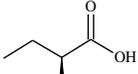
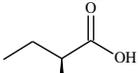
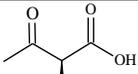
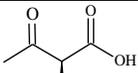
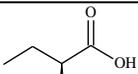
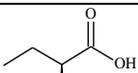
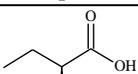
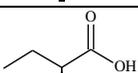
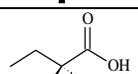
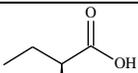
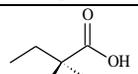
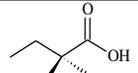
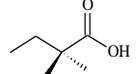
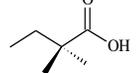
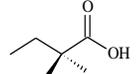
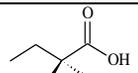
Figura 3-1: Estructuras de las estatinas tipo I que han sido reportadas hasta la actualidad.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	NOMBRE	REF.
Lactona	H	H	H	H	ML-236C ^a	(198)
Lactona	H	OH	H	H	ML-236A ^{a,b}	(198, 199)
Lactona	H	H	CH ₃	H	Monacolina L ^a	(200)
Hidroxiácido	H	H	CH ₃	H	Hidroxiácido monacolina L ^a	(201)
Lactona	H	OH	H	CH ₃	Monacolina J ^{a,b}	(200, 202)
Hidroxiácido	H	OH	H	CH ₃	Hidroxiácido monacolina J ^a	(178)
Ester metílico	H	H	CH ₃	H	^a	(203)
Lactona	H		H	H	Compactina ^a	(204)
Lactona	H		OH	H	3 α -Hidroxicompactina ^b	(204, 205)
Lactona	H		CH ₃	H	Monacolina M ^a	(206)
Hidroxiácido	H		CH ₃	H	Hidroxiácido monacolina M ^a	(206)

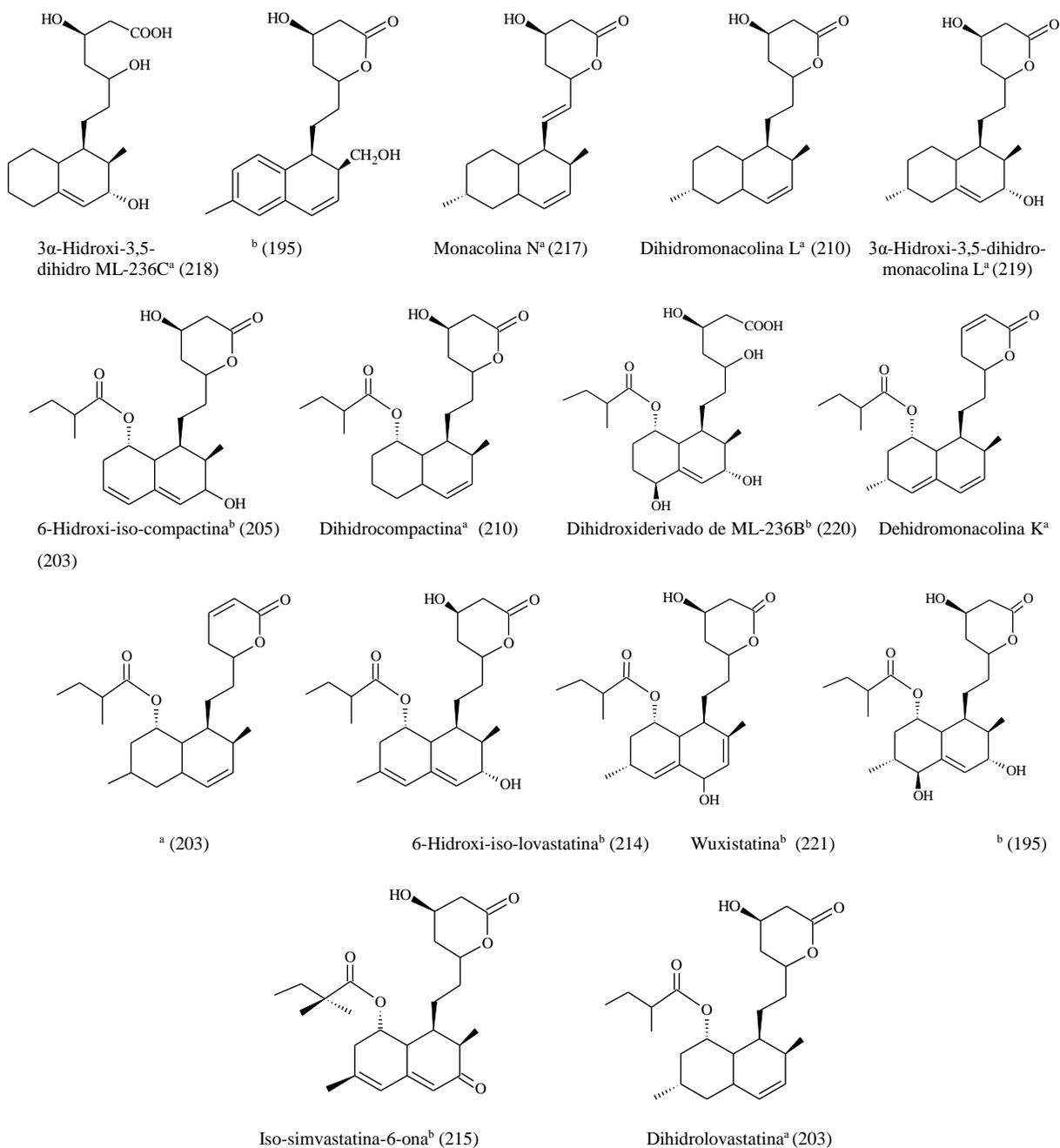
a) Metabolitos secundarios; b) productos de biotransformación.

Continuación figura 3-1: Estructuras de las estatinas tipo I que han sido reportadas hasta la actualidad.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	NOMBRE	REF.
Lactona	OH		H	H	8a-Hidroxicompactina ^b	(204, 207)
Hidroxiácido	H		OH	H	Pravastatina ^{a,b}	(153, 208, 209)
Lactona	H		CH ₃	H	Monacolina X ^a	(210)
Hidroxiácido	H		CH ₃	H	Hidroxiácido monacolina X ^a	(201)
Lactona	H		CH ₃	H	Lovastatina ^a	(190, 211-213)
Hidroxiácido	H		CH ₃	H	Hidroxiácido lovastatina ^a	(190, 211-213)
Ester metílico	H		CH ₃	H	^a	(203)
Lactona	OH		CH ₃	H	8a-Hidroximonacolina K ^b	(207)
Lactona	H		OH	H	Huvastatina ^b	(203)
Lactona	H		CH ₃	OH	3β-Hidroximonacolina K ^b	(214)
Lactona	H		H	COOH	3β-Carboxi-3α-desmetilsimvastatina ^b	(215)
Lactona	H		CH ₃	H	Simvastatina ^b	(213)
Hidroxiácido	H		CH ₃	H	Hidroxiácido simvastatina ^b	(213)
Lactona	H		CH ₃	OH	6-Hidroxisimvastatina ^b	(216)
Lactona	H		H	CH ₂ OH	3β-Hidroximetil-3α-desmetilsimvastatina	(215)
Lactona	H		H	CH ₂ OH	3α-Hidroximetil-3α-desmetilsimvastatina	(215)

a) Metabolitos secundarios; b) productos de biotransformación.

Continuación figura 3-1: Estructuras de las estatinas tipo I que han sido reportadas hasta la actualidad.

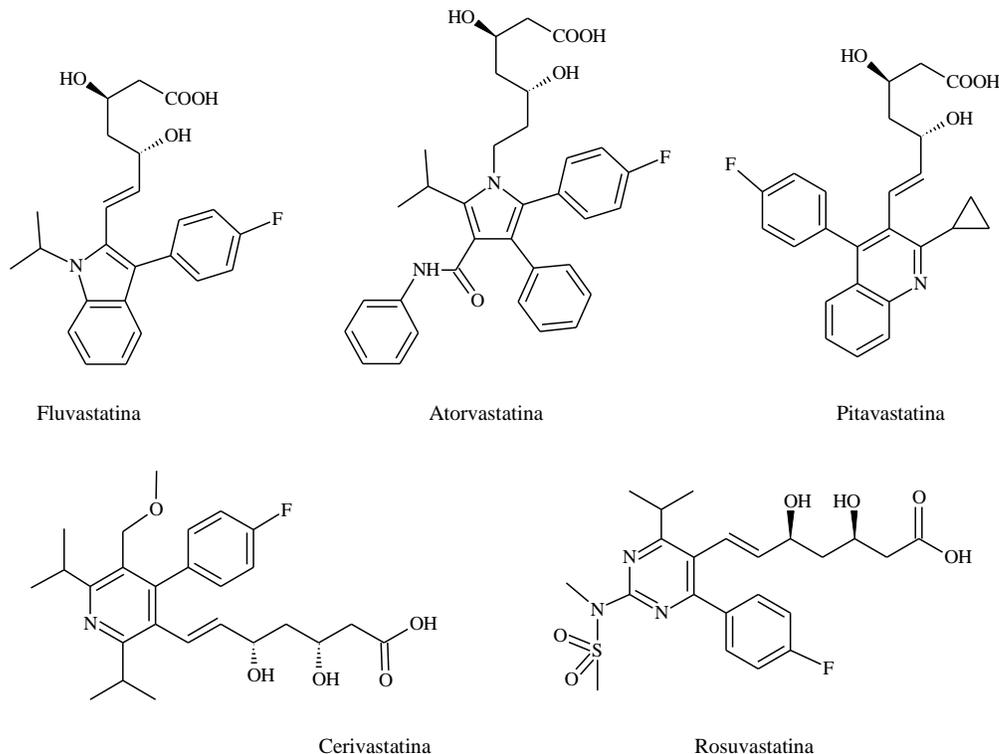


a) Metabolitos secundarios; **b)** productos de biotransformación.

Las estatinas tipo II (Figura 3-2) son el resultado de las síntesis diseñadas en búsqueda de un aumento de las cualidades farmacológicas de las estatinas naturales, sin embargo, producen un mayor número de efectos colaterales, siendo los más relevantes su hepatotoxicidad y miotoxicidad, lo que ha llevado incluso a que algunas hayan sido retiradas voluntariamente del mercado (196, 222). Sus estructuras

son distintas entre sí y muy diferentes a las estatinas naturales. Únicamente la porción afín con la HMG-CoA reductasa responsable de su acción inhibitoria, es común a ambos tipos de compuestos (213). Todas ellas son de magnitud molecular más grande que las naturales y tienen en común una cadena lateral fluorofenil, un grupo isopropil y un ácido heptenoico (223).

Figura 3-2: Estructuras de las estatinas tipo II (196).

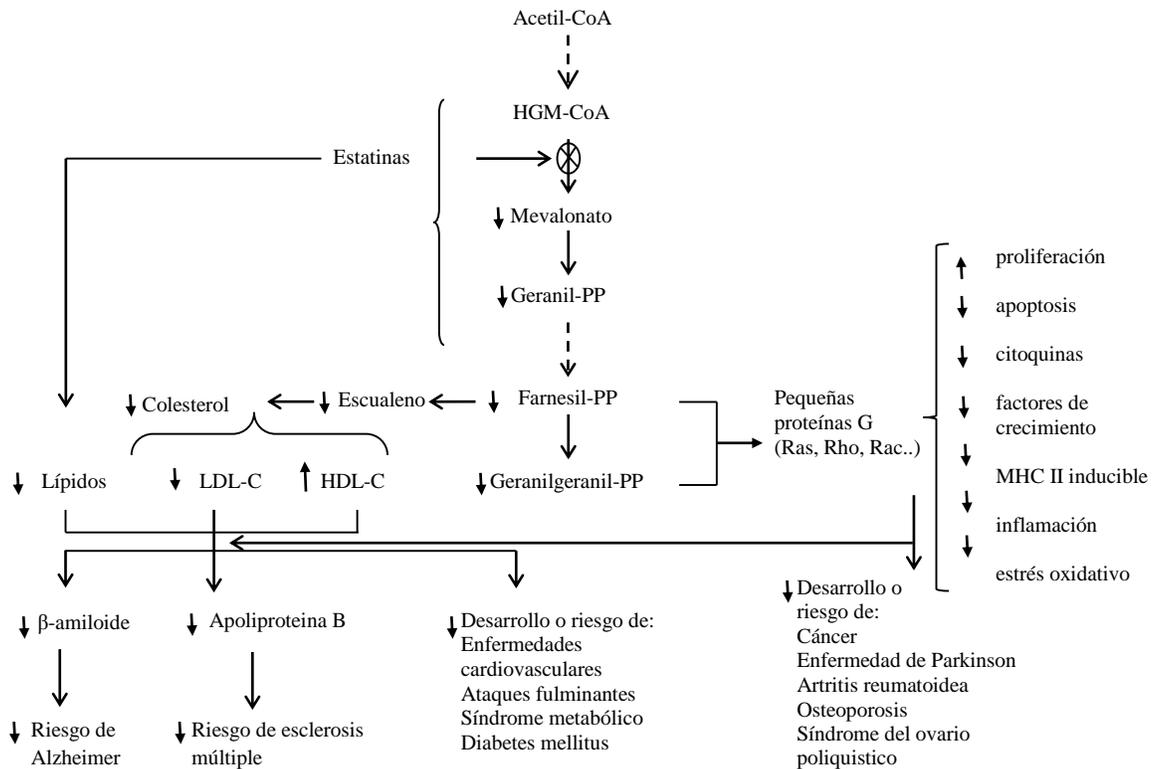


Los efectos pleiotrópicos de las estatinas pueden explicarse con base en los pasos metabólicos de L-mevalonato: mientras que algunos de los metabolitos están directamente involucrados en la síntesis de colesterol, otros impactan numerosos sistemas biológicos como se puede observar claramente en la figura 3-3 (178). Estos efectos permiten su empleo en el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, cardiopatías no isquémicas, enfermedades auto inmunes como la artritis reumatoidea y la diabetes mellitus, en la prevención de fracturas óseas y en la reducción en la incidencia de algunos tipos de cáncer (196).

La reunión de las propiedades descritas de las estatinas relacionadas con sus múltiples usos en la medicina, han obligado al desarrollo de diferentes técnicas analíticas que permitan cuantificar sus niveles en muestras biológicas, plasma y productos fermentados, con el objetivo de poder determinar

su distribución en éstas matrices, bien sea para aplicar en estudios ambientales y/o de la optimización de procesos biotecnológicos para su producción.

Figura 3-3: Esquema explicativo de los efectos pleiotrópicos de las estatinas (178).



3.1.2. Técnicas de extracción, separación e identificación

El interés por el desarrollo de técnicas óptimas para la determinación de estatinas en formulaciones farmacéuticas y en matrices biológicas, que requieren el uso indispensable de procedimientos para la eliminación de interferencias, ha estimulado la evaluación de técnicas que permitan lograr este objetivo en menor tiempo y de manera más directa. Entre las metodologías empleadas para su aislamiento se incluyen extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y extracción con disolventes orgánicos sobre matrices sólidas (SOE) (224) y para su separación la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) y la cromatografía de gases (CG), siendo la primera de ellas la más empleada, prevaleciendo la utilización de fases reversas y el uso de detectores UV y DAD, raramente se emplean detectores de fluorescencia o de espectrometría de masas (EM) (224).

La tabla 3-1 presenta, a manera de ejemplo, algunos de los métodos de extracción y separación empleados actualmente.

Tabla 3-1: Métodos de extracción, separación e identificación empleados para el estudio de las estatinas (154).

ESTATINA	MATRIZ	EXTRACCIÓN	TECNICA DE SEPARACIÓN	DETECTOR	REF.
LOVL	380 cepas fúngicas	SOE	CLAE	UV	(192)
LOVL	Fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i>	SOE	CLAE	UV	(192, 225)
LOVL, COM, PRAH y Monacolina J	Caldo de cultivo y micelio de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE y SOE	CLAE	UV	(153)
LOVL, PRAH, COM y Monacolina J	Micelio y medio agotado de <i>Aspergillus</i> y <i>Monascus</i>	SOE, LLE	CLAE	UV	(202)
LOVL LOVH	Plasma	SPE	CLAE	UV	(226)
LOVL	Micelio de <i>Monascus ruber</i>	SOE	CLAE	UV	(227)
LOVH	Medio agotado de <i>Aspergillus terreus</i>	Dilución	CLAE	UV	(228)
LOVL LOVH	Estándar	SOE	CLAE CE	UV	(229)
PRAH LOVL SIML	Muestras acuosas	SPE	LC	MS/MS	(230)
LOVL	Micelio, medio agotado y fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i>	SOE	CLAE	UV	(188, 189)
SIM	Preparaciones farmacéuticas	SOE	HPTLC	Densitometría de barrido	(231)
LOVL	Arroz rojo fermentado	SOE	CLAE	DAD	(232)
LOVL, LOVH	<i>Monascus ruber</i>	SOE	CLAE	DAD	(186)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE	CLAE	UV	(233)
PRAH	Caldo de fermentación	Dilución	CLAE EC	UV	(234)
SIML SIMH	Plasma humano	SPE	CLAE	MS/MS	(235)
LOVH	Micelio de <i>Aspergillus flavipes</i>	SOE	CLAE	UV	(236)
PRAH	Plasma y orina	SPE	CLAE	UV	(237)
LOVL, LOVH, SIML, SIMH, PRAH	Te Pu-Erh	SPE	CLAE	UV	(238)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	Dilución	CLAE	UV	(239)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE	CLAE	DAD	(184)
LOV	Capsulas de <i>Monascus</i>	SOE	HPCE	UV-VIS	(240)
COM	<i>Penicillium brevicompactum</i>	SOE	CLAE	UV	(241)
PRAH	Productos farmacéuticos	Dilución	CE MEZC	DAD	(242)
PIT	Plasma humano	LLE	LC	MS-MS	(243)

Continuación tabla 3-1: Métodos de extracción, separación e identificación empleados para el estudio de las estatinas (154).

ESTATINA	MATRIZ	EXTRACCIÓN	TECNICA DE SEPARACIÓN	DETECTOR	REF.
LOVH COM, y otras 2 estatinas	Arroz rojo fermentado	SOE	CLAE LC	DAD MS	(244)
PRAH, LOV, SIM	Estudio de estabilidad	Dilución	CLAE LC	DAD MS	(245)
PRAH	Aguas residuales	SPE SBSE DLLME	CLAE	DAD Q-TOF-MS	(194)

SIMH:	Hidroxiácido simvastatina	LOVL:	Lovastatina en forma lactónica
PRAH:	Pravastatina	SIML:	Simvastatina en la forma lactónica
LOVH:	Hidroxiácido lovastatina	COM:	Compactina
FLU:	Fluvastatina	ROS:	Rosuvastatina
ATO:	Atorvastatina	SPE:	Extracción en fase sólida
LLE:	Extracción líquido-líquido	SOE:	Extracción con disolventes orgánicos
UPLC:	Cromatografía líquida de ultrarendimiento	HPCE:	Electroforesis capilar de alta eficiencia
CE:	Electroforesis capilar	HPTLC:	Cromatografía en capa fina de alta eficiencia
SBSE:	Extracción por sorción en barra de agitación	DLLME:	Microextracción dispersiva líquido-líquido
MEKC:	Cromatografía capilar electrocinética miceliar		

Del análisis de la tabla 3-1, se puede deducir que el avance en la detección separación e identificación de las estatinas en macrohongos, no ha ido a la par con el de los micromicetos y el de las matrices biológicas. Un caso particular y que reviste especial interés es el de la producción biotecnológica de hongos productores de estatinas, empleando harinas de cereales y leguminosas como FC, en donde el medio de cultivo agotado puede presentar estatinas excretadas, las cuales se encuentran en una matriz más compleja que cuando proviene de medios de cultivo tradicionales, lo que acrecienta la necesidad de contar con una técnica de detección y separación rápida y eficiente aplicable a esta clase de matrices.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Materiales

Los patrones de las estatinas lovastatina (LOVL) y simvastatina (SIML) en su forma lactónica y la pravastatina (PRA), fueron obtenidos desde los medicamentos genéricos comerciales. Las soluciones de LOVL y SIML se prepararon mediante disolución de los medicamentos en acetonitrilo. La PRA, debido a que comercialmente se encuentra disponible como la sal del hidroxiácido, se disolvió en una mezcla de acetonitrilo:ácido fórmico 0.1% (55:45). Las disoluciones de todas las estatinas se centrifugaron para eliminar los excipientes remanentes y el sobrenadante se empleó para la preparación de las soluciones. Con respecto a LOVH (lovastatina hidroxiácido) y SIMH (simvastatina hidroxiácido) éstas fueron obtenidas mediante un proceso de hidrólisis de sus correspondientes formas lactónicas. Todas las diluciones necesarias se realizaron con la fase móvil a emplear en CLAE, partiendo de un stock de 0,1 mg/mL.

3.2.2. Optimización de las condiciones de hidrólisis de LOVL

El método se basó en lo reportado por Yang et al.(238) introduciendo el uso de sonicación (60 min y 90 min) y de reflujo (90 min) durante el proceso de hidrólisis. El ensayo preliminar se realizó con LOVL adicionando 1mg a la solución de la base (NaOH 0,1 M o KOH 0,05 M en acetonitrilo:agua) y colocando, en el caso de la sonicación, la mezcla en un baño a 35 °C durante el tiempo determinando según cada uno de los diez ensayos realizados (Tabla 3-2). Posteriormente se neutralizaron los productos de la reacción con HCl 0,05 M. Adicionalmente se empleó la metodología descrita por Casas-López (151), analizando para cada caso los productos de la hidrólisis por CLAE-UV y por CCD, empleando en esta última técnica una mezcla CH₂Cl₂:Ácido acético (85:25, v/v) como fase móvil y verde de bromocresol como revelador (246).

Tabla 3-2: Condiciones ensayadas para la optimización de la hidrólisis de LOVL.

Numero	Base	ACN (%)	Método	Tiempo (min)
1	NaOH	25	Sonicación	60
2	NaOH	25	Sonicación	90
3	NaOH	50	Reflujo	90
4	NaOH	50	Sonicación	60
5	NaOH	50	Sonicación	90
6	KOH	25	Reflujo	90
7	KOH	25	Sonicación	60
8	KOH	25	Sonicación	90
9	KOH	50	Sonicación	90
10	KOH	50	Sonicación	60
11	NaOH:EtOH (1:1)	NA	Reflujo	20

NA no aplica

3.2.3. Determinación analítica de las estatinas

3.2.3.1. Equipos

Los análisis por CLAE fueron realizados en un equipo compuesto por dos bombas cromatográficas Shimadzu LC-9A, horno para columnas Shimadzu CTO-6A e inyector automático Shimadzu SIL-6B, manejados por un controlador Shimadzu SCL-6B. El detector UV usado fue un Agilent 1260 VWD (G1314B) operado a 237 nm y para el procesamiento de los datos se empleó el software GC A5000 Workstation. La fase estacionaria fue una columna C18 Thermo Hypersil GOLD® de 150 x 4.6 mm (partículas de 5 µm) mantenida a una temperatura de 30 °C. Como fases móviles, se emplearon mezclas de acetonitrilo:H₂O modificadas con ácidos como el acético, el fosfórico y el fórmico en diferentes proporciones, flujos de 0,4 mL/min, 0,6 mL/min, 0,8 mL/min y 1,0 mL/min, con modos de elusión isocrático y con gradiente.

3.2.3.2. Evaluación de los parámetros analíticos del método CLAE-UV

La linealidad se determinó preparando soluciones de los patrones entre 0,05 µg/mL y 100 µg/mL, con ocho niveles cada uno por triplicado. Los valores del LD y LQ se estimaron de acuerdo a la metodología descrita por Martos et al. (247). Se prepararon ocho replicas con concentraciones de 3,12 ng/mL para PRA, 6,25 ng/mL para LOVH y SIMH y 12,5 ng/mL para LOVL y SIML. Utilizando los factores de respuesta se determinaron las concentraciones correspondientes a cada una de las áreas y se calculó la desviación estándar de los ocho resultados, multiplicando su valor por tres para el LD (para siete grados de libertad y 99% de nivel de confianza) y por diez para el LQ.

La exactitud y la precisión del método se evaluaron empleando los extractos del micelio y del medio agotado de *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre salvado de trigo como prototipo, en los cuales como se explicó en el capítulo 2, por los análisis de CG-EM se evidenció la presencia de un número importante de compuestos triterpenoidales, resultado que sugiere biosintéticamente la ausencia de estatinas, teniendo en cuenta que si las estatinas, inhibidores de HMG-CoA, estuvieran presentes, no se producirían cantidades apreciables de triterpenoides, lo que cataloga a los extractos mencionados como muestras blancas ideales para evaluar la exactitud y la precisión (197). Se prepararon por cuadruplicado, tres soluciones stock con concentraciones intermedias en la curva de calibración de cada estándar (6 µg/mL, 12 µg/mL y 25 µg/mL).

3.2.4. Determinación del efecto del uso de alcoholes sobre soluciones de LOVL y SIML

Se prepararon soluciones de 1mg/mL de LOVL y SIML en mezclas de metanol:agua (1:1), etanol:H₂O (1:1) y butanol:H₂O (1:1) que fueron analizadas por CLAE-UV a 0 h y 24 h de preparadas.

3.2.5. Estabilidad de las estatinas durante 24 horas

Se preparó una mezcla de los cinco patrones (LOVL, SIML, LOVH, SIMH y PRA) a una concentración de 12 µg/mL y se inyectó continuamente durante 24 h en CLAE-UV. Posteriormente se integraron las áreas correspondientes a cada pico y se calcularon los coeficientes de variación.

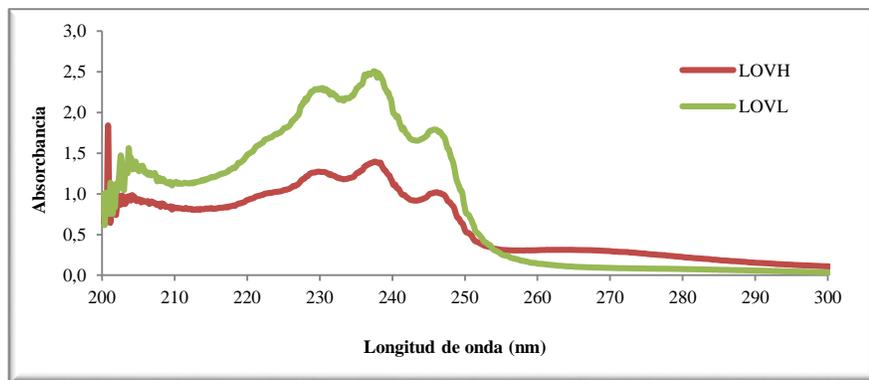
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Optimización de las condiciones de hidrólisis de LOVL

En reportes previos se ha determinado que las estatinas, obtenidas por procesos fermentativos, se encuentran en los micelios y en las fructificaciones en su forma lactónica y en los medios agotados en forma hidroxiláica (153, 184, 202, 248). Con base en lo anterior es importante determinar las condiciones óptimas para poder obtener, a partir de las formas lactónicas, las correspondientes

hidroxiácidas, con el objetivo de emplearlas como patrones para posteriormente identificarlas y cuantificarlas en los productos de FEL y FES de *Pleurotus* empleando CLAE-UV. Independientemente de la forma en la que se encuentren, comparten el mismo cromóforo, un dieno conjugado que presenta un espectro de absorción típico con un máximo a 237 nm y dos hombros a 230 y 246 nm (Figura 3-4).

Figura 3-4: Espectros UV típicos de las estatinas tipo I.



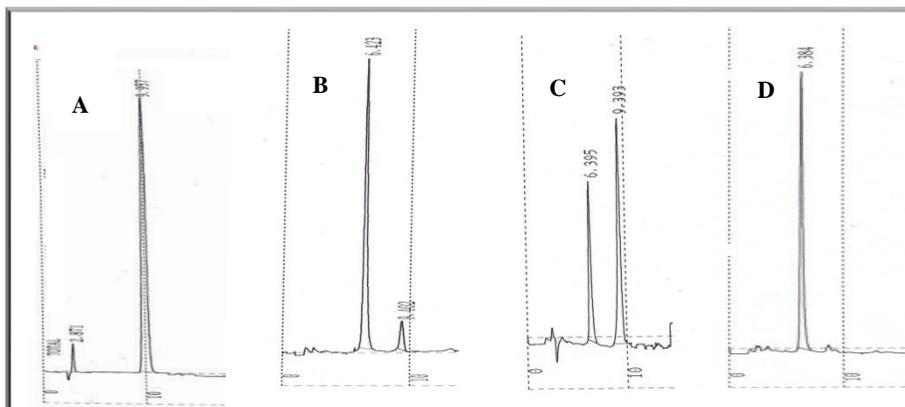
Existe una amplia variedad de reportes relacionados con el procedimiento óptimo para la hidrólisis de las formas lactónicas de las estatinas. Las metodologías evaluadas descritas en la tabla 3-2 surgieron de la combinación de los resultados de esas investigaciones, en las cuales los autores emplean la ayuda de ultrasonido, reflujo, bases con diferentes cationes y tiempos de reacción variados. Los resultados se encuentran en la tabla 3-3 con los porcentajes correspondientes a las formas lactónica e hidroxiácida de la lovastatina obtenidos con los once tratamientos. En la figura 3-5, se muestran los cromatogramas obtenidos para tres de los ensayos con LOVL: B) una solución de KOH 0,05 M preparado en una mezcla de 25% ACN en H₂O con sonicación durante 60 min; C) NaOH 0,1 M en una mezcla de 25% ACN en H₂O con sonicación durante 90 min; D) una solución acuosa de NaOH 0,1 M mezclada en proporciones 1:1 con EtOH sin sonicación. Como se puede concluir del análisis de los cromatogramas mencionados y de los resultados presentados en la tabla 3-6, el método más efectivo, y por ende el seleccionado, fue el reportado por Casas et al. (procedimiento D) (151) que lleva a una hidrólisis del 100% de la forma lactónica en un tiempo corto (20 min), comparado con las otras metodologías. Conjuntamente con los seguimientos de las reacciones por CLAE-UV, se empleó como revelador para CCD verde de bromocresol, observando la presencia de la forma hidroxiácida de la lovastatina (LOVH $R_f = 0,5$; LOVL $R_f = 0,6$) como una mancha de color amarillo que resalta sobre un fondo azul, típico comportamiento de respuesta positiva para la presencia de ácidos carboxílicos con $pK_a < 5$ (LOVH = 4,31) (249).

Tabla 3-3: Porcentaje de hidrólisis obtenidas con los métodos evaluados para la conversión de LOVL-LOVH.

Número de tratamiento ^a	LOVL (%)	LOVH (%)
1	74,3	25,7
2	28,6	71,4
3	1,5	98,5
4	89,3	10,7
5	16,2	83,8
6	94,2	5,8
7	59,6	40,4
8	2,7	97,3
9	1,7	98,3
10	47,5	52,5
11	0,0	100,0

^a Condiciones descritas en el numeral 3.2.2 (Tabla 3-2)

Figura 3-5: Cromatogramas CLAE-UV resultantes de algunos tratamientos empleados para la conversión de LOVL-LOVH.



A) Lovastatina en forma lactónica B) hidrólisis con una solución de KOH 0,05 M preparado en una mezcla de 25% ACN en H₂O con sonicación durante 60 min C) hidrólisis con NaOH 0,1 M en una mezcla de 25% ACN en H₂O con sonicación durante 90 min D) hidrólisis con una solución acuosa de NaOH 0,1 M mezclada en proporciones 1:1 con EtOH.

Los resultados son iguales al emplear SIML, razón por la que las conversiones de las formas lactónicas a las correspondientes hidroxiácidas se realizaron con reflujo durante 20 min de una mezcla de NaOH 0,1 M y etanol (1:1 v/v) a 50°C y posterior neutralización a pH 7 con HCl 0,05 M. La relación reactivo de hidrólisis - muestra es de 2:1 (v/p). El valor de pH final de la solución se seleccionó debido a que es el que permite mantener las estatinas en la forma deseada, evitando las interconversiones o los desplazamientos del equilibrio entre la lactona y el correspondiente ácido. A pH ácido siempre hay una mezcla de las dos formas, a pH básico el equilibrio se desplaza hacia la formación del carboxilato y a pH neutro únicamente se encuentran las formas originales de los analitos.

3.3.2. Determinación de las condiciones cromatográficas óptimas

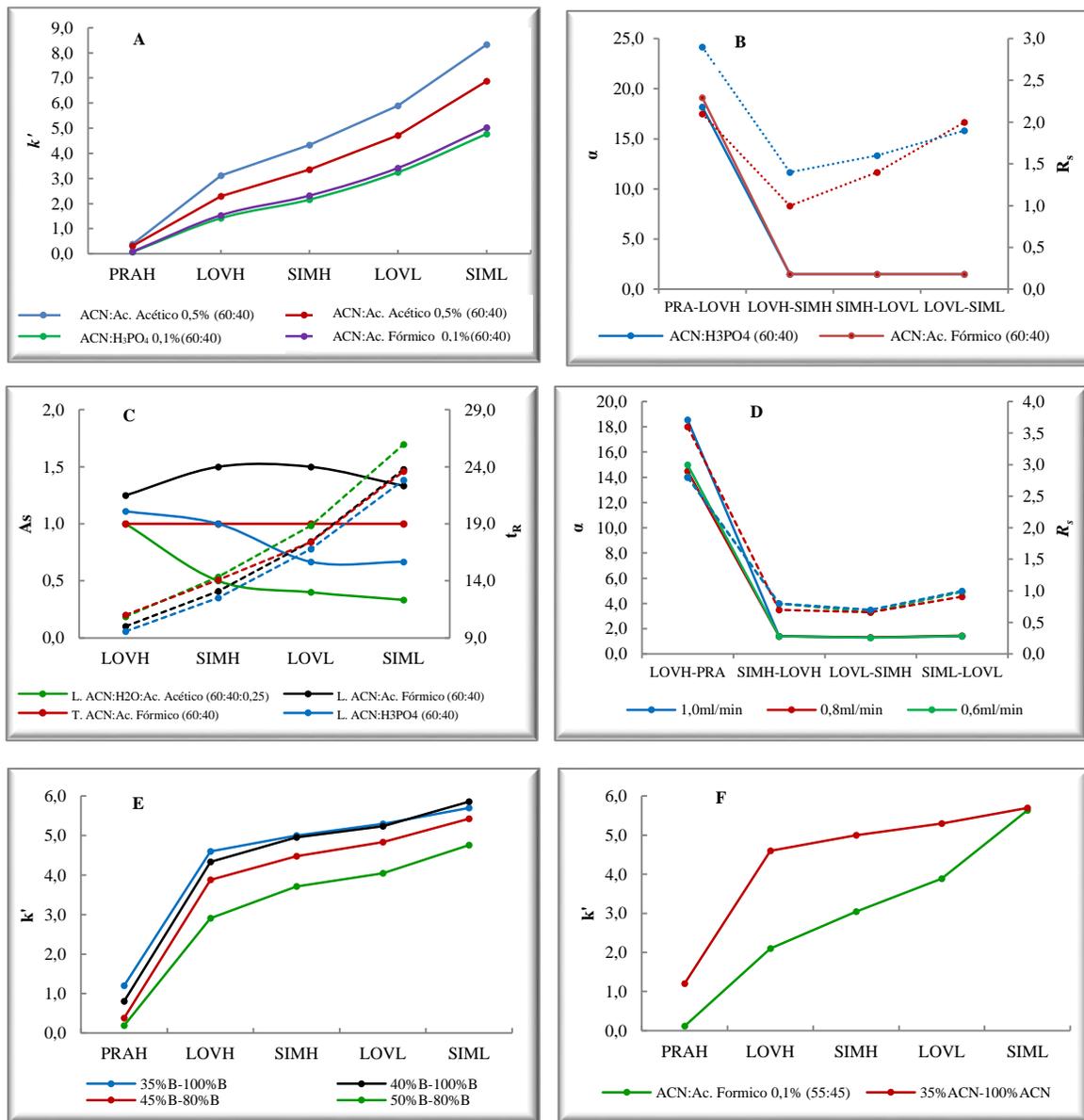
La evaluación de la aplicabilidad de un método cromatográfico de CLAE-UV requiere de la valoración de diferentes variables como son el tipo de fase estacionaria, la composición de la fase móvil, el modo de elución, el flujo y la temperatura del horno, entre otras. A pesar de que existen varios reportes para el análisis de estatinas por este método, la mayoría se enfocan en una sola de ellas (224, 226, 229, 237, 250, 251), a excepción del estudio publicado por Yang et al. (238) investigadores que emplearon la técnica para la determinación de once estatinas en el té Pu-Erh. Adicionalmente, no se han realizado estudios para la determinación de un grupo de cinco estatinas con las FC empleadas en el presente estudio y en el caso particular en los productos de FEL de *Pleurotus*, lo que convierte a los resultados de este trabajo en pioneros.

En las figura 3-6 se encuentra la representación gráfica del efecto de las variables estudiadas sobre los parámetros cromatográficos del sistema. En primer lugar se evaluaron como fases móviles, mezclas de acetonitrilo:H₂O modificadas con los ácidos acético, fosfórico y fórmico en diferentes proporciones. Del análisis de los resultados se determinó que el empleo de una mezcla de ACN:Ácido fórmico al 0,1% (60:40) proporciona los valores óptimos de k' , R_s y α (Figura 3-6 A y B). Con respecto a la fase estacionaria, el cambio del cartucho Lichrocart® RP18 por la columna Thermo hypersil GOLD®, dio como resultado picos con una distribución perfectamente gaussiana sin variar los t_R y por ende tampoco sus k' (Figura 3-6 C). Este comportamiento se debe a que la columna está completamente bloqueada minimizando los grupos silanoles libres, lo que evita los fenómenos de retención mixtos que generan interacciones adicionales con los analitos y por ende eluciones a t_R diferentes, conllevando a la asimetría de los picos. Respecto al flujo, con 1,0 ml/min se acortaron los tiempos de análisis sin sacrificar la selectividad ni la resolución del sistema (Figura 3-6 D). El uso de gradientes permitió obtener valores de k' óptimos para todos los analitos comparado con un sistema isocrático (Figura 3-6 E y F) debido a que, como se sabe, las características del eluyente en este modo de elución se van modificando durante la corrida cromatográfica, consiguiendo con ello una mejor separación de los componentes de la mezcla.

De este modo se seleccionó como sistema cromatográfico una mezcla de ácido fórmico al 0,1% (A) y ACN (B) desde 35% de B hasta 100%, en forma lineal en 15 min como fase móvil, la temperatura del horno 35 °C y la fase estacionaria una columna Thermo Hypersil GOLD®. En el minuto 15 fue necesario realizar un lavado con MeOH debido a que se evidenció prevalencia de los analitos en el

puerto de inyección. El tiempo total de análisis es de 20 min incluyendo la estabilización de la columna.

Figura 3-6: Efecto del cambio de las variables estudiadas sobre los parámetros cromatográficos.

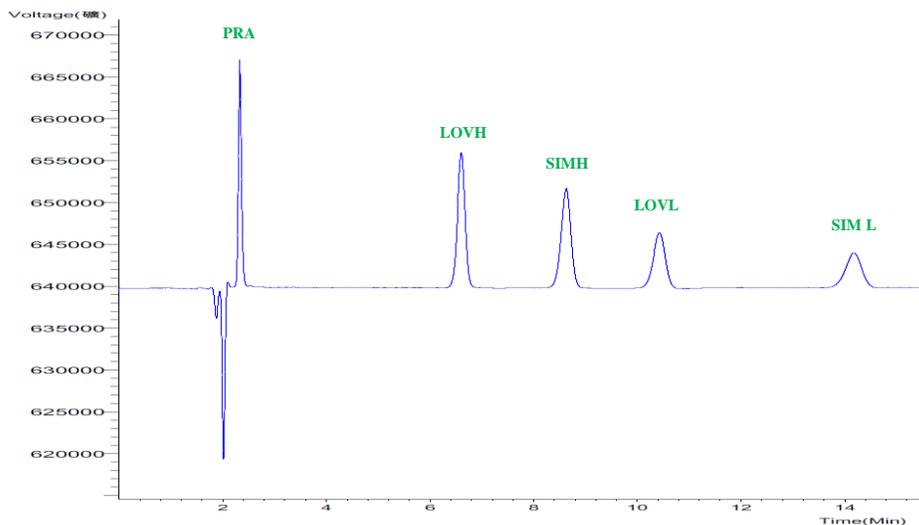


- A) Cambio de la fase móvil sobre k' . Cartucho Lichocart® 125-4 mm. Lichrospher® 100 RP18 de 5 μ m. 0,4ml/min.
- B) Comparación del uso de H₃PO₄ y ácido fórmico sobre α (\rightarrow y R (\leftarrow)). Cartucho LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m). 0,4 ml/min.
- C) Efecto de la fase móvil y la fase estacionaria sobre la simetría A_s (\rightarrow t_R (\leftarrow)). Cartucho LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) (L). Columna Thermo Hypersil GOLD® 150-4,6 C18 (5 μ m) (T). 0,4 ml/min.
- D) Efecto del cambio en el flujo sobre α (\rightarrow y R (\leftarrow)). Columna Thermo Hypersil GOLD® 150-4,6 C18 (5 μ m).
- E) Efecto de diferentes gradientes de elución sobre k' . Ácido fórmico 0,1% (A) y ACN (B). Columna Thermo Hypersil GOLD® 150-4,6 C18 (5 μ m). 1,0 ml/min.
- F) Comparación de los modos de elución sobre k' . Columna Thermo Hypersil GOLD® 150-4,6 C18 (5 μ m)

Este método tiene la ventaja adicional, comparado con el reportado por Yang et al. (238) y con el modo de elución isocrático (Figura 3-7), de que con el gradiente empleado, la PRA tiene una mayor

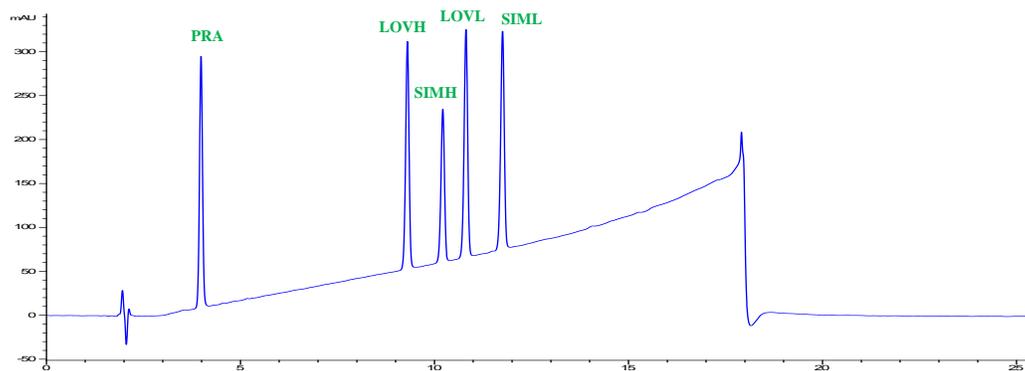
interacción con la fase estacionaria y permite separar interferencias polares que puedan estar presentes en los extractos evaluados, facilitando así la detección de PRA o de algún derivado estructural con una polaridad similar (Figura 3-8).

Figura 3-7: Cromatograma CLAE-UV de la mezcla de los estándares (0,1 mg/mL) en un sistema de elución isocrático.



ACN:Ácido fórmico 0,1% (55:45). Flujo 1,0 ml/min. Columna Thermo Hypersil GOLD® 150 x- 4,6 mm C18 (5 µm).

Figura 3-8: Cromatograma CLAE-UV de la mezcla de los estándares (0,1 mg/mL) con un sistema de elución por gradientes.



ACN (B):Ácido fórmico 0,1% (A): 35% B hasta 100% B en 15 min. Flujo 1,0 ml/min. Columna Thermo Hypersil GOLD® 150 x- 4,6 mm C18 (5 µm). Tiempos de retención: PRA: pravastatina 4,02 min; LOVH: hidroxiácido lovastatina 9,37 min; SIMH: hidroxiácido simvastatina 10,20 min; LOVL: lovastatina en forma lactónica 10,71 min; SIML: simvastatina en forma lactónica 11,84 min.

3.3.3. Evaluación de los parámetros de cuantificación del método cromatográfico

3.3.3.1. Confiabilidad

La confiabilidad del método se evaluó determinando la relación existente entre la concentración de los cinco analitos y la respuesta del equipo en términos del área de cada uno de ellos, encontrando

que se ajusta perfectamente a una línea recta, con factores de respuesta similares y coeficientes de variación entre los triplicados menores al 5% (Tabla 3-4).

Tabla 3-4: Determinación de la relación lineal entre la concentración y el área de los analitos estudiados.

Analito	Linealidad	
	Factor de respuesta promedio	% CV
Pravastatina	25082320	4,6
Hidroxiácido lovastatina	25985777	3,3
Hidroxiácido simvastatina	24121549	2,3
Lovastatina en forma lactónica	25980019	4,5
Simvastatina en forma lactónica	24148667	4,4

3.3.3.2. Sensibilidad

Con respecto a la sensibilidad del método los valores del LD y LQ determinados se encuentran hacia el límite inferior de los rangos reportados en literatura (1 - 100 ng/mL y 0.5 - 125 ng/mL respectivamente) (234, 237, 250) (Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Determinación de la sensibilidad del método.

Analito	Sensibilidad	
	Límite de detección (ng/mL)	Límite de cuantificación (ng/mL)
Pravastatina	2,3	7,8
Hidroxiácido lovastatina	4,8	15,8
Hidroxiácido simvastatina	7,1	23,8
Lovastatina en forma lactónica	4,8	16,1
Simvastatina en forma lactónica	8,8	29,2

3.3.3.3. Exactitud y precisión

Para la evaluación de la exactitud y la precisión es necesario realizar las determinaciones empleando un blanco que no contenga los analitos objetos de estudio. Se seleccionó una sola cepa en un medio de cultivo para simplificar la determinación, tomando como base que el perfil de CLAE-UV de las setenta y dos matrices (resultantes de la combinación de las doce FC, las tres especies de hongos, el micelio y el medio agotado) no varía de una forma apreciable, como se explicará más adelante. Los extractos empleados corresponden al micelio y el medio agotado de *P. ostreatus* cultivado en salvado de trigo, en el cual por los análisis de CG-EM que se describieron en el capítulo 2, se evidenció la presencia de un número importante de compuestos triterpenoidales (numeral 2.3.3.2.), resultado que como se indicó anteriormente sugiere biosintéticamente la ausencia de estatinas, proporcionando una muestra blanco ideal (197). La exactitud se determinó como el porcentaje de recuperación, que fue

cercano en todos los casos al 100% (Tabla 3-6). La precisión se evaluó como la repetibilidad obteniendo valores del porcentaje de desviación estándar relativa (coeficientes de variación) inferiores al 5% entre los triplicados hechos (Tabla 3-7). Este valor es el esperado para matrices complejas como son los fluidos biológicos y los productos naturales que se debe encontrar en un rango entre 5% y 10% (252).

Tabla 3-6: Determinación de la exactitud del método.

Analito	Exactitud ^a					
	Extracto del micelio			Extracto del medio agotado		
	Fortificación (µg/mL)			Fortificación (µg/mL)		
	6	12	25	6	12	25
Pravastatina	101	96	95	104	97	96
Hidroxiácido lovastatina	100	98	98	103	101	100
Hidroxiácido simvastatina	102	98	98	104	101	100
Lovastatina en forma lactónica	102	99	100	104	102	102
Simvastatina en forma lactónica	102	96	98	112	101	103

^a Exactitud calculada como % de recuperación promedio de las cuatro repeticiones

Tabla 3-7: Determinación de la precisión del método.

Analito	Precisión ^b					
	Extracto del micelio			Extracto del medio agotado		
	Fortificación (µg/mL)			Fortificación (µg/mL)		
	6	12	25	6	12	25
Pravastatina	3,5	3,5	2,1	5,1	3,3	2,9
Hidroxiácido lovastatina	4,2	3,1	1,4	5,1	3,1	1,6
Hidroxiácido simvastatina	4,1	3,1	1,0	5,2	3,3	1,8
Lovastatina en forma lactónica	3,6	2,9	0,9	4,7	3,3	1,6
Simvastatina en forma lactónica	0,9	2,9	1,4	4,3	1,6	1,2

^b Precisión calculado como %RSD de las cuatro repeticiones.

Todo lo anterior indica que el método desarrollado resulta efectivo para la detección y posterior cuantificación de PRA, LOVL, SIML, LOVH y SIMH.

3.3.4. Efecto del uso de alcoholes en la extracción

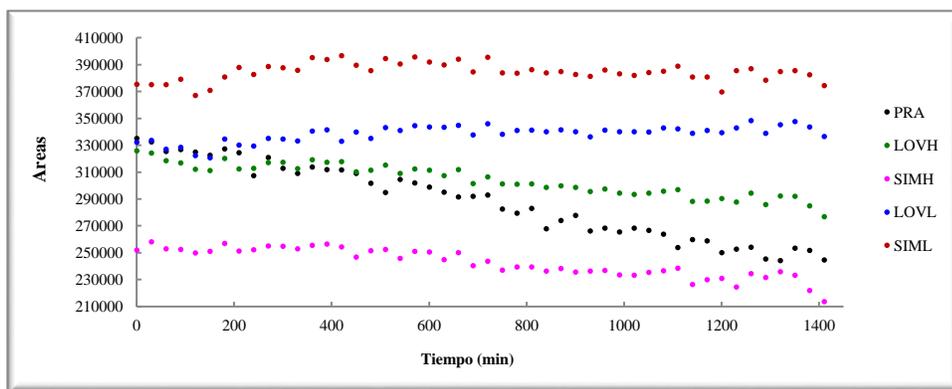
El empleo de alcoholes en los procesos de extracción ha sido seleccionado por algunos autores como una buena alternativa. Sin embargo, por la estructura de las estatinas estas condiciones podrían favorecer la esterificación, más aun teniendo en cuenta que generalmente al estar en solución se facilita el equilibrio entre las dos formas (lactónicas e hidroxiácidas) (245, 253). Usando las tres

soluciones acuosas de metanol, etanol y butanol como disolventes para LOVL y SIML, después de 24 h de preparadas, se observó la presencia de picos con t_R diferentes a los característicos para las formas lactónicas y las hidroxiácidas, por lo que pueden ser atribuidos a la presencia de los ésteres metílico, etílico y butílico. Este comportamiento ha sido reportado por otros autores en estudios similares (238).

3.3.5. Estabilidad de las estatinas durante 24 horas

Con el objetivo de evaluar el comportamiento bajo las condiciones previamente estandarizadas y determinar la velocidad a la cual, a temperatura ambiente, ocurrían interconversiones, se realizó el seguimiento por CLAE-UV durante 24 horas de una mezcla de los cinco patrones. Como se observa en la figura 3-9 las formas lactónicas son más estables durante el tiempo a diferencia de las hidroxiácidas, resultados que son concordantes con los reportes de literatura y con lo que se espera de las estructura de ambas formas, en la que los grupos carboxilo de los hidroxiácidos se pueden relactonizar o generar esteres dependiendo de las condiciones del medio. Entre los cinco estándares la pravastatina es la más inestable en solución con el tiempo, de igual forma es el comportamiento esperado debido a la generación de diferentes productos de transformaciones por la presencia del -OH en la posición 3.

Figura 3-9: Estabilidad de las estatinas durante 24 horas.



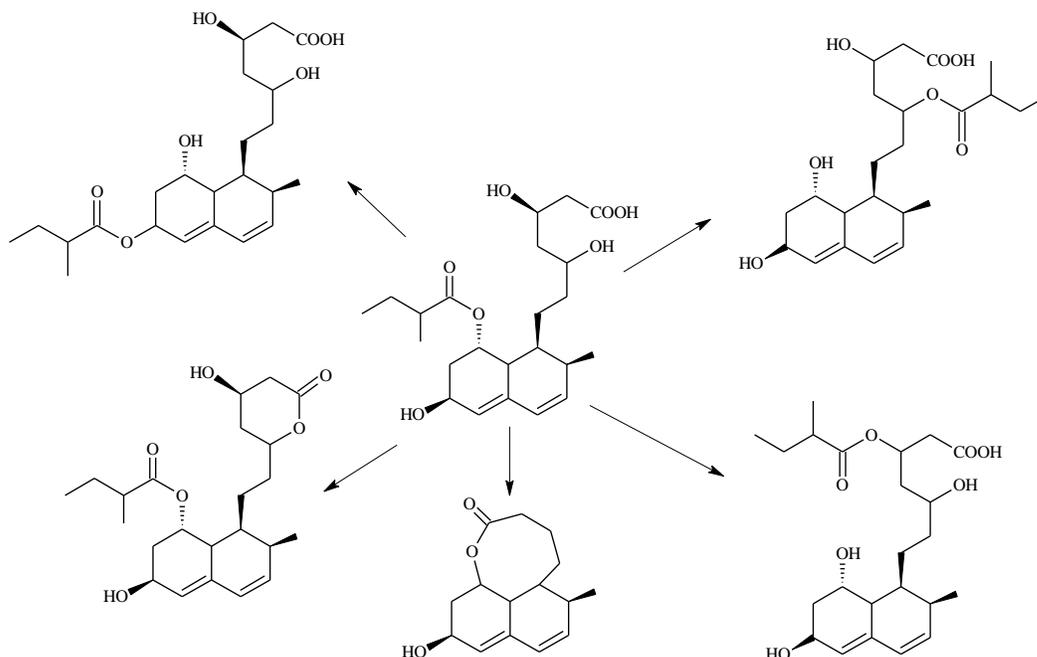
PRA: pravastatina
LOVL: lovastatina en forma lactónica

LOVH: hidroxiácido Lovastatina **SIMH:** hidroxiácido simvastatina
SIML: simvastatina en forma lactónica

En la figura 3-10 aparecen las estructuras atribuibles a los productos generados posterior a la hidrólisis en medio ácido, dentro de las que están la resultante de la ruptura del enlace éster, reesterificación y relactonización de la pravastatina (254); igualmente la formación de estos subproductos es extrapolable a SIMH y a LOVH. Este comportamiento se puede esperar en el medio en el que se realizó el ensayo, ya que todas las soluciones fueron diluidas en la fase móvil y por

ende el pH de la solución es ácido. Al calcular el coeficiente de variación de las áreas, para todos los casos a excepción de la PRA fueron inferiores al 5%, lo que demuestra que no hay interconversiones ni degradaciones significativas para LOVL, SIML, LOVH y SIMH en solución durante 24 h a temperatura ambiente.

Figura 3-10: Esquema de las potenciales transformaciones de pravastatina en medio ácido (254).



Debido a estas consideraciones se optó por trabajar con las soluciones bien sea inmediatamente después de ser preparadas o conservarlas refrigeradas para su posterior uso.

3.4. CONCLUSIONES

- La hidrólisis de la forma lactónica de la lovastatina y la simvastatina a sus correspondientes hidroxiácidos, es del 100% en un tiempo de reacción de 20 min, empleando la metodología descrita por Casas et al. (151).
- El sistema cromatográfico que cumple con los requisitos de los valores de k' , A_s , R_s y α óptimos, usado para la separación de las formas lactónicas de la simvastatina y la lovastatina, sus hidroxiácidos y la sal de la pravastatina, es una mezcla de ácido fórmico al 0,1% (A) y ACN (B) desde 35% de B hasta 100%, en forma lineal en 15 min como fase móvil, la temperatura del horno 35 °C y la fase estacionaria una columna Thermo Hypersil GOLD®.

- El método de CLAE-UV desarrollado es altamente confiable, sensible, exacto y preciso.
- Con respecto a la estabilidad de las estatinas, sus soluciones deben mantenerse a bajas temperaturas, de igual manera se debe evitar el uso de alcoholes para minimizar las posibilidades de transformaciones de los analitos.

**CAPITULO 4. DETERMINACIÓN POR MEDIO
DE CLAE-UV DEL POTENCIAL DE
PRODUCCIÓN DE ESTATINAS POR *Pleurotus*
CULTIVADOS POR FEL**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AV	Harina de avena
AZ	Harina de arroz
BT	Bienestarina
CB	Harina de cebada
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DAD	Arreglo de diodos
FC	Fuente de carbón
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
FN	Fuente de nitrógeno
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril CoA
LOVH	Lovastatina hidroxiaácido
LOVL	Lovastatina en forma lactónica
MA	Harina de maíz amarillo
MP	Harina de maíz pinto
MZ	Harina de maíz
PRA	Pravastatina
RYD	Traditional Red Yeast® de Doctors's A-Z
RYN	Red Yeast Rice® de Nature's Plus
RYS	Traditional Red Yeast® de Swanson Premium Brand
SG	Harina de siete granos
SIM	Modo selectivo de iones
SIMH	Simvastatina hidroxiaácido
SIML	Simvastatina en forma lactónica
ST	Salvado de trigo
SY	Harina de soya
TI	Harina de trigo integral
TR	Harina de trigo
UV	Ultravioleta

4.1. ANTECEDENTES

Los procesos fermentativos para la producción de estatinas, son una tecnología alterna que se ha desarrollado en busca de obtener dichos metabolitos a partir de organismos, especialmente micromicetos, en pro de disminuir la complejidad de los procesos habituales de aislamiento y a la vez aumentar la cantidad generada de los mismos. En investigaciones realizadas dentro del grupo Química de Hongos Micromicetos se detectó la presencia de estos metabolitos en *Pleurotus* cultivados por FES lo que, reforzado por reportes de literatura que indican su producción mediante el empleo de FEL, dio pie a iniciar trabajos sobre la exploración de la biosíntesis de las estatinas en diferentes especies de dicho género. En este capítulo el estudio está centrado en la detección de la producción de estatinas en los productos biotecnológicos de las tres especies de *Pleurotus* obtenidas por FEL, empleando el método de CLAE-UV desarrollado en el capítulo anterior.

4.1.1. Procesos fermentativos en la obtención de estatinas en hongos micromicetos

Los mejores organismos productores de estatinas, específicamente de lovastatina, son las diferentes especies de *Aspergillus*, un contaminante común de comidas, que contiene varias sustancias tóxicas que incluyen terreína, patulina, citrina y citreoviridina, haciendo necesarios tediosos procesos de extracción y purificación de los metabolitos. Como alternativa se han realizado procesos fermentativos con otras especies como el *Monascus ruber*, hongo no patógeno y frecuentemente utilizado en procesos alimentarios para generar aromas, color y mejorar la calidad nutricional de los productos de fermentación (255). Una de las desventajas del proceso con *Monascus* es la producción concomitante de citrinina, comúnmente asociada a una mayor generación de lovastatina, dependiente del medio de cultivo utilizado y de las condiciones de fermentación, pero este inconveniente ya está superado y los cultivos estandarizados para lograr niveles de la toxina incluso inferiores a los permitidos (240). Es importante tener en cuenta que la presencia de las estatinas está asociada en diferente grado tanto al micelio como al medio extracelular (caldo de cultivo o medio agotado) y que este grado de asociación depende de la cepa y del tipo de estatina. Manzoni et al. (1998) determinaron para una cepa de *A. terreus* que el 83% de la lovastatina recuperada se asocia al micelio y un 17% se encuentra libre en el caldo, mientras para *Monascus paxii* estos valores son del 64% y 33% respectivamente. La pravastatina para las dos especies se asocia en proporciones muy similares tanto al micelio como al medio extracelular (153).

En la tabla 4-1 se encuentran algunos de los resultados más relevantes de las investigaciones referentes a las variables de los procesos fermentativos para obtener estatinas en micromicetos.

Tabla 4-1: Variables estudiadas en los procesos fermentativos para optimizar la obtención de estatinas en micromicetos (196).

VARIABLE ESTUDIADA	ESPECIE	REF.
Suplementación del medio de cultivo.	<i>Aspergillus terreus</i>	(248, 256-258)
Composición del sustrato.	<i>Monascus ruber</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>Monascus ruber</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Monascus purpureus</i>	(227) (259-261) (236) (186) (262) (263) (241) (182)
Cepas mejoradas, estabilización del inóculo, optimización de medios de cultivo, fermentación por lotes alimentados y por lotes, fuentes de carbono y nitrógeno.	<i>Aspergillus terreus</i>	(264)
Fuentes de carbono y nitrógeno.	<i>Aspergillus terreus</i>	(265)
Composición del medio, características del pellet.	<i>Aspergillus terreus</i>	(266)
Fuentes de carbono y nitrógeno (relación C:N) y método de inoculación.	<i>Aspergillus terreus</i>	(228)
Contenido de oxígeno, concentraciones de C, N y P, tiempo de fermentación.	<i>Aspergillus terreus</i>	(267)
Adición de lovastatina.	<i>Aspergillus terreus</i>	(268)
Concentración de oxígeno disuelto, uso de fermentador o frascos agitados, diámetro del pellet, pH, temperatura.	<i>Aspergillus terreus</i>	(233)
Regímenes de aireación y agitación sobre la morfología del pellet y la reología del caldo.	<i>Aspergillus terreus</i>	(269)
Fuentes de C y N.	<i>Monascus pilosus</i>	(270)
Condiciones de esporulación.	<i>Aspergillus terreus</i>	(239)
pH, composición del medio de cultivo.	<i>Monascus purpureus</i>	(240)
Velocidad de agitación, aireación, tamaño, cantidad y morfología del pellet.	<i>Penicillium citrinum</i>	(271)(271)(271)
Temperatura, tiempo de fermentación, volumen del inóculo y pH.	<i>Monascus purpureus</i>	(179)
Agitación, periodo de incubación, temperatura, pH inicial, composición del medio y aireación.	<i>Aspergillus terreus</i>	(272)

Como se puede deducir de estos datos, la mayoría de los reportes están relacionados con el estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de los metabolitos, una variable que ha sido catalogada por algunos autores como la más relevante si el objetivo del proceso es estimular la biosíntesis de dichos compuestos, al igual que la mayoría de los metabolitos fúngicos (266).

4.1.2. Efecto de la composición del medio en la producción de estatinas en micromicetos

Dentro de los nutrientes presentes en un medio de cultivo, son las FC y FN las que juegan un rol predominante en la productividad de la fermentación, debido a que están directamente relacionadas

con la formación de biomasa y metabolitos; además, la naturaleza y concentración de la FC puede regular el metabolismo secundario a través de fenómenos como la represión catabólica (267).

Los primeros medios de cultivo utilizados para la obtención de estatinas fueron medios complejos (sin una composición química definida), básicamente compuestos por una o dos FC, una o dos FN y una solución de sales como fuente de macro y microelementos. Los compuestos más comúnmente empleados como FC son glucosa (273), lactosa (228, 265) y glicerol (228). Como FN se prefieren las fuentes orgánicas como la peptona, el licor de maíz (228, 273), la harina de soya (153, 228) y el extracto de levadura (228). Otras FN como aminoácidos y sales que contienen iones amonio, pueden acidificar el medio y no son recomendables. Para la glucosa y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como FC y FN inorgánico respectivamente, se ha reportado un efecto represor sobre la producción de lovastatina (265, 266). Dentro de la solución salina es común encontrar KH_2PO_4 y K_2HPO_4 como reguladores del pH (265, 273), además de otras sales inorgánicas que poseen cationes como amonio y magnesio, y los principales microelementos que incluyen Fe, Mn, Zn y Cu (274).

Como la mejor FC para la producción de lovastatina por *A. terreus* en FEL, varios autores han propuesto la lactosa, frente a fuentes como glucosa, glicerol o sacarosa. Con respecto a las FN para las cepas de *Monascus ruber* han sido utilizadas principalmente fuentes de origen vegetal como la harina de soya (275) y el licor de maíz (273), sin embargo, para la cepa *Monascus ruber* ATCC 18199 se encontró que sustituyéndolas por harina de arroz se alcanza una mayor productividad de lovastatina (131 mg/L) (227).

Según la composición del medio de cultivo también se puede favorecer la síntesis de un tipo particular de estatina. Cuando el medio utilizado por Manzoni et al (1998) es suplementado con harina de soya hasta completar 30 g/L y en el día 7 con 50 g/L de glicerol, se producen 244 mg de lovastatina por litro de medio de cultivo, bajo estas condiciones no hubo producción de mevastatina. Sin embargo, cuando la suplementación se realiza con harina de soya desengrasada, pero sin adición de glicerol como fuente carbono extra, la biosíntesis se dirigió a la producción de mevastatina. Estos resultados sugieren que dependiendo de la composición del medio de cultivo la biosíntesis puede direccionarse a la producción preferente de la estatina de interés. El efecto de la fracción lipídica en el medio de cultivo, representada por la adición de harina de soya completa o desengrasada (la harina de soya completa contiene 22-24% de lípidos, mientras que la harina de soya desengrasada contiene sólo 0.5%- 1.5% de contenido lipídico), indica que la biosíntesis de lovastatina y pravastatina, se ve favorecida cuando el contenido de lípidos en el medio de cultivo es bajo, por el contrario cuando la

fracción lipídica en el medio de cultivo es significativa, la biosíntesis de estos dos metabolitos se ve disminuida y se acumulan otros intermediarios de la síntesis como mevastatina y monacolina J (202).

En la tabla 4-2 se encuentran resumidos los resultados de las investigaciones más relevantes relacionadas con los medios de cultivo empleados para producir estatinas por medio de FEL empleando hongos micromicetos.

Tabla 4-2: Medios de cultivo utilizados para la producción de lovastatina por FEL con hongos micromicetos (196).

COMPOSICIÓN DEL MEDIO	HONGO	RENDIMIENTO	REF.
(g/L): Glucosa (45), leche peptonizada (24), extracto de levadura (2,5), polietilenglicol (2,5 mL).	<i>A. terreus</i> ATCC 74135	304 mg/L ^a	(265)
(g/L): Harina de arroz (34,4), peptona (10,8), glucosa (129,2), glicerol (26,4 mL/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 %p/v, KNO ₃ 0.2 %p/v.	<i>Monascus ruber</i> ATCC 18199	131 mg/L ^b	(227)
(g/L): Lactosa (89,5), glicerol (30,2), peptona (6), glucosa (20), licor de maíz (10), harina de soya (4,2).	<i>Aspergillus terreus</i> cepa mutada	1050 mg/L ^c	(259, 266)
(g/L): Lactosa (40), extracto de levadura (1,33), KH ₂ PO ₄ (1), MgSO ₄ ·7H ₂ O (1), NaCl (1) y solución de microelementos (1 ml).	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	250 mg/L ^a	(228)
(g/L): Lactosa (114,26), harina de soya (5,41), KH ₂ PO ₄ (0,8), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,52 g), NaCl (0,4), Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O (2 mg), ZnSO ₄ ·H ₂ O (1 mg), biotina (0,04 mg) y solución de elementos traza (1 mL).	<i>Aspergillus terreus</i>	~ 230 mg/L ^a	(267, 269)
Peptona 3.8 %p/v, maltosa 1 %p/v, glicerol 7 %v/v, MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,1 %p/v), NaNO ₃ (0.2 %p/v).	<i>Monascus pilosus</i> IFO5420	444 mg/L ^a	(270)
	<i>Monascus pilosus</i> MK1	725 mg/L ^a	
Arroz fermentado con raíces de <i>Dioscorea</i> (1 %p/p), etanol (0,5% v/v).	<i>Monascus purpureus</i> NTU 568	27,9 mg/g ^c	(240)
(g/L) Glucosa (52,61), peptona (16,65), NH ₄ Cl (1), KH ₂ PO ₄ (1), extracto levadura (3), K ₂ HPO ₄ (1), KNO ₃ (0,5), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,2), MnSO ₄ ·H ₂ O (0,418), NaCl (0,5), CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,1) FeSO ₄ ·7H ₂ O (0,001).	<i>Monascus purpureus</i> MTCC 369	97,5 mg/L ^c	(276)
(g/L): Almidón soluble (67,56), extracto de levadura (10), polietilenglicol (2,5), KH ₂ PO ₄ (2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (1), tirosina (0,050).	<i>Aspergillus terreus</i> LA414	952,7 ± 24.3 mg/L ^a	(256)
(g/L): Harina de avena (20), CH ₃ COONa (20), (NH ₄) ₂ SO ₄ (5), KH ₂ PO ₄ (2), urea (4,5), metionina (2,5), solución de elementos traza (10 mL).	<i>Aspergillus terreus</i>	188,3 mg/L ^c	(272)
Medio Czapek Dox	<i>Aspergillus sp.</i> cepa de colección	9,9 mg/l - 85,8 mg/L ^c	(277)

^a Medio agotado

^b Micelio

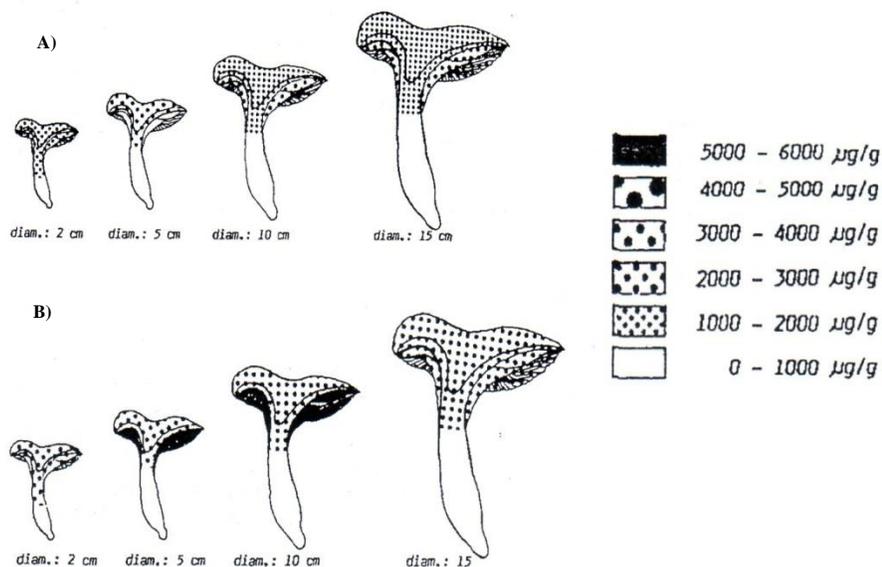
^c Mezcla de micelio y medio agotado.

4.1.3. Las estatinas en *Pleurotus*

En 1993 Gunde-Cimerman et al, evaluaron 380 cepas fúngicas de 50 géneros diferentes y 143 especies, cultivados por FEL, con especial énfasis en los macromicetos, con el objetivo de hacer un screening para encontrar nuevos organismos distintos a los micromicetos conocidos, productores de lovastatina, encontrando que los basidiomicetos del género *Pleurotus*, especialmente las especies *P.*

ostreatus, *P. saca* y *P. sapidus*, son las fuentes más promisorias de este tipo de compuestos (192). En este año los mismos autores reportaron los resultados del proceso de extracción, caracterización, determinación estructural y de actividad biológica de la lovastatina y compactina, planteando la hipótesis de que son estas las sustancias responsables del efecto inhibitor de la HMG-CoA reductasa (278). En 1995 publicaron un completo estudio relacionado con la determinación del contenido de lovastatina en los extractos de los carpóforos de *P. ostreatus* y su distribución durante el ciclo de vida del hongo. Como conclusiones encontraron que al inicio del crecimiento el compuesto está uniformemente distribuido en el carpóforo, sin marcadas diferencias en su contenido entre el píleo y el pie. Posteriormente durante el crecimiento, la estatina se transfiere al píleo y luego a las lamelas. Una vez están completamente maduros (15 cm diámetro del píleo), hay un menor contenido en las lamelas comparado con los carpóforos menos maduros, planteando la hipótesis de que se presente una transferencia a las basidiosporas. Los autores representaron gráficamente estos resultados como se muestra en la figura 4-1 (190).

Figura 4-1: Contenido de lovastatina en las partes de los esporocarpos de *Pleurotus ostreatus* de diferentes medidas.



La extracción fue realizada con **A)** MeOH:H₂O y **B)** N₂ + MeOH:H₂O (190)

La producción de estatinas en las especies del género *Pleurotus* tiene la ventaja de eliminar los problemas generados con las toxinas de los micromicetos, más aun si se tiene en cuenta la característica de este género de ser hongos comestibles y tener propiedades nutricionales y medicinales (75, 166, 279). No hay una generalidad reportada en literatura sobre la acumulación de este grupo de metabolitos en el caldo o en el micelio de los *Pleurotus*, debido a las diferencias en los

procesos empleados para su determinación: Gunde-Cimernann (1993) no separa el producto biotecnológico para hacer el estudio; Wasser & Reshetnikov (2002) mencionan que el metabolito no fue detectado en los filtrados del caldo de fermentación luego de la separación del micelio; El-Shami & Hamed (2007) reportan la presencia de lovastatina en el caldo de cultivo y Alarcón et al. (2003) hicieron la determinación en los caldos filtrados y en el micelio obtenido por FEL, pero únicamente reportan su presencia en los primeros.

Es importante tener en cuenta que la acumulación de lovastatina en el micelio de *Pleurotus ostreatus*, está relacionada con la fase exponencial del crecimiento, siendo menor en la fase estacionaria, caso contrario ocurre con el *P. eryngii var ferulae* en el que se ha observado que no hay cambios significativos en el contenido de la estatina entre las etapas de crecimiento (274). En hongos filamentosos como *Aspergillus terreus* la producción de la lovastatina se ha asociado a la fase estacionaria, cuando las condiciones nutricionales no son favorables para el hongo (153).

Los estudios relacionados con las variables que afectan la producción de estatinas en *Pleurotus* se han enfocado en la composición del sustrato (241), la comparación de la producción entre especímenes nativos y cultivados, así como en diferentes cepas (189) y la relación C:N del medio de cultivo (188). Para los cultivos sumergidos de las especies de este género, las FC empleadas incluyen una gran variedad de carbohidratos como pentosas, hexosas y polisacáridos, en una proporción que varía entre el 3% y 5%. Como FN se prefieren las fuentes orgánicas que incluyen hidrolizado o extractos de levadura, peptona y licor de maíz, en un rango del 0.5%-4% por peso dependiendo del contenido de nitrógeno en la fuente (274). En la tabla 4-3 se encuentran resumidos los resultados de las investigaciones más relevantes relacionadas con los medios de cultivo empleados para producir estatinas por medio de FEL de *Pleurotus*.

Tabla 4-3: Medios de cultivo utilizados para la producción de lovastatina por FEL de *Pleurotus* (196).

COMPOSICIÓN DEL MEDIO	HONGO	RENDIMIENTO	REF.
(g/L): Glucosa (50), levadura de cerveza (20), pasta de tomate (30), harina de avena (20), CH ₃ COONa (10), (NH ₄) ₂ SO ₄ (5), KH ₂ PO ₄ (2), 10 ml de solución de elementos traza.	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus saca</i> <i>Pleurotus sapidus</i> <i>Pleurotus sp.</i>	0,4 – 27,3 mg/L ^a 5,0 – 23,0 mg/L ^a 41,0 mg/L ^a 0,7 – 2,2 mg/L ^a	(192)
(g/L): Dextrosa (50), peptona (0,5), extracto de levadura (1), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (2), K ₂ HPO ₄ (2,5) y solución de elementos traza (10 mL).	<i>Pleurotus eryngii var. ferulae</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	0.52 mg/g ^b 0.44 mg/g ^b	(274)
(g/l): CaCl ₂ (0,05), KH ₂ PO ₄ (0,025), (NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,25), MgSO ₄ x 7H ₂ O (0,15), 1.3 ml of FeCl ₃ 1%, extracto de malta (3,0), glucosa (10,0)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5 – 70 mg/L ^a	(189)
Czapek Dox (150 g/L) suplementado con paja de arroz, arroz, residuos del molienda de oliva o papa dextrosa.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	17,81 – 84,71 mg/L ^a	(262)

^a Medio agotado

^b Micelio

En lo concerniente a la relación entre biomasa y producción de lovastatina en el género, el estudio de Wasser et. al es el único que relaciona las dos variables, reportando que el comportamiento es dependiente tanto de la especie como de la composición del medio de cultivo empleado para la producción del metabolito (Tabla 4-4) (274).

Tabla 4-4: Relación entre la producción de biomasa y la biosíntesis de lovastatina en *Pleurotus* (274).

ESPECIE	COMPOSICIÓN DEL MEDIO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (d)	BIOMASA (g/l)	LOVASTATINA (mg/g)
<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	(g/l): peptona (0,5), extracto de levadura (1), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (2), K ₂ HPO ₄ (2,5) y solución de elementos traza (10 mL).	6	3,95	0,46
		8	7,76	0,41
		10	8,56	0,52
		12	12,20	0,41
<i>Pleurotus ostreatus</i>	(g/l): glucosa (50), peptona (0,5), extracto de levadura (1), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (2), K ₂ HPO ₄ (2,5) y solución de elementos traza (10 mL).	6	3,65	0,44
		8	9,30	0,23
		10	9,30	0,20
		12	5,50	0,15

Como lo revela el análisis de los resultados descritos, la composición del medio es una variable de vital importancia en la producción de las estatinas. A pesar de que se han empleado una amplia variedad de compuestos en los procesos, el uso de FC no convencionales, se ha restringido a arroz, soya y avena, siempre suplementando con otros componentes que acrecientan los costos de producción. En este marco de ideas la detección de la producción de estatinas en los productos biotecnológicos obtenidos por FEL de las tres especies de *Pleurotus* cultivadas con ese tipo de FC, es un tema de trascendental importancia que debe ser abordado para fortalecer el estudio sobre la potenciación del valor nutriceúutico de estos productos.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Detección de la producción de estatinas en los productos de la FEL

Los micelios y los caldos de cultivo agotados de las tres especies de *Pleurotus* obtenidas por FEL, fueron tratados como se describió en el numeral 1.2.1 y extraídos como aparece detallado en el numeral 2.2.3. Posteriormente fueron analizadas por CLAE-UV por el método desarrollado en el capítulo 3, a partir de soluciones de los extractos con una concentración de 1 mg/mL disueltas en ACN, sonicando antes de ser inyectados.

Los análisis por CG-EM se efectuaron bajo las condiciones especificadas en 2.2.5 con la variación de que el espectrómetro de masas se operó en el modo selectivo de iones (SIM), introduciendo en el software del equipo el ión target a m/z 159 (T) y los cualificadores a 198 (Q1) y 284 (Q2). Posteriormente se calculó el porcentaje de la relación entre la abundancia de cada uno de los iones

cualificadores y la abundancia del ión target (%Q/T). Estos valores se compararon con los obtenidos para los estándares de LOVL y SIML que fueron inyectados por triplicado.

4.2.2. Aproximación a la identidad de los compuestos detectados por CLAE-UV

Debido a que se analizarán mezclas de las estatinas con otros productos biosintetizados por los hongos, se prepararon con ayuda de ultrasonido, disoluciones con concentraciones de 1mg/mL de mezclas de compuestos triterpenoidales, que han sido reportados tanto como constituyentes de especies del género *Pleurotus* (116, 119), como en los productos biotecnológicos objeto de la presente investigación. Todas las mezclas se analizaron por CLAE-UV. De igual forma se estudiaron los extractos del micelio en AcOEt de *P. djamor* cultivado con harina de trigo integral y de *P. ostreatus* cultivado en harina de siete granos por CLAE-DAD bajo las siguientes condiciones: cromatógrafo de líquidos Merck Hitachi compuesto por una interface Merck Hitachi D-600A, una bomba L-6200A, manejados por un controlador Merck Hitachi D 7000. El detector de arreglo de diodos usado fue un Merck Hitachi L-4500 operado a 237 nm. El sistema de elusión fue una mezcla de ácido fórmico al 0,1% (A) y ACN (B) desde 35% de B hasta 100%, en forma lineal en 15 min, a temperatura ambiente y como fase estacionaria una columna Chromolith® performance RP-18 100-4,6 mm.

4.2.3. Estudio de la aplicabilidad de la técnica de CLAE-UV a productos con presencia comprobada de estatinas

Las muestras comerciales de arroz rojo fermentado utilizadas fueron “Traditional Red Yeast®” de Swanson Premium Brand (RYS), “Traditional Red Yeast®” de Doctors’s A-Z (RYD) y “Red Yeast Rice®” de Nature’s Plus (RYN). Las pastillas se extrajeron como indica Prasad (180), se prepararon soluciones de 1 mg/mL de cada extracto y se analizaron por CLAE-UV.

Cuatro cepas de *Pleurotus ostreatus*, tres nativas de la región de Inia-Quilamapu en Chillan – Chile (PL-124, PL-127 y PL-143) y una comercial (PL-136) determinadas por los estudios de Alarcón et. al. como productoras de lovastatina, se cultivaron bajo las condiciones establecidas por los autores como las más eficientes para la producción del metabolito (188) en un medio con la siguiente composición (g/L): CaCl₂.2H₂O (0,06), KH₂PO₄ (0,025), (NH₄)₂HPO₄ (0,25), MgSO₄.7H₂O (0,15), extracto de malta (13), glucosa (10), agua peptonada (4) y FeCl₃ (1% 1,2 ml/L). El procedimiento de extracción empleado fue el descrito en el numeral 2.2.3 y para el análisis por CLAE-DAD se prepararon soluciones de 1 mg/mL de cada extracto en fase móvil. Las características del equipo

empleado son las siguientes: cromatógrafo LaChrom Merck Hitachi, bomba L-71000, detector de arreglo de diodos L-7455, columna Kromasil® 100-5C18 250-4,6 mm.

4.2.4. Determinación de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de los compuestos detectados por CLAE-UV

Con el objetivo de determinar el papel del medio de cultivo en la producción de los metabolitos tipo estatinas cuyos picos son detectados por CLAE-UV, se realizaron las FEL de los *Pleurotus*, en el medio reportado en literatura como el óptimo para favorecer la biosíntesis de estatinas en *P. ostreatus* (188), analizando mediante CLAE-UV los productos biotecnológicos así obtenidos.

4.2.5. Evaluación del efecto del estadio de maduración del hongo en los metabolitos tipo estatina detectados por CLAE-UV

Las tres especies de *Pleurotus* fueron cultivadas por FES en bolsas que contenían 400 g de bagazo de caña, 10% de harina de cebada y 4% de CaCO₃, que posteriormente fueron inoculados con 40 g de semilla. Los análisis se realizaron a las fructificaciones obtenidas en la primera cosecha, con tamaños del píleo de 5 cm de diámetro y en las lamelas retiradas desde carpóforos frescos.

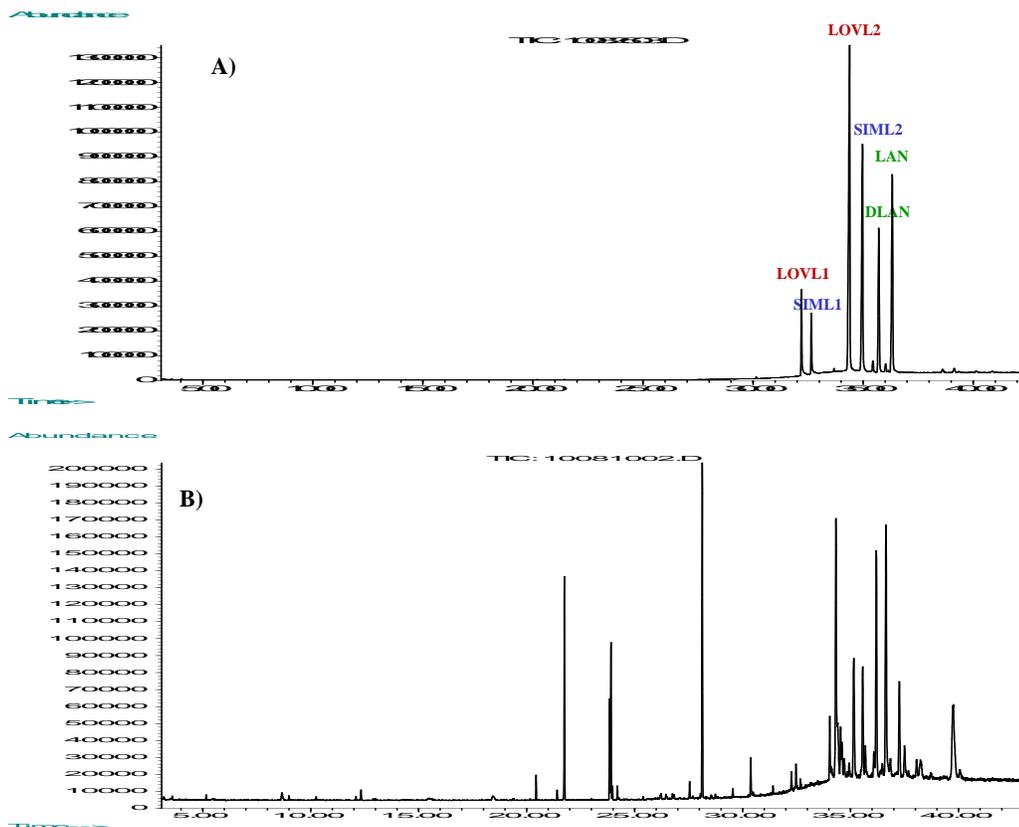
Tanto las lamelas como las fructificaciones frescas se extrajeron con AcOEt, los extractos se desecaron con Na₂SO₄ anhidro y se llevaron a sequedad en un rotaevaporador. Para el análisis por CLAE, se prepararon soluciones de 1 mg/mL en ACN, que fueron sonicadas antes de ser inyectadas.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Detección de la presencia de estatinas en los productos de la FEL empleando FC no convencionales

La búsqueda de las estatinas presentes en especies del género *Pleurotus*, ha sido un interesante tema de investigación abordado dentro del grupo de Química de Hongos Macromicetos, en pro de lograr las condiciones óptimas tanto de cultivo que permitan su producción por procesos fermentativos, como la posterior extracción, detección y en caso de que estas estén presentes, su purificación y elucidación estructural. Con este objetivo, se planteó en primer lugar la búsqueda de una forma de detectar dichos metabolitos en los extractos. La técnica hasta ahora empleada de CG-EM en modo SCAN tiene la desventaja de la elusión a t_R cercanos de los compuestos triterpenoidales y de las formas lactónicas de las estatinas, como se observa en la Figura 4-2. Esta similitud en el comportamiento cromatográfico de los dos grupos de metabolitos, dificulta la detección y posterior determinación de los compuestos de interés que pudiesen estar presentes en los extractos.

Figura 4-2: CG-EM de mezclas de compuestos triterpenoidales y estatinas.



A) una mezcla de lanosterol (LAN), dihidrolanosterol (DLAN), lovastatina en forma lactónica (LOVL) y simvastatina en forma lactónica (SIML)
B) Extracto de *Pleurotus djamor* cultivado con salvado de trigo como FC.

Es importante mencionar que al emplear esta técnica, en los cromatogramas de gases tanto para los patrones de LOVL como de SIML, se observan dos picos par cada uno de ellos: con $t_R = 34,379$ min (LOVL2) y $34,969$ min (SIML2) los generados por la pérdida de los ácidos 2-metilbutanoico y 2,2-dimetilbutanoico respectivamente; con $t_R = 32,193$ min (LOVL1) y $32,647$ min (SIML1) se encuentran los generados por la posterior deshidratación de la β -OH lactona (Figura 4-15). Estas fragmentaciones han sido reportadas por otros autores como las características para la Lovastatina y la simvastatina (280), sin embargo no existe información en literatura sobre la aparición de los dos picos en CG, pero ésta puede deberse a rompimientos que sufren en el momento de la inyección por las condiciones del análisis, debidas a la labilidad de los enlaces involucrados en las pérdidas que generan los fragmentos detectados.

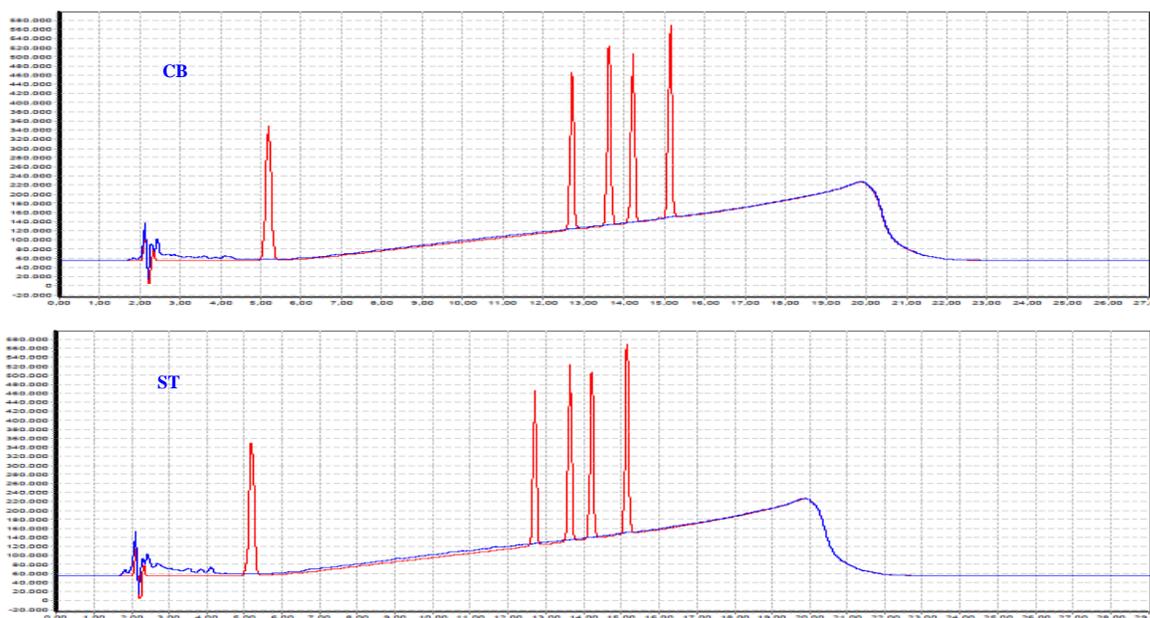
Estas observaciones condujeron la necesidad de plantear una metodología más apropiada para poder evaluar la presencia de estatinas en los productos biotecnológicos obtenidos de los *Pleurotus* a partir de la FEL, empleando las harinas como FC. Con este objetivo se desarrolló la metodología descrita

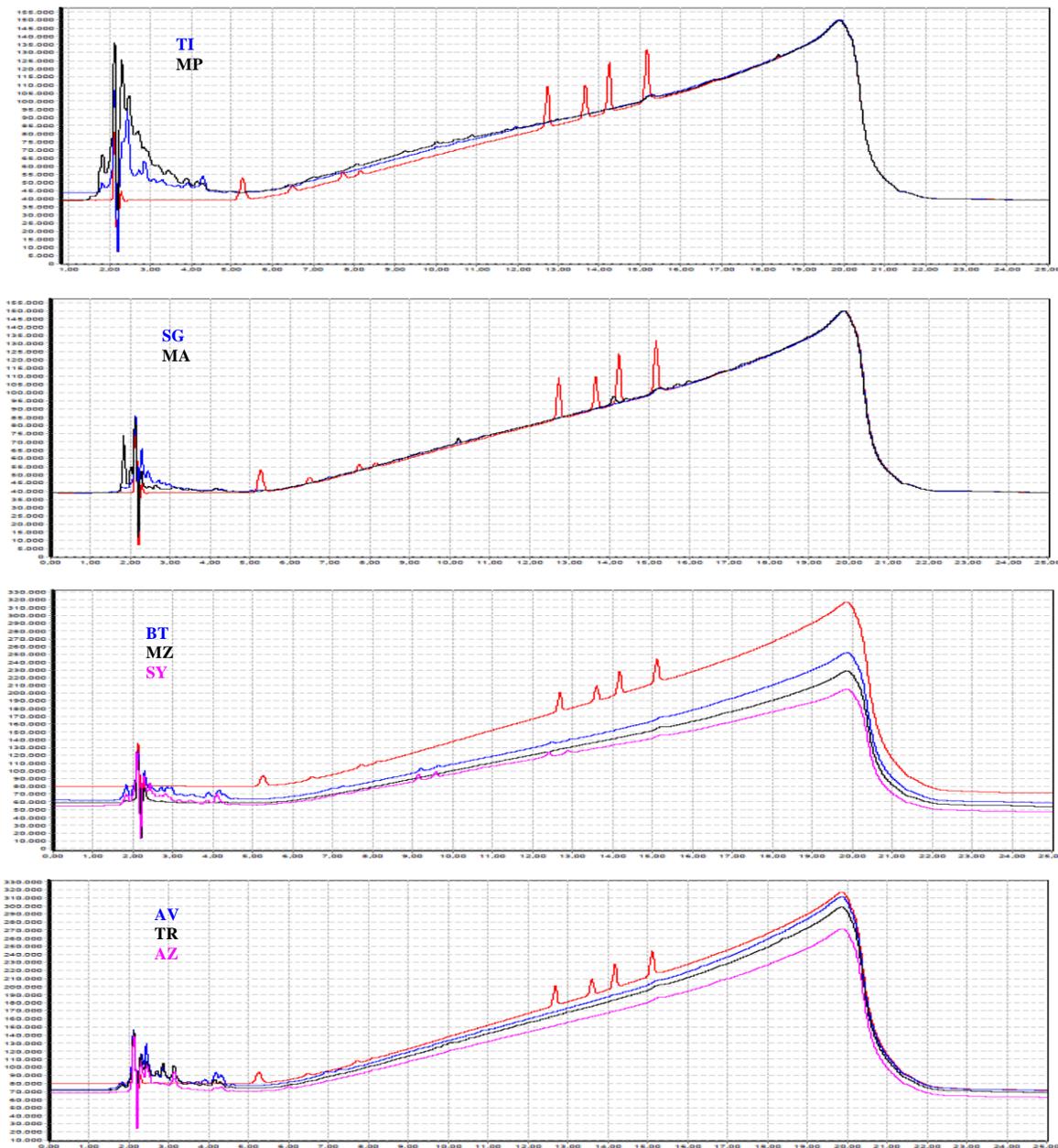
en el capítulo 3 que será aplicada, en esta parte de la investigación, a los extractos en AcOEt de los productos biotecnológicos de interés.

En el procedimiento de extracción descrito en el numeral 2.2.2 y esquematizado en la figura 2-3, se planteó la realización de un proceso de hidrólisis, con el objetivo de hacer una extracción selectiva de las estatinas, aprovechando sus características estructurales que les permiten formar los hidroxiácidos de las formas lactónicas. Este procedimiento se hizo con el *P. ostreatus*, pero como se describió en la discusión del capítulo 2, los perfiles de CG-EM no evidenciaron diferencias significativas y por ende no se efectuó este procedimiento para las especies de *P. pulmonarius* y *P. djamor*.

Con respecto a los diferentes productos obtenidos, la figura 4-3 muestra los perfiles cromatográficos en CLAE de los extractos en AcOEt para los medios agotados del *P. ostreatus* cultivado con las doce fuentes de carbono. En ninguno de los casos se observaron picos con t_R coincidentes con los de los patrones empleados. Se detectaron entre 2,8 min y 4,4 min picos con intensidades variables en los caldos agotados obtenidos empleando todas las FC a excepción del uso de las harinas de cebada y de maíz. Para el caso del maíz amarillo se detectó un pico a 10,3 min.

Figura 4-3: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



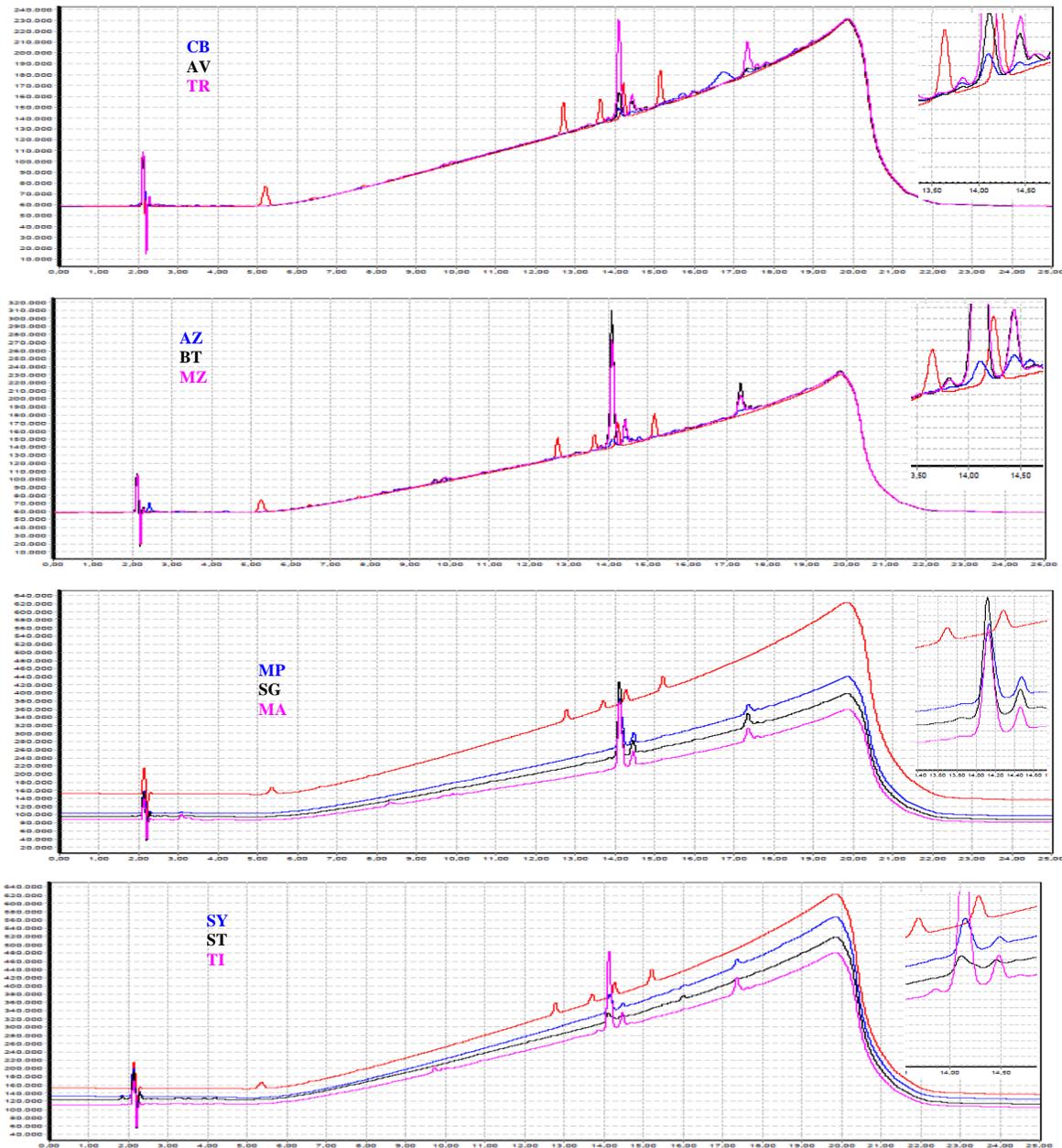


CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soya; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.
 Tiempos de retención de los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma láctónica 14,3 min; Simvastatina en forma láctónica 15,1 min.

Para el caso de los extractos de los micelios, de igual forma independientemente de la FC utilizada, no se observó un pico coincidente con los t_R de los patrones (Figura 4-4). Sin embargo, se evidenció la presencia de un pico con t_R de 14,1 min, intermedio con respecto al de los estándares de SIMH y LOVL, que varía en intensidad entre las FC empleadas. Adicional a esto se observa la presencia de un pico a 14,4 min con menor intensidad que el anterior, pero de igual forma detectado en los micelios obtenidos con todas las harinas. Para el caso del uso de CB, AV, TR, BT, MZ y TI, se

detectó un pico a 13,7 min con bajas intensidades, así como uno a 17,2 min para TR, BT, MZ, SY y TI.

Figura 4-4: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

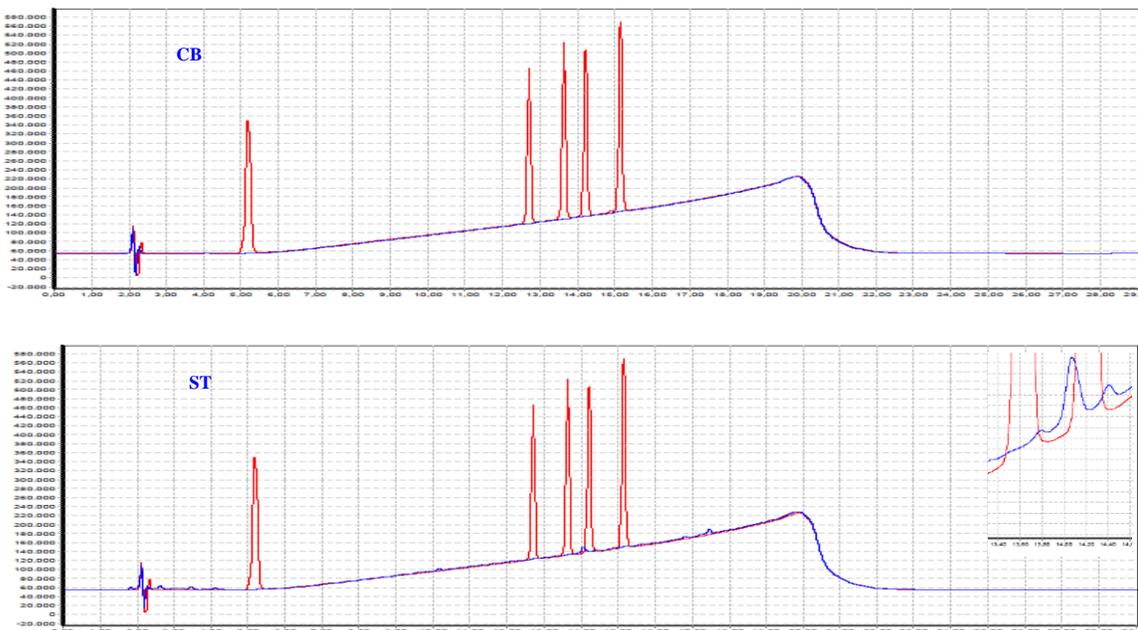
Tiempos de retención de los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma láctónica 14,3 min; Simvastatina en forma láctónica 15,1 min.

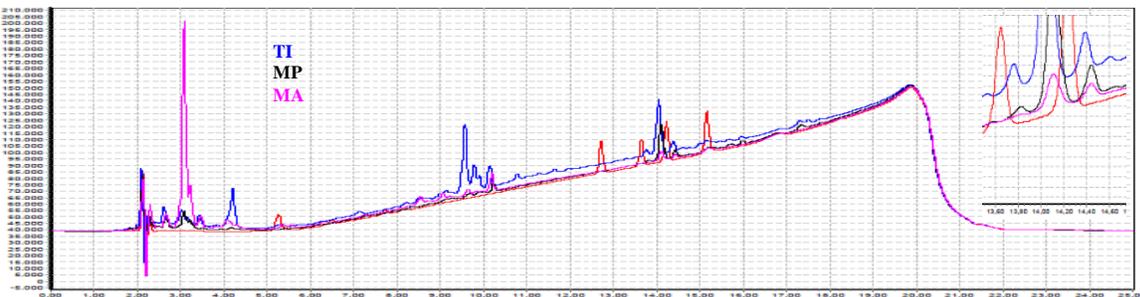
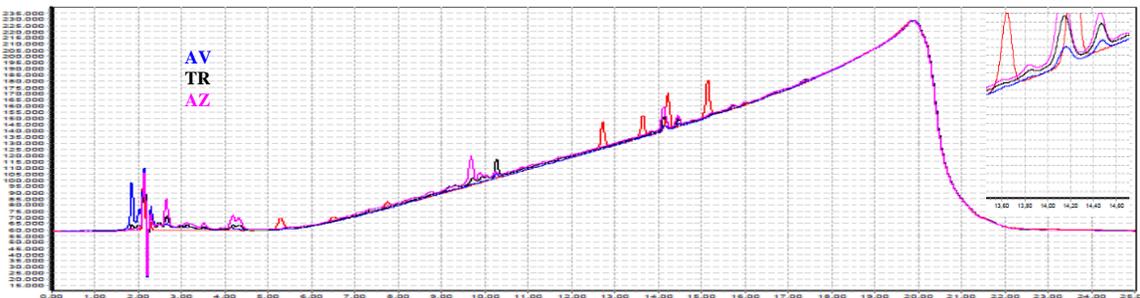
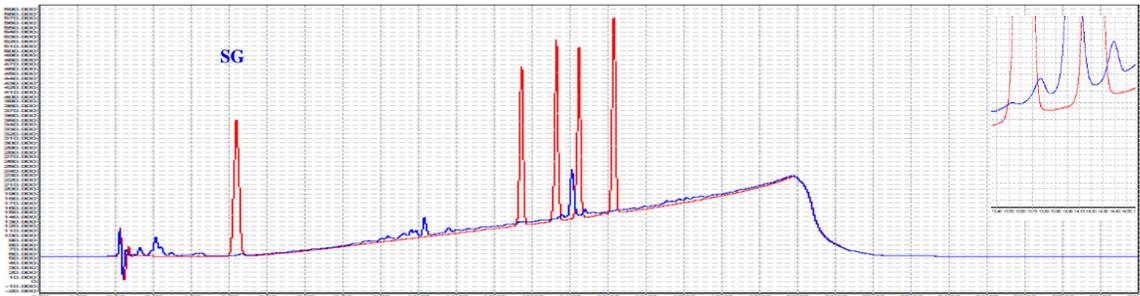
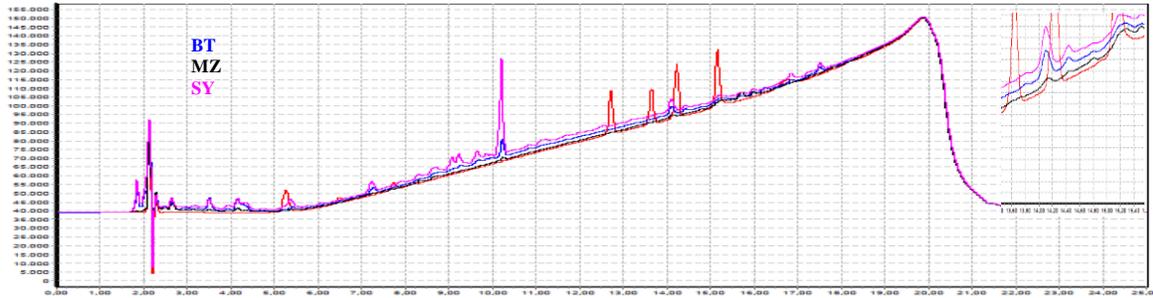
En los extractos en AcOEt de los productos de la hidrólisis básica de los micelios, se esperaría que las formas lactónicas de las estatinas que estuviesen presentes se hidrolizaran formando sus correspondientes sales insolubles en el disolvente extractante, por ende en estos extractos no se detectarían los metabolitos de interés. Sin embargo, salvo el producto obtenido empleando harina de cebada, en todos los extractos se detectó el pico a 14,1 min. En relación al pico en 14.4 min exceptuando CB, BT, MZ, SY y SG, con las restantes FC su detección de igual forma fue positiva (Figura 4-5), pero con intensidades en los extractos menores al compararlas con las de los micelios. Este comportamiento lleva a plantear dos hipótesis:

- a) Las condiciones de hidrólisis de las formas lactónicas de las estatinas determinadas en el capítulo 3 como óptimas, no son aplicables para los extractos, teniendo en cuenta la complejidad de los mismos y la presencia de otro grupo de compuestos, que podrían estar reaccionando con la base y por ende el proceso de hidrólisis de las estatinas no es completo;
- b) Los picos detectados en CLAE -UV no corresponden a estatinas. Esta segunda hipótesis se discutirá posteriormente.

Sumado a esto, se detectaron picos con t_R de 9,5 min y 10,3 min en los productos obtenidos empleando todas las harinas, salvo con CB, AV y ST.

Figura 4-5: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt del producto de la hidrólisis a pH básico de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



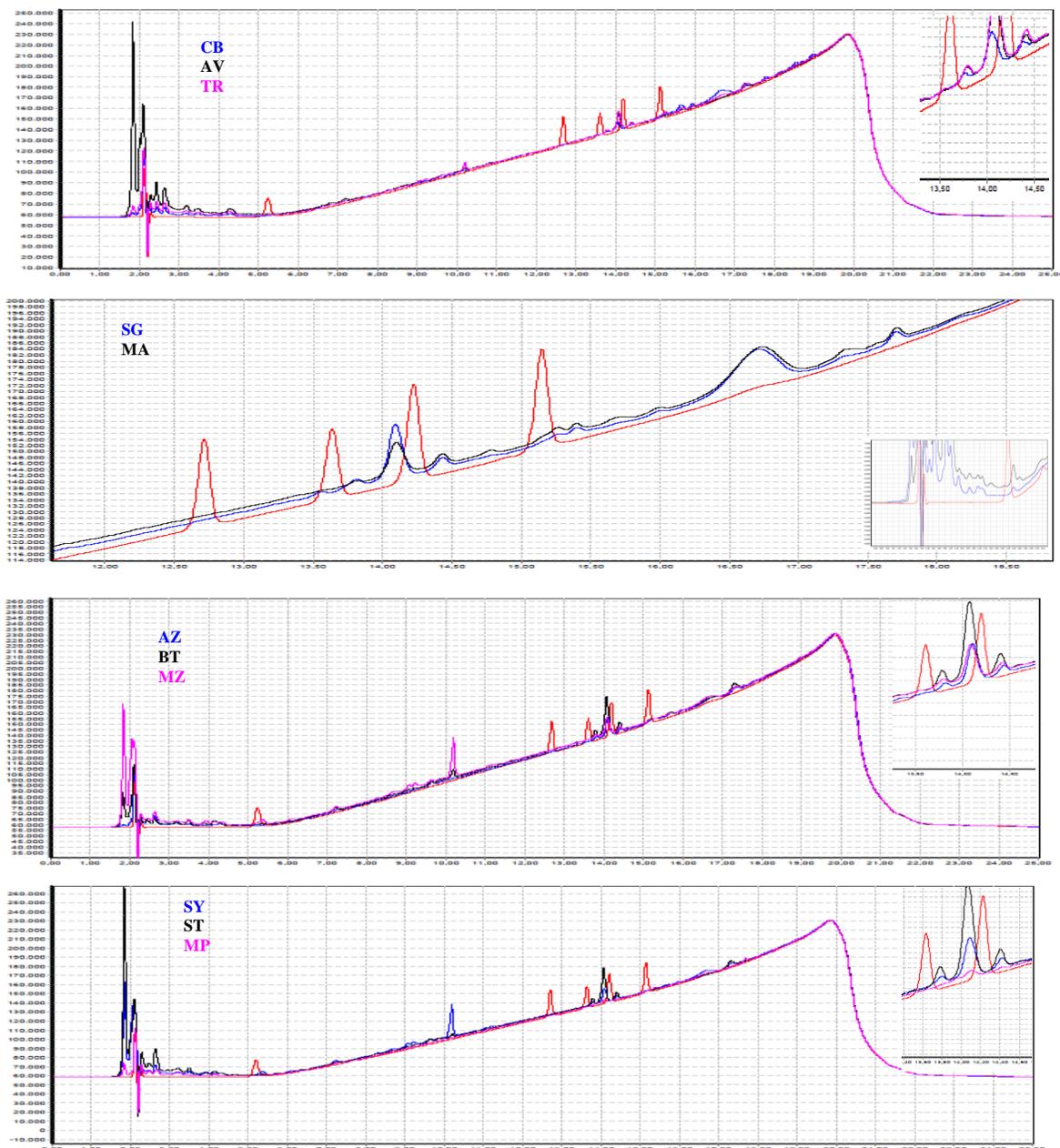


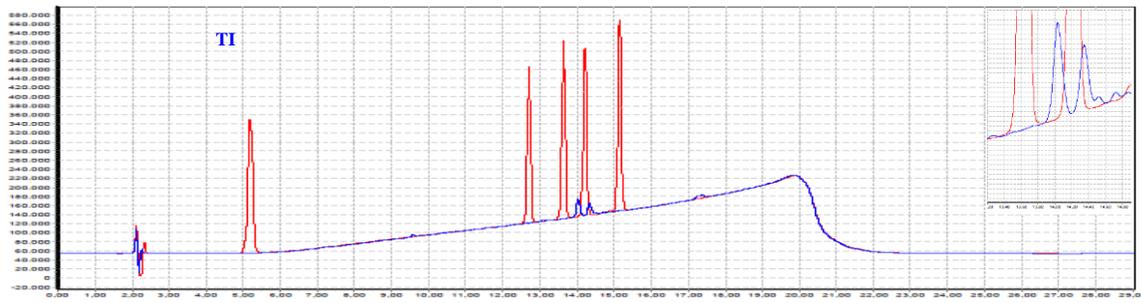
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo. **Tiempos de retención para los patrones:** Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma lactónica 14,3 min; Simvastatina en forma lactónica 15,1 min

La neutralización de los productos de la hidrólisis básica de los micelios, permite generar las formas hidroxiácidas de las estatinas que estuviesen presentes, y que por reportes de literatura y por sus características estructurales, se sabe son solubles en el disolvente extractante (281). Como se

observa en la figura 4-6 los perfiles cromatográficos para los extractos provenientes de la neutralización del producto de la hidrólisis de los micelios del *P. ostreatus*, son similares a los de los extractos de los micelios sin tratamiento (Figura 4-4), con una marcada diferencia entre ellos en las intensidades de los picos detectados, demostrando que no hay diferencias entre los extractos en AcOEt de los micelios sin hidrolizar y los productos de la hidrolisis neutralizados, resultado que llevó a eliminar el paso de la hidrólisis para los micelios de las especies *P. pulmonarius* y *P. djamor*.

Figura 4-6: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt del producto de la hidrólisis a pH neutro de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



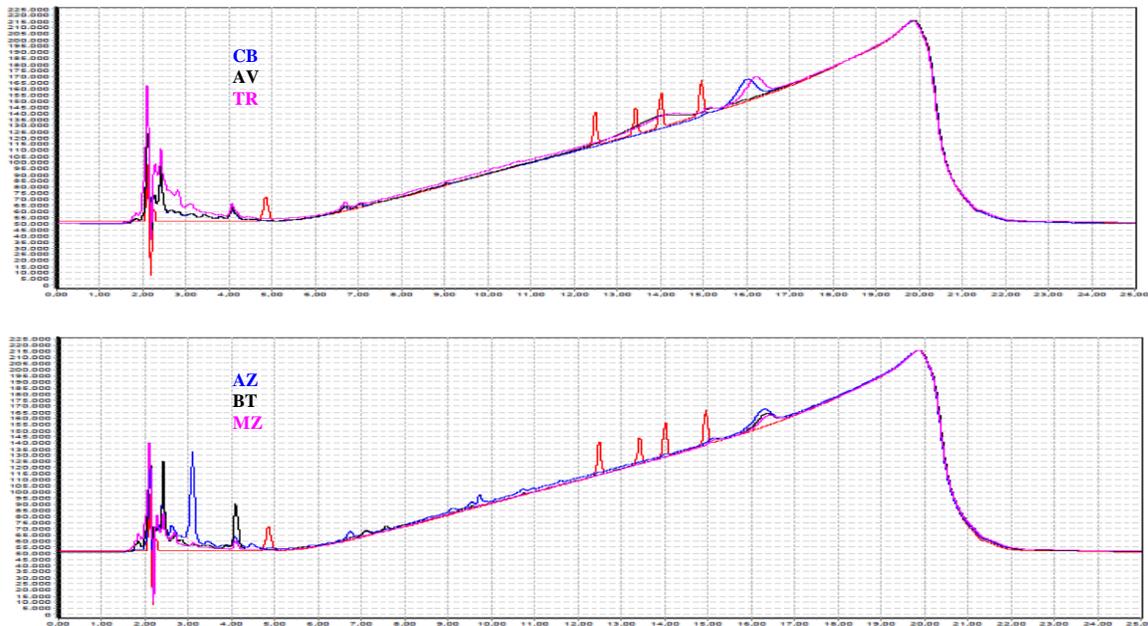


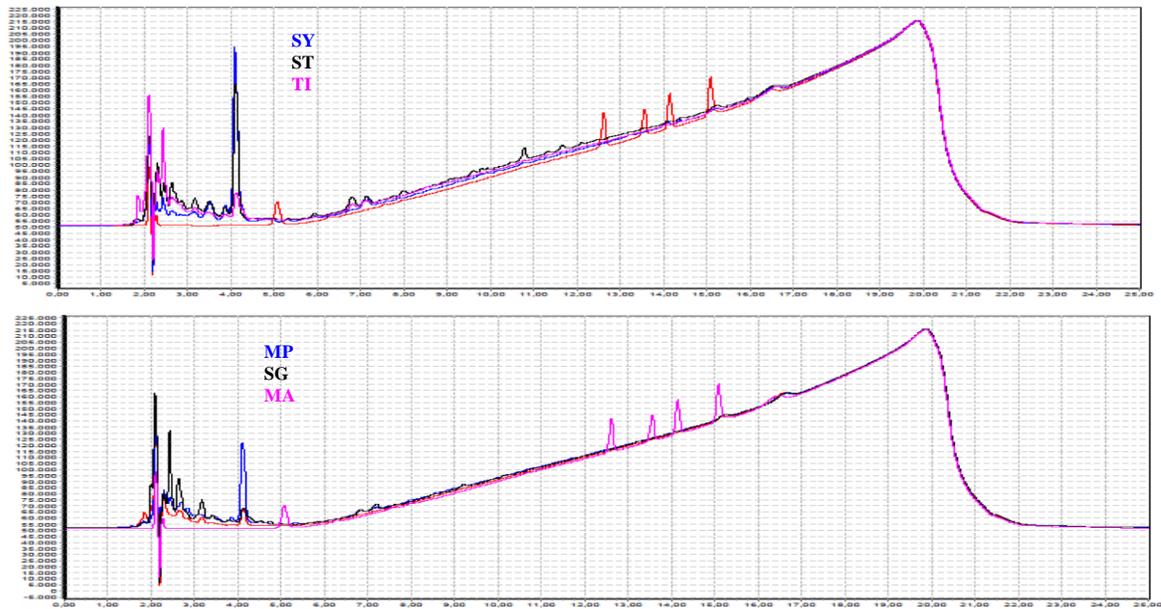
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Tiempos de retención de los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma láctónica 14,3 min; Simvastatina en forma láctónica 15,1 min.

En las figuras 4-7 y 4-8 se encuentran los perfiles de CLAE para los extractos de los medios agotados de las especies de *P. pulmonarius* y *P. djamor* respectivamente. El comportamiento es similar al observado para el *P. ostreatus* con la detección de varios picos entre 2,8 min y 4,4 min. Sin embargo sobresalen por su intensidad, para las dos especies al ser cultivadas empleando soja y salvado de trigo un pico con un t_R de 4,1 min y para el *P. pulmonarius* cultivado con harina de arroz un pico con t_R de 3,1 min.

Figura 4-7: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de *Pleurotus pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.

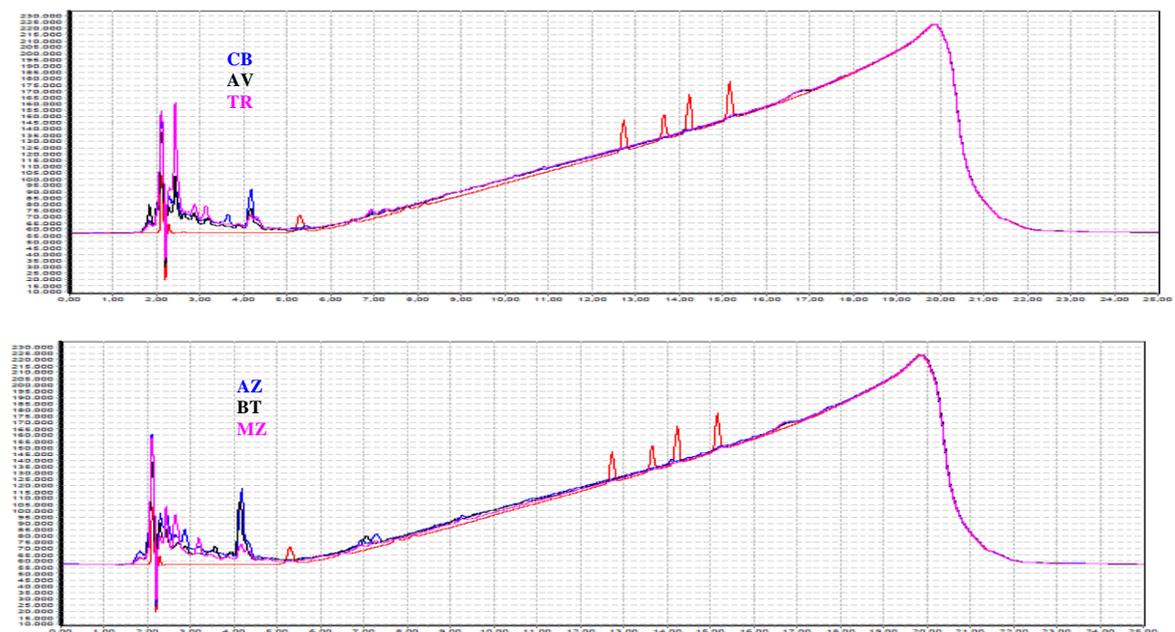


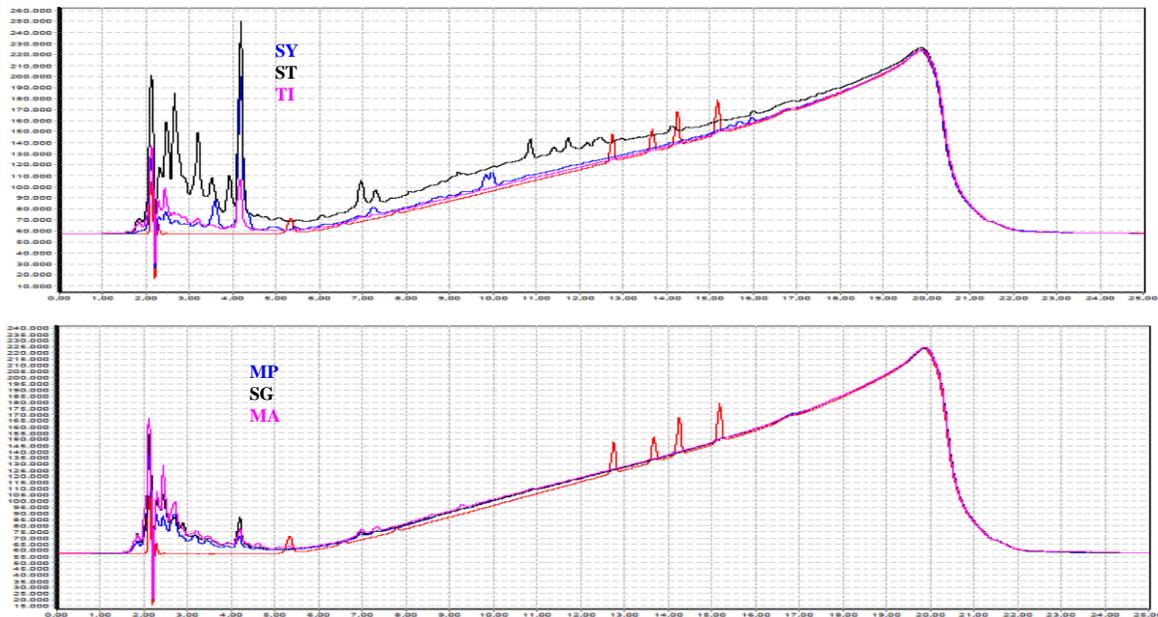


CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Tiempos de retención para los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma lactónica 14,3 min; Simvastatina en forma lactónica 15,1 min.

Figura 4-8: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los medios agotados de *Pleurotus djamor* obtenidos por FEL con las diferentes FC.

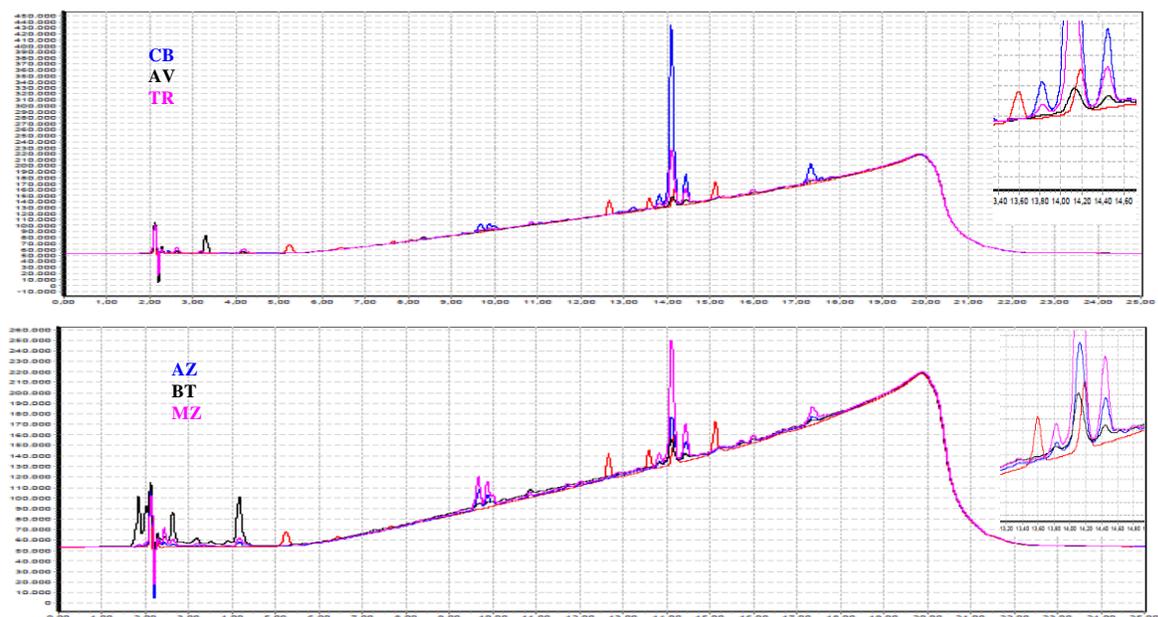


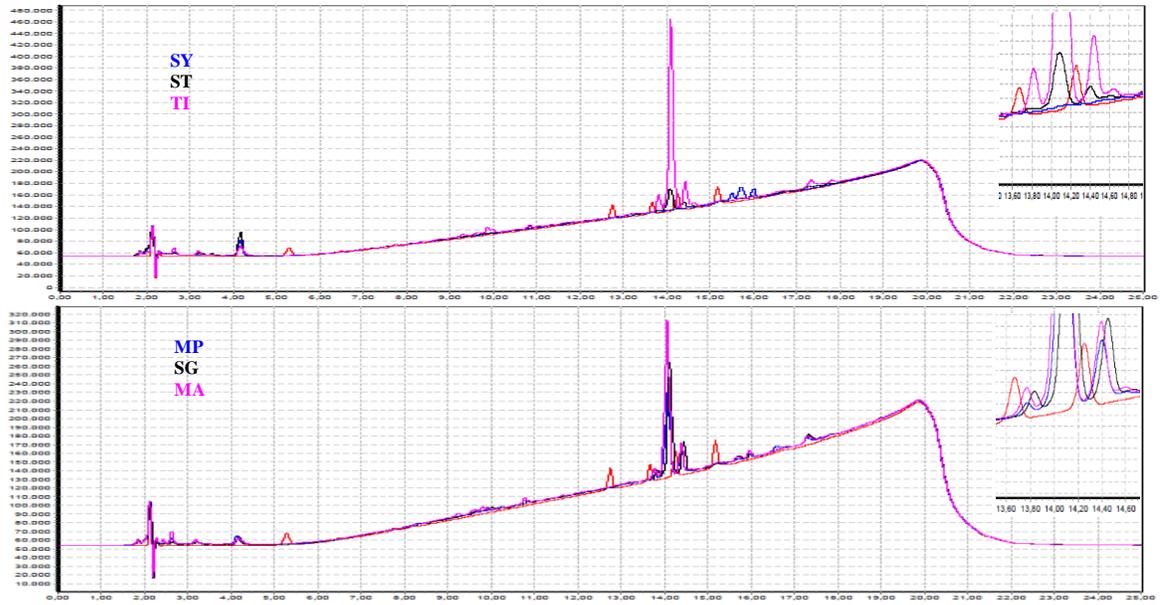


CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.
 Tiempos de retención para los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma láctónica 14,3 min; Simvastatina en forma láctónica 15,1 min.

Para el caso de los micelios de *P. pulmonarius* (Figura 4-9) y *P. djamor* (Figura 4-10), al igual que con los de *P. ostreatus*, no se detectó ningún pico que coincidiera con los t_R de los patrones. De nuevo se evidenció la presencia de los correspondientes a 14,1 min y 14,4 min, pero en este caso con mayores intensidades, no obstante para las tres especies cultivadas con TI, la altura de los picos detectados es la mayor comparada con las obtenidas con las FC restantes.

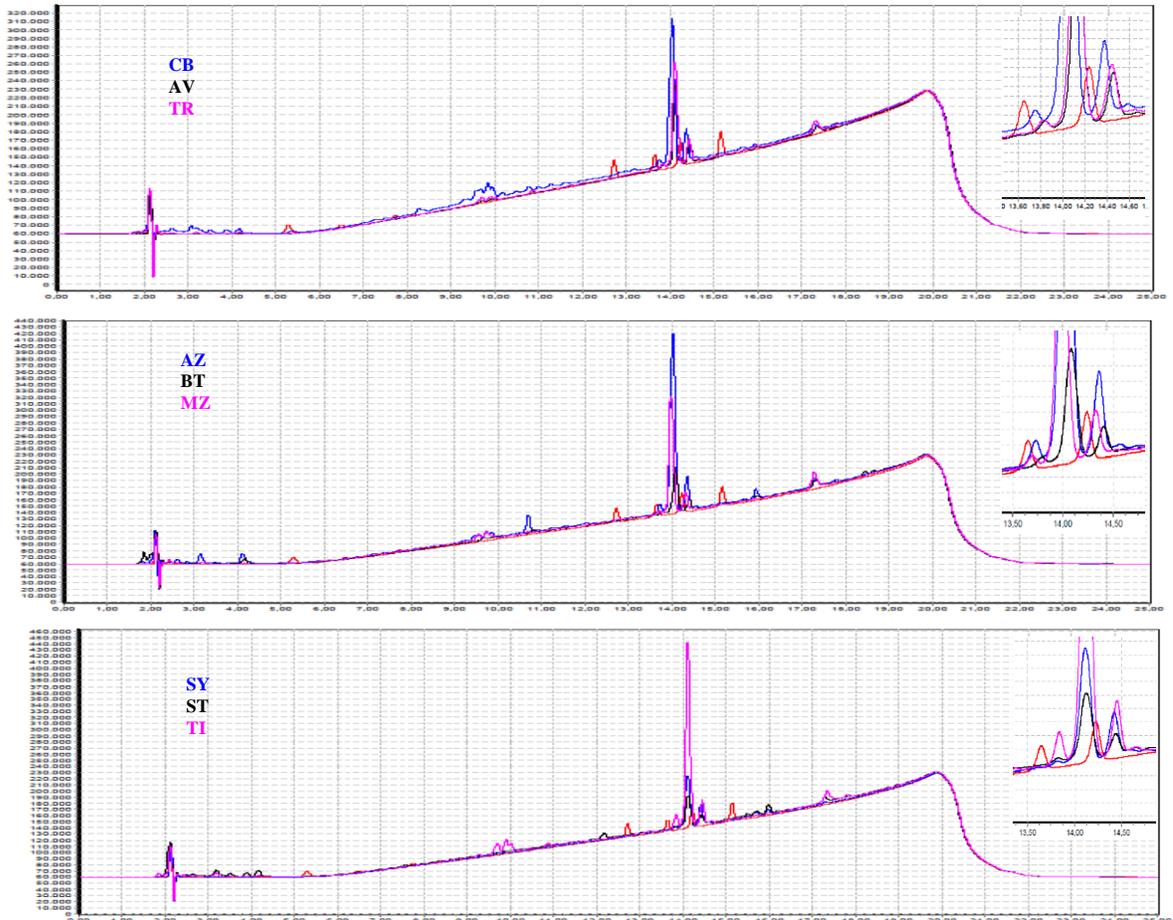
Figura 4-9: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de *Pleurotus pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.

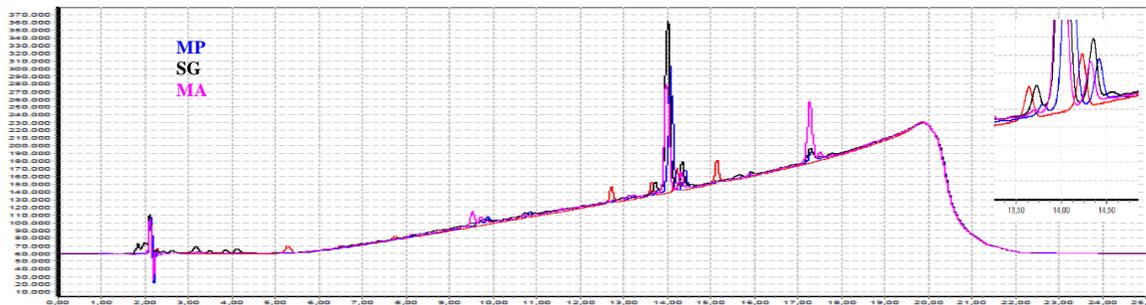




CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.
Tiempos de retención para los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma lactónica 14,3 min; Simvastatina en forma lactónica 15,1 min.

Figura 4-10: Perfiles de CLAE de los extractos en AcOEt de los micelios de *Pleurotus djamor* obtenidos por FEL con las diferentes FC.





CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Tiempos de retención para los patrones: Pravastatina 5,25 min; Hidroxiácido lovastatina 12,7 min; Hidroxiácido simvastatina 13,6 min; Lovastatina en forma lactónica 14,3 min; Simvastatina en forma lactónica 15,1 min.

Los resultados hasta ahora descritos se pueden resumir de la siguiente forma:

- a) En los extractos de los medios agotados no hubo detección de picos que coincidieran con los t_R de los patrones, independientemente de la FC o de la especie estudiada. Esta observación pone de manifiesto que aparentemente no hay excreción de las formas hidroxiácidas de las estatinas hacia el medio o que estas se encuentran en cantidades por debajo del LD de la técnica empleada, resultado contrastante con lo encontrado para *Pleurotus* por otros autores quienes reportan la presencia de estatinas en los caldos de cultivo (189, 191, 262).
- b) En los extractos de los micelios de las tres especies, con las doce harinas de cereales, se detectaron picos con intensidades altas pero que eluyen a t_R diferentes a los de los estándares, cuyos valores son intermedios a los correspondientes para las formas hidroxiácidas de la simvastatina y la lactónica de la lovastatina (14,1 min) y entre esta última y la forma lactónica de la simvastatina (14,4 min).

Estas observaciones llevan a plantear diferentes hipótesis a saber:

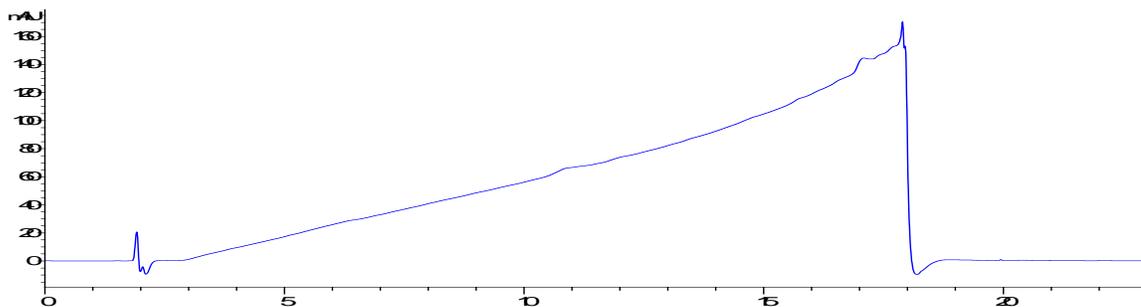
- a) Los picos detectados corresponden a componentes de los extractos diferentes de las estatinas empleadas como estándar o a derivados estructurales de ellas y/o intermediarios biosintéticos de las mismas;
- b) La metodología desarrollada no es adecuada para la detección de estatinas en este tipo de productos;
- c) Las FC empleadas no son el sustrato apropiado para la biosíntesis de las estatinas;
- d) En el estadio de desarrollo micelial no hay producción de estatinas, específicamente para estas cepas;
- e) Las cepas de trabajo no producen los bioactivos de interés.

Con el objetivo de confirmar o descartar cada una de estas suposiciones, se realizaron una serie de procedimientos experimentales que se discutirán a continuación:

4.3.2. Aproximación a la identidad de los componentes identificados por CLAE-UV en los extractos de los *Pleurotus* obtenidos por FEL

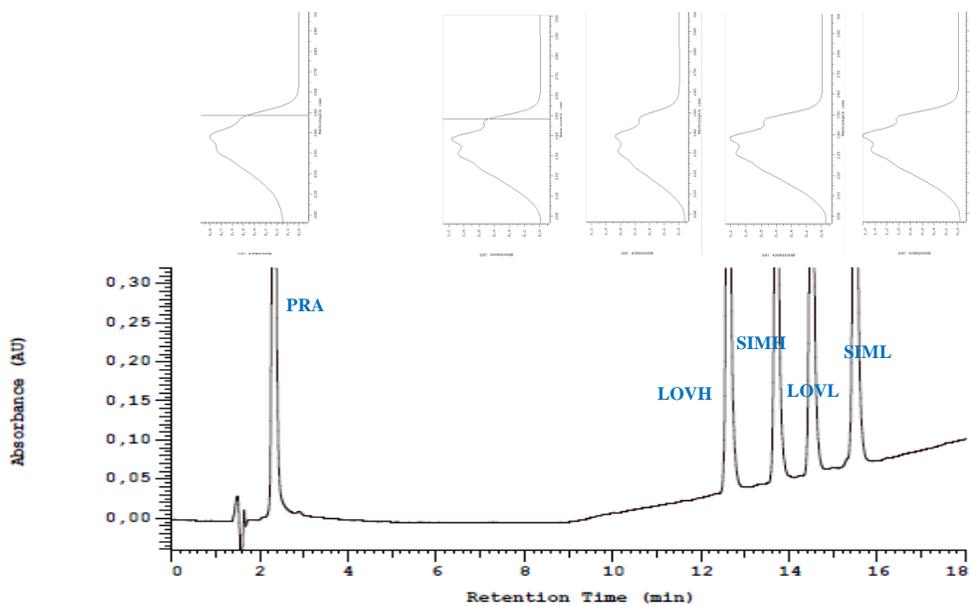
Como se describió en el capítulo 2, en los extractos de *Pleurotus* en general y en el caso particular de los empleados en esta investigación, se encuentran diferentes sustancias, en algunos casos en proporciones apreciables como ocurre con el grupo de los triterpenoides, compuestos que pueden presentar dentro de su estructura dienos conjugados. Para descartar que los picos detectados correspondan a ellos, se inyectó una solución de 1 mg/ml de mezclas de estos componentes disueltos en ACN. Como se muestra en la figura 4-11 los triterpenoides no presentan absorción a la longitud de onda de detección, por lo que se puede deducir que la identidad de las sustancias detectadas en los extractos de los micelios de *Pleurotus* no corresponde a estos metabolitos.

Figura 4-11: Cromatograma CLAE de mezcla de compuestos triterpenoidales



En la figura 4-12 se encuentra el perfil por CLAE-DAD de la mezcla de los patrones LOVL, SIML, LOVH, SIMH y PRA, en donde se observan sus espectros de absorción típicos, consistentes en un máximo en 237 nm y dos hombros en 230 nm y 248 nm, característico del dieno conjugado, que es el cromóforo de este grupo de moléculas.

Figura 4-12: Cromatograma CLAE-DAD de la mezcla de los patrones (0.1 mg/mL).



PRA: pravastatina

SIMH: simvastatina en forma hidroxilada

SIML: simvastatina en forma lactónica

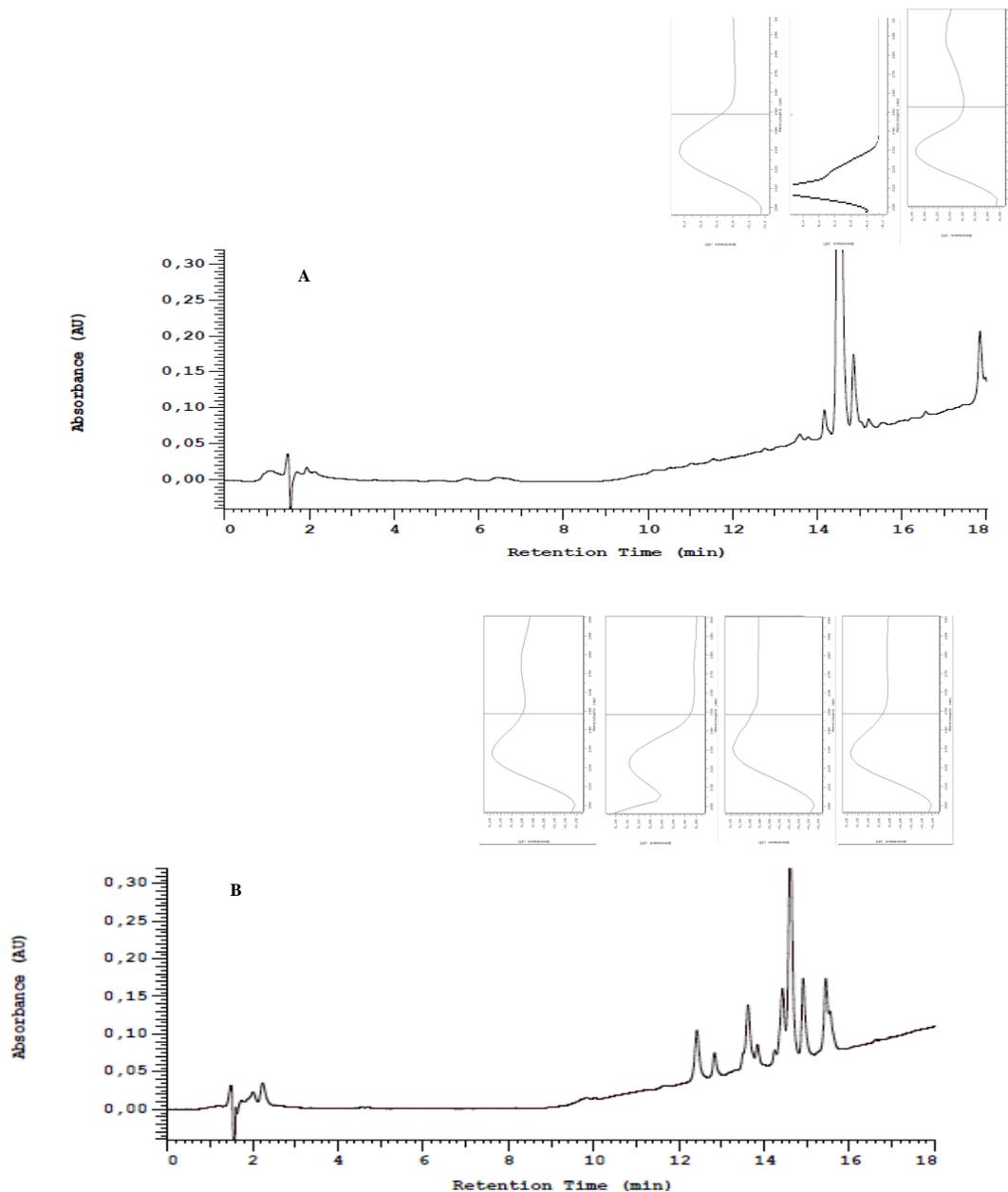
LOVH: lovastatina en forma hidroxilada

LOVL: lovastatina en forma lactónica

Se analizaron los extractos de *P. djamor* cultivado con trigo integral y del *P. ostreatus* con harina de siete granos, seleccionados con base en las intensidades de los picos detectados por CLAE-UV (Figura 4-13), de donde se puede inferir que el grupo cromóforo de los compuestos detectados no es el mismo que presentan las estatinas patrón y de algunos derivados estructurales de las mismas, que como se mencionó en el capítulo anterior y se describió en la figura 3-1, han sido reportados en literatura. Sin embargo, se podría estar frente a una estructura con algún grupo de sustituyente en el anillo de la decalina y/o intermediarios biosintéticos, que alteran su perfil al UV conservando el máximo a 237 nm pero eliminando la absorción a las otras dos longitudes de onda.

No obstante, es necesario emplear otra serie de técnicas más complejas para poder sacar una conclusión certera, como es el caso de LC/PDA/MS utilizada en el estudio de Yong-Guo et. al para la determinación de un grupo de 14 estatinas en muestras de arroz rojo fermentado (201).

Figura 4-13: Cromatograma CLAE-DAD de los extractos del micelio en AcOEt de **A)** *P. djamor* cultivado con harina de trigo integral **B)** *P. ostreatus* cultivado en harina de siete granos.



La posibilidad de que los componentes detectados tengan un patrón de fragmentación similar al de LOVL y SIML e incluso de algunos de sus similares estructurales, fue evaluada empleando CG-EM/SIM que permite, al comparar las abundancias de los iones cualificadores con la del ión target, otorgar mayor información para lograr un mejor acercamiento a la identidad de los compuestos (282, 283), que estaría dada por la conservación de dichas relaciones entre los picos detectados en los diferentes extractos de *Pleurotus*.

4.3.2.1. CG-EM en modo SIM para la detección de la producción de estatinas en los extractos de *Pleurotus*

Esta metodología ofrece la ventaja sobre el modo SCAN de una mayor sensibilidad, comprobada experimentalmente para el caso particular de las estatinas, con detección de cantidades cercanas a 1 $\mu\text{g/ml}$ comparadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ en este último modo, empleando los patrones de lovastatina y simvastatina en sus formas lactónicas.

Como se mencionó al inicio de la discusión de este capítulo, en los cromatogramas de gases de las formas lactónicas de los patrones de lovastatina y simvastatina, se observan dos picos para cada uno de ellos, generados por diferentes fragmentaciones a partir del M^+ . Se seleccionaron los iones característicos que, teniendo en cuenta las similitudes estructurales son los mismos para la lovastatina y la simvastatina (Figuras 4-14 y 4-15), e incluso para algunos de sus intermediarios como las monacolininas J, L, X y M, identificándose el ión target (T) o principal a una m/z (u.m.a.) = 159 y los iones cualificadores o de diagnóstico a $m/z = 198$ (Q_1) y 284 (Q_2).

Figura 4-14: Espectros de masas de los patrones de las formas lactónicas de A) lovastatina y B) simvastatina.

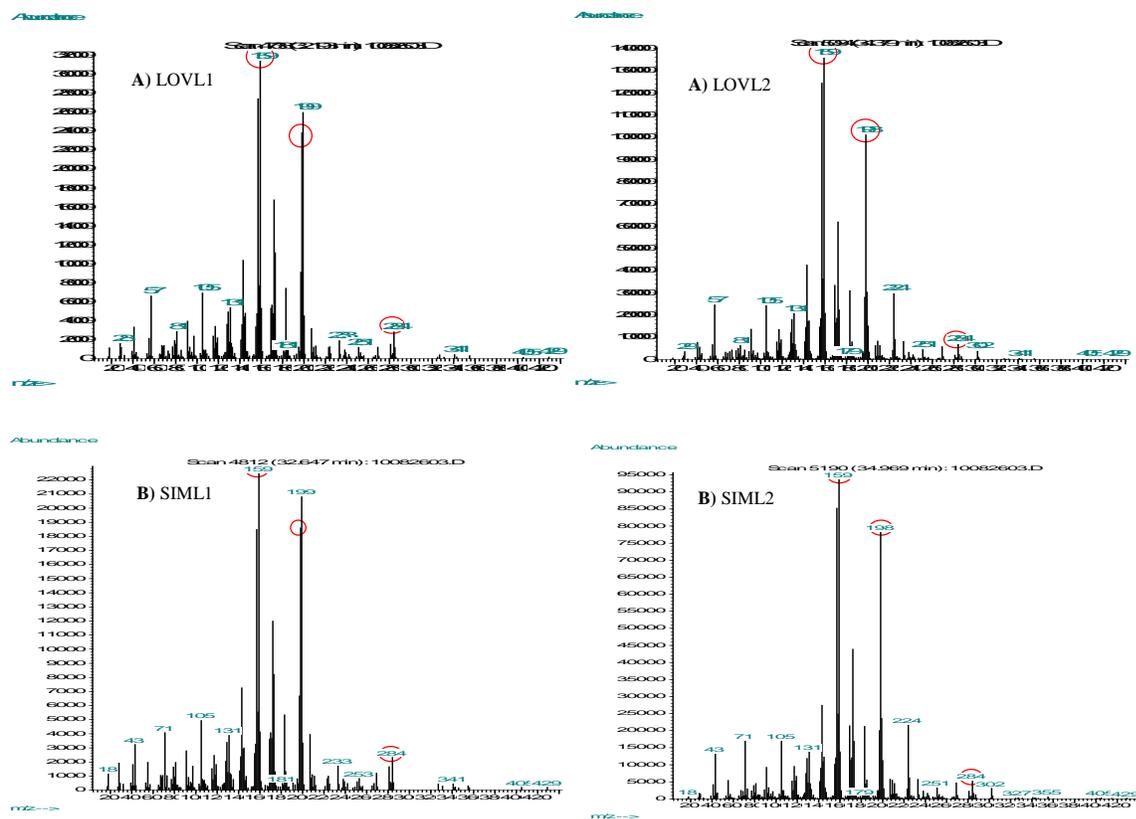
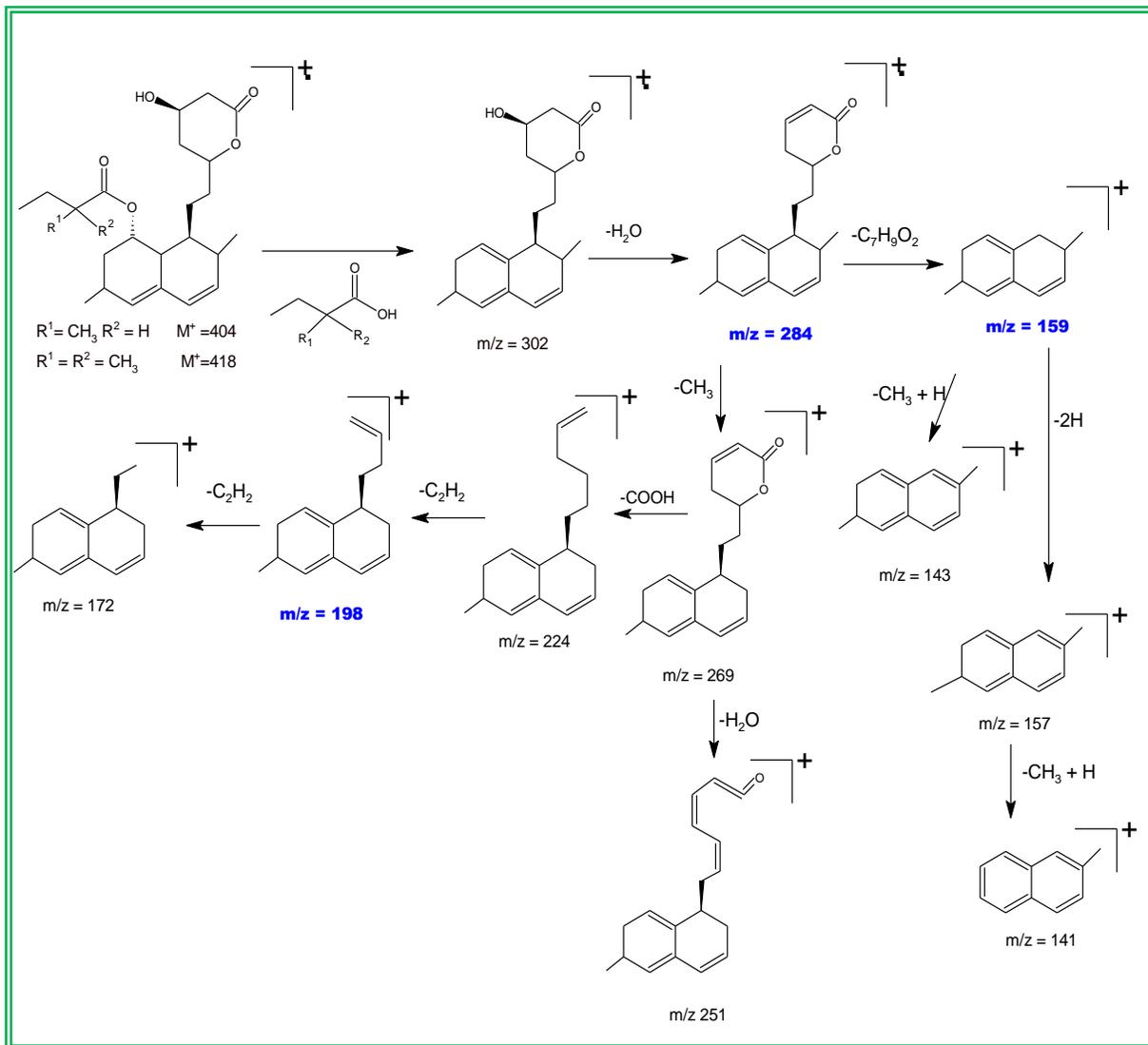


Figura 4-15: Patrón de fragmentación de lovastatina y simvastatina en forma lactónica.



Con base en la evidencia anterior es necesario tener en cuenta para el análisis por CG-EM/SIM las siguientes relaciones de las abundancias para los iones cualificadores de los patrones:

	Q_1/T (%)	Q_2/T (%)
LOV2 ($t_R = 34,379$ min)	$72,91 \pm 1,37$	$9,08 \pm 0,37$
LOV1 ($t_R = 32,193$ min)	$84,89 \pm 3,35$	$10,12 \pm 0,66$
SIM2 ($t_R = 34,969$ min)	$70,54 \pm 0,35$	$5,02 \pm 0,02$
SIM1 ($t_R = 32,647$ min)	$81,45 \pm 0,66$	$5,37 \pm 0,08$

Los resultados de la aplicación de esta metodología a los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. pulmonarius* están registrados en las tablas 4-5, 4-6 y 4-7 respectivamente. Del análisis de los datos de esta tabla se puede concluir que, a pesar de que se detectaron en varios casos picos correspondientes a los iones introducidos en el software del equipo, las relaciones de abundancias en ninguno de los casos son iguales a las de los patrones de estatinas usados, observaciones que soportan los resultados obtenidos por CLAE-UV. Cabe anotar aquí que, aunque para ilustración se colocaron en las tablas los valores obtenidos para todos los picos detectados, aquellos cuyas relaciones Q/T son muy grandes se descartaron desde el principio, debido a que este valor indica que el ión target es demasiado pequeño y por ende se desecharía la opción de estar frente a una estructura similar a la de LOVL o SIML.

Tabla 4-5: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL.

EXTRACTO	HARINA DE CEREAL	t_R (min)	Q ₁ /T (%)	Q ₂ /T (%)	
Micelio	Cebada	21,744	3047,03	3508,06	
	Avena	21,743	4,73	4008,77	
	Bienestarina	21,745	5,14	3542,71	
	Maíz	21,748	1,92	3880,92	
	Soya	21,791	2,37	4456,46	
	Salvado de trigo		37,893	48,80	330,18
			38,343	39,56	64,82
			38,987	42,42	272,29
	Trigo integral		37,897	52,31	185,51
			38,315	37,69	86,12
			38,992	40,75	106,92
	Siete granos		21,734	4,34	4406,57
			37,886	40,52	256,44
			38,301	39,97	41,65
			38,962	38,46	259,77
	Maíz amarillo		21,700	61,72	4181,06
			33,623	22,00	21,89
			33,824	22,08	38,27
		34,106	65,25	121,70	
Medio agotados	Cebada	23,698	1,34	2,31	
	Soya	34,665	77,08	104,34	
Producto hidrólisis pH básico	Cebada	27,738	3,96	4371,69	
	Avena	21,731	11,88	5971,76	
	Salvado de trigo	21,695	38,35	4987,11	
	Siete granos	21,91	22,43	2682,45	

Q₁ m/z = 198; Q₂ m/z = 284; T m/z=159.

Q/T (%) es el resultado de los valores de las abundancias de los iones cualificadores (Q₁, Q₂) dividido por la abundancia del ión target (T) x 100.

Continuación tabla 4-5: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por FEL.

EXTRACTO	HARINA DE CEREAL	t_R (min)	Q_1/T (%)	Q_2/T (%)
Producto hidrólisis pH neutro	Cebada	21,785	16,07	18625,99
	Arroz	21,691	40,18	1722,56
	Bienestarina	19,667	14,02	5081,84
	Maíz	19,654	11,30	4328,62
		21,691	93,58	5182,07
	Soya	19,597	10,68	48,41
		21,686	63,23	6920,19
	Salvado de trigo	19,597	13,74	4267,64
	Trigo integral	30,089	76,15	8,33
		31,989	77,58	3,75

Q_1 m/z = 198; Q_2 m/z = 284; T m/z=159.

Q/T (%) es el resultado de los valores de las abundancias de los iones cualificadores (Q_1 , Q_2) dividido por la abundancia del ión target (T) x 100.

Tabla 4-6: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de *Pleurotus pulmonarius* obtenidos por FEL.

EXTRACTO	HARINA DE CEREAL	t_R	Q_1/T	Q_2/T
Medio agotado	Cebada	20,680	30,33	2,86
		32,192	69,08	8,25
		32,636	79,96	9,80
		34,294	66,21	6,28
	Soya	25,306	28,64	35,22
Micelio	Cebada	21,725	12,95	4912,62
	Avena	21,725	15,19	5589,40
	Trigo	21,729	14,14	5113,99
	Arroz	21,723	17,18	6694,35
		21,741	13,32	5003,54
	Bienestarina	24,182	7,00	191,85
		21,719	11,64	6349,27
	Soya	21,713	31,70	19273,34
	Salvado de trigo	21,721	6,47	11541,79
		34,601	23,64	2,41
	Trigo integral	21,744	5,19	5482,72
	Maíz pinto	19,619	8,26	3542,70
	Siete granos	21,708	49,10	15646,55
	Maíz amarillo	19,615	21,12	3656,95
21,688		51,18	4462,59	

Q_1 m/z = 198; Q_2 m/z = 284; T m/z=159.

Q/T (%) es el resultado de los valores de las abundancias de los iones cualificadores (Q_1 , Q_2) dividido por la abundancia del ión target (T) x 100.

Tabla 4-7: Tiempos de retención y abundancias relativas de los iones cualificadores respecto al ión target, para los picos detectados por CG-EM / SIM en los diferentes extractos en AcOEt de *Pleurotus djamor* obtenidos por FEL.

HARINA DE CEREAL	t_R	Q ₁ /T	Q ₂ /T	HARINA DE CEREAL	t_R	Q ₁ /T	Q ₂ /T
Cebada	37,889	58,92	217,88	Arroz	37,880	53,63	112,43
	38,969	39,34	101,91		38,978	74,28	199,77
Avena	37,889	35,00	143,23	Salvado de trigo	34,272	64,59	6,44
	38,318	29,46	143,47		36,715	7,55	6,86
	38,978	30,89	192,82		37,889	61,93	164,91
	37,889	41,95	124,14		38,372	32,57	49,79
	38,319	36,31	82,60		38,98	27,44	125,17
	38,986	35,62	111,79		37,887	51,94	171,80
Bienestarina	37,886	433,35	203,39	Maíz	38,325	36,26	39,78
	38,316	36,23	143,13		38,973	32,37	171,25
	39,895	37,48	270,95				
Trigo integral	37,882	53,89	213,96	Maíz amarillo	37,878	47,63	184,62
	38,975	30,01	197,97		38,956	48,99	121,67
Maíz pinto	37,876	47,12	142,04				
	38,977	47,88	110,67				

Q₁ m/z = 198; Q₂ m/z = 284; T m/z=159.

Q/T (%) es el resultado de los valores de las abundancias de los iones cualificadores (Q₁, Q₂) dividido por la abundancia del ión target (T) x 100.

4.3.3. Aplicabilidad de la técnica de CLAE-UV desarrollada a productos con la presencia comprobada de estatinas

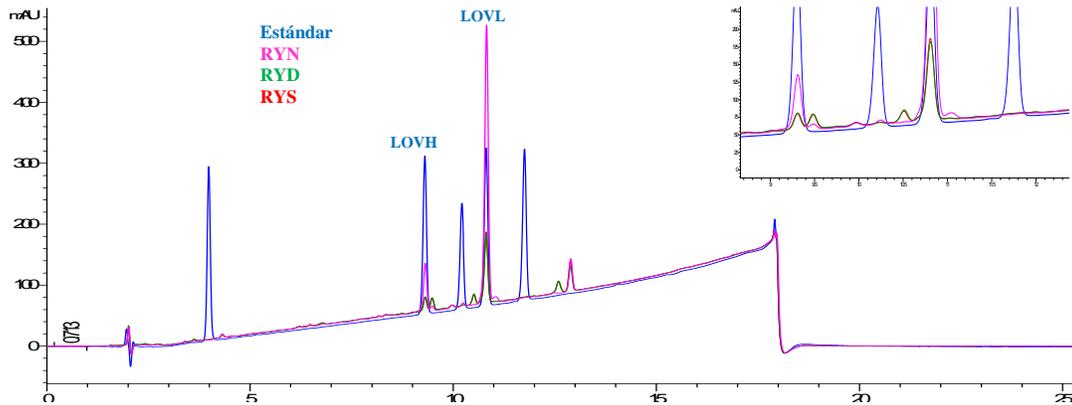
Con el objetivo de confirmar o descartar la aplicabilidad de la técnica desarrollada a productos naturales que contengan las estatinas y que sean provenientes de matrices similares a los productos biotecnológicos obtenidos en el presente estudio, se analizaron por CLAE-UV dos grupos de extractos: 1) Tres marcas de arroz fermentado con el hongo micromiceto *Monascus purpureus* conocido como arroz rojo fermentado, que se ha reportado en literatura como un importante producto nutracéutico por la presencia de estatinas (284-286); 2) Extractos de cuatro cepas de *Pleurotus ostreatus* reportadas como productoras de lovastatina.

En la Figura 4-16 se observan los cromatogramas para los tres extractos del arroz rojo fermentado en donde se evidencian claramente los picos correspondientes con LOVL y LOVH en todos los casos.

En el marco de la presente investigación se realizó una pasantía en el laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales, del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío-Bío en Chillan Chile, en el que se han adelantado investigaciones relacionadas con la optimización en el proceso de producción de estatinas en especies del género *Pleurotus*. En el cepario de este laboratorio se encuentran cuatro especímenes de la especie *Pleurotus ostreatus* denominadas PL124, PL127, PL136 y PL143 en las que se ha detectado lovastatina (189). Las cepas

fueron activadas y cultivadas con la metodología estandarizada por el grupo de investigación mencionado (188). Posteriormente se extrajeron aplicando el procedimiento descrito en el actual estudio y se analizaron por CLAE-DAD.

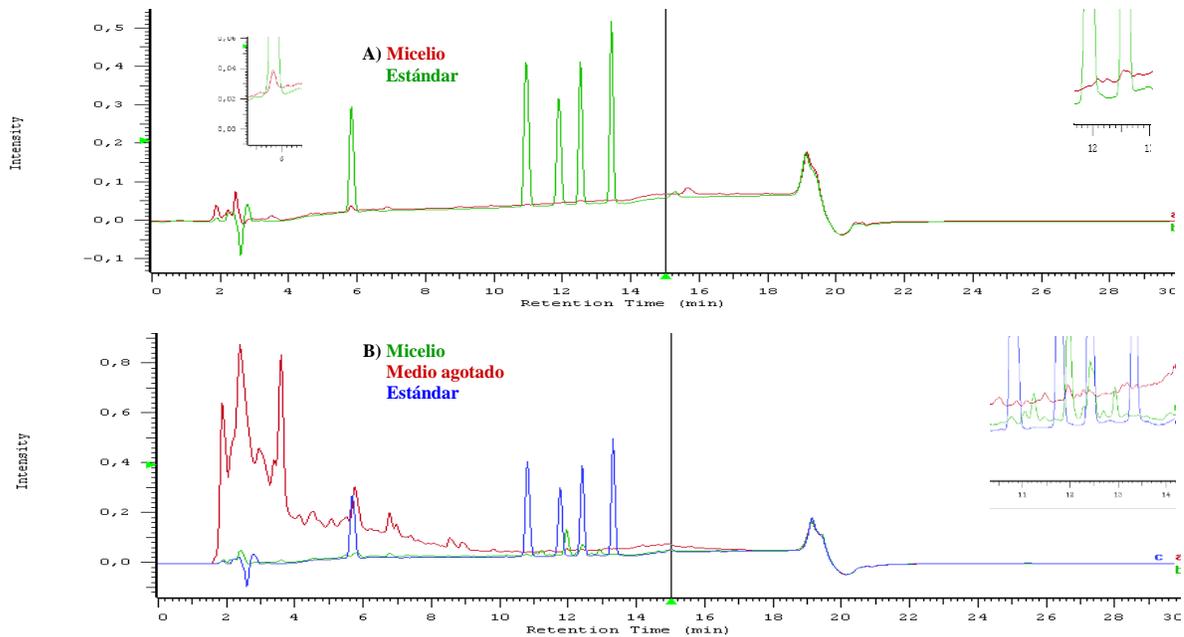
Figura 4-16: Cromatograma CLAE del extracto en AcOEt de las muestras de arroz rojo fermentado comerciales.



RYS: "Traditional Red Yeast ®" Swanson Premium Brand, RYD "Traditional Red Yeast ®" Doctors's AZ, RYN "Red Yeast Rice ®" Nature's Plus.

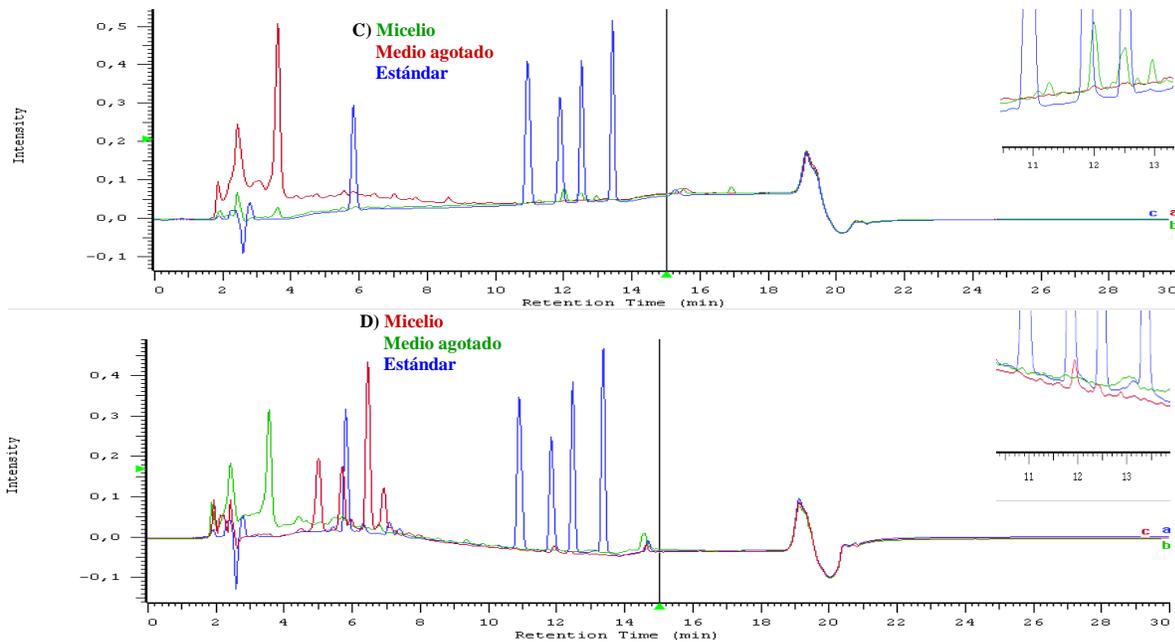
En la figura 4-17 están los cromatogramas obtenidos para los extractos de los productos biotecnológicos, observando la presencia de LOVL en diferentes proporciones, todas ellas bajas, en los micelios de las cuatro cepas.

Figura 4-17: Cromatogramas de CLAE de los extractos de los productos biotecnológicos de las cepas de *Pleurotus ostreatus* de la Universidad del Bío-Bío cultivadas con el medio Hagen modificado.



A) PL124, B) PL127

Continuación figura 4-17: Cromatogramas de CLAE de los extractos de los productos biotecnológicos de las cepas de *Pleurotus ostreatus* de la Universidad del Bío-Bío cultivadas con el medio Hagen modificado.



C) PL136 y D) PL143.

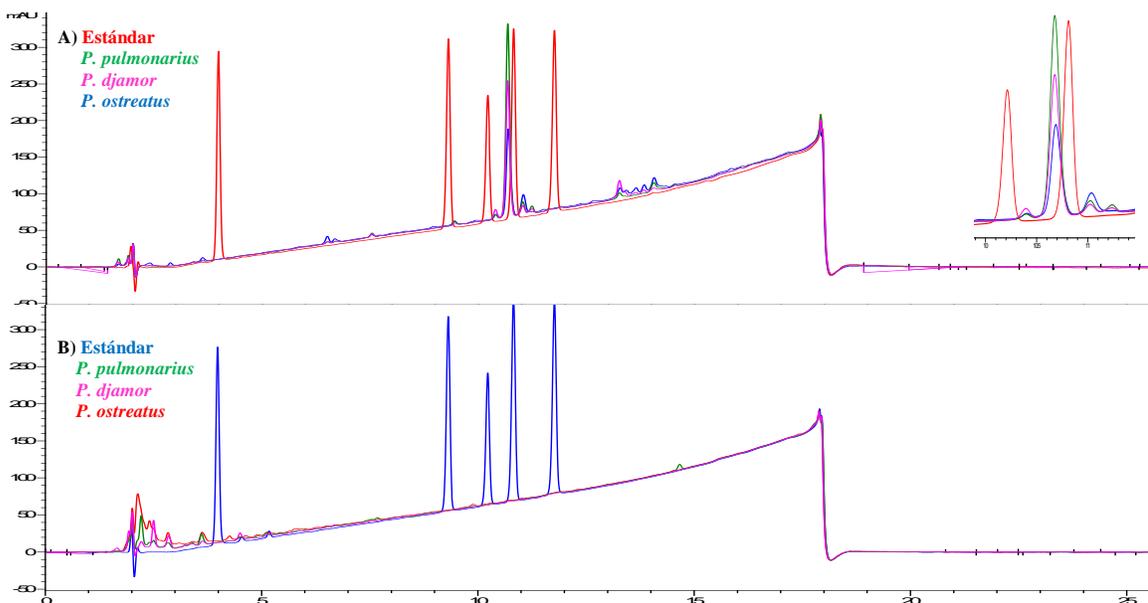
Con base en estas observaciones y en los resultados descritos para el arroz rojo fermentado, se puede concluir que el método desarrollado si es aplicable para el estudio de las estatinas en este tipo de matrices. Es importante en este punto mencionar que estos cultivos se realizan por primera vez con las cepas antes mencionadas en el medio de cultivo que los autores determinaron como óptimo para la cepa nativa por ellos denominada PLUBB127, el cual es diferente ya que no contiene harinas de cereales como FC. Los resultados encontrados además de aportar al presente estudio abren las puertas para futuras investigaciones relacionadas con medio de cultivo - producción de estatinas, con las cepas con que cuenta el grupo de investigación de la Universidad del Bio-Bio.

4.3.4. Cambios en la composición del medio de cultivo para la producción de estatinas en *Pleurotus*

Con el fin de evaluar la tercera hipótesis planteada, concerniente al hecho de que FC no convencionales no son un medio apropiado para la producción de estatinas, en el caso particular de las cepas empleadas, se realizó el proceso biotecnológico para las tres especies de *Pleurotus* utilizando las mismas condiciones de cultivo reportadas por Alarcón et al. (189), para las que los autores reportan producción de estatinas. Este procedimiento fue realizado en el laboratorio de

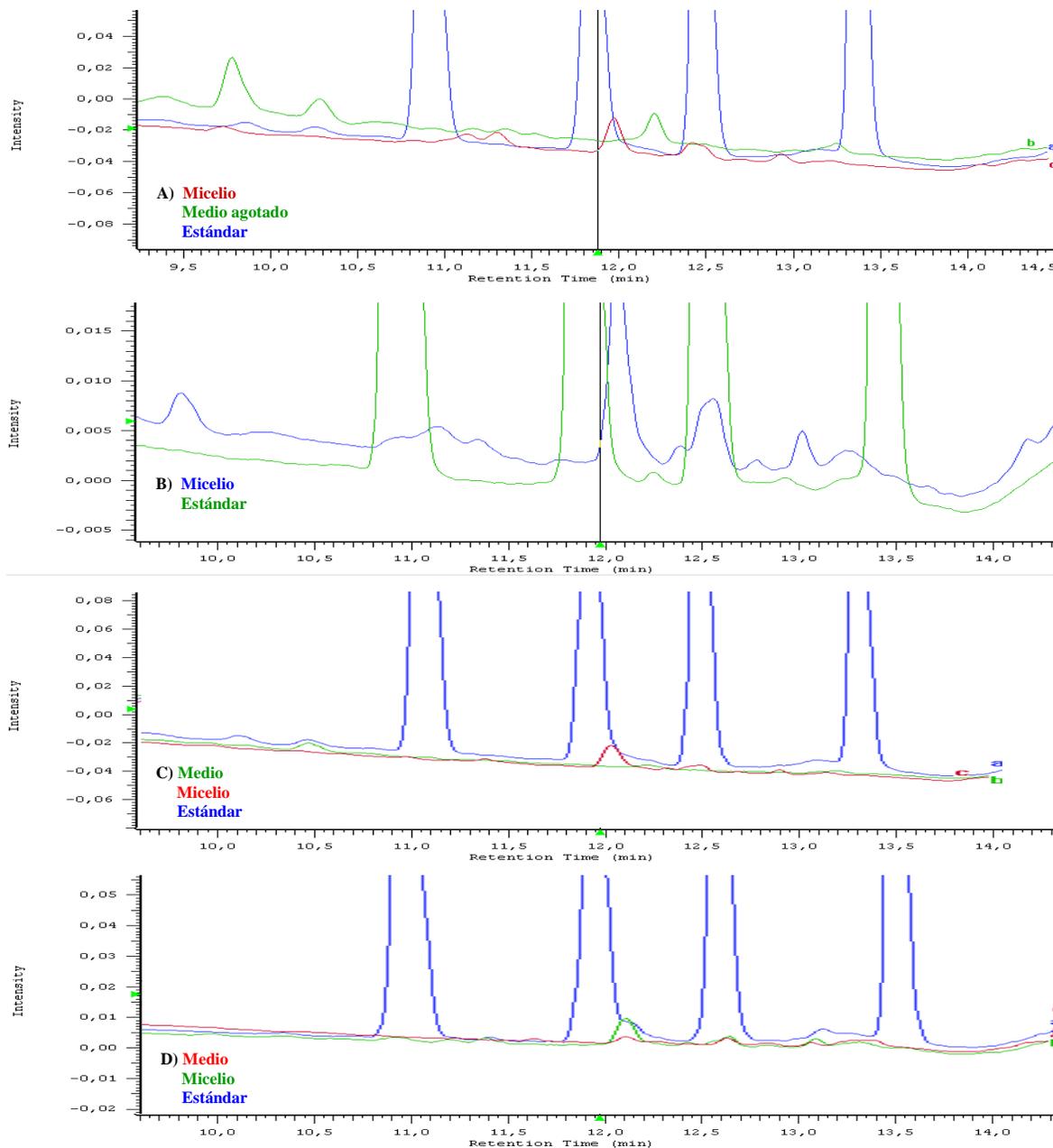
Biotecnología de la Universidad de Antioquia cuyos investigadores hicieron llegar las muestras para su posterior estudio químico. En la Figura 4-18 se muestran los cromatogramas de los extractos provenientes de los micelios y medios agotados obtenidos bajo estas condiciones, de cuyo análisis se puede deducir que no es la composición del medio la que no proporciona las condiciones para la biosíntesis de las estatinas empleadas como estándares, puesto que de ser así, estas hubieran sido producidas utilizando el medio reportado por Alarcón. Esta hipótesis se refuerza por la ausencia de estatinas cuando se empleó el salvado de trigo, cereal que ha sido reportado como uno de los sustratos más eficientes en la producción de estatinas empleando FES, tanto en micromicetos como en *Pleurotus* (189, 236, 260, 287).

Figura 4-18: Cromatograma CLAE de los extractos en AcOEt de A) los micelios y B) los medios agotados de las tres especies de *Pleurotus* cultivadas en las condiciones especificadas por Alarcón et al. (189).



Así mismo, se realizó el cultivo de las cepas chilenas en salvado de trigo para evaluar el efecto del empleo de este tipo de FC sobre la producción de las estatinas. Como se observa en la figura 4-19, al igual que en el caso del medio Hagen modificado, para las cuatro cepas se detecta la presencia de un pico con el mismo t_R de LOVL, que varía en la intensidad entre las mismas. Este análisis respalda el planteamiento de que, para el caso particular de las cepas de *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*, no es la composición del medio la que impide la biosíntesis de las estatinas con los t_R coincidentes con los patrones utilizados.

Figura 4-19: Cromatogramas de CLAE de los extractos de los productos biotecnológicos de las cepas de *Pleurotus ostreatus* de la Universidad del Bío-Bío cultivadas con salvado de trigo.



A) PL124, B) PL127, C) PL136 y D) PL143.

4.3.5. Evaluación del efecto del estadio de maduración en la producción de estatinas

El desarrollo de un hongo desde el micelio primario hasta la formación de lo que comúnmente se conoce como “seta” pasa por diferentes estadios que involucran desde una serie de finos filamentos llamados hifas, que en conjunto forman lo que se denomina micelio y que bajo condiciones

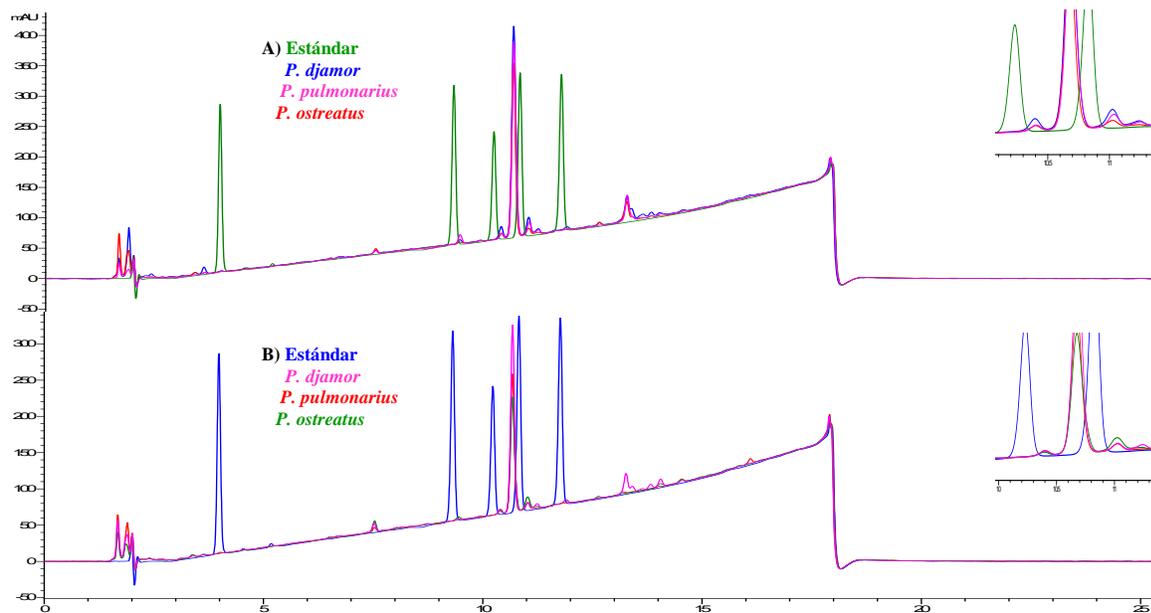
favorables de humedad y temperatura, se extiende sobre un sustrato adecuado y se transforma en pequeños aglutinaciones que van aumentando de tamaño hasta formar la típica seta (288). Se ha demostrado que en ocasiones cuando los hongos crecen en sustratos sólidos, generando las setas o fructificaciones, muestran un espectro notablemente alterado de los metabolitos secundarios comparado con los micelios, tal es el caso de los *Streptomicetos*, en los que la producción de metabolitos secundarios parece estar asociada con la formación de hifas aéreas y de esporas en la fase estacionaria de crecimiento. Varios metabolitos secundarios incluso se producen solamente durante su crecimiento en sustratos sólidos, aunque los hongos en cuestión pueden ser realmente cultivados en procesos sumergidos (289).

Con base en estas observaciones se contempló la posibilidad de que las cepas empleadas en el presente estudio no sintetizaran las estatinas en el estadio micelial. A pesar de que ya hay reportes de la presencia de este grupo de compuestos en *Pleurotus* durante todo su ciclo de formación (190, 192, 278), es importante tener en cuenta que, como se ha comprobado en diferentes partes de la presente investigación, el comportamiento en términos del metabolismo secundario varía con los géneros, las especies e incluso con las cepas.

Según el reporte de Gunde-Cimerman se determinó que en las fructificaciones de 5cm de diámetro, estadio en el que se encuentran inmaduras, la lovastatina está distribuida uniformemente en el esporocarpio y que posteriormente el metabolito es transferido a las lamelas por su rol como un agente fungicida el cual ayuda al hongo a someterse a la competencia al inicio de su crecimiento bajo condiciones limitadas de nutrientes (190).

Con base en lo anterior se realizó el cultivo por FES de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. pulmonarius*, y la posterior extracción de los cuerpos fructíferos completos de los hongos obtenidos, así como solamente sus lamelas. Como se observa en la figura 4-20 el comportamiento de los extractos en AcOEt, tanto de los carpóforos como de las lamelas, es igual al observado en el caso de los micelios obtenidos por FEL, resultado que permite descartar la hipótesis de que las cepas estudiadas en su estadio micelial no biosintetizan las estatinas, al menos las formas latónicas de SIM y LOV, sus hidroxíácidas y la PRA.

Figura 4-20: Cromatograma CLAE de los extractos de **A)** Cuerpos fructíferos de 5cm de diámetro y **B)** lamelas de las tres cepas de *Pleurotus* cultivadas por FES.



La unión de los resultados hasta el momento descritos llevan a plantear dos hipótesis finales:

- los componentes detectados en los extractos de los micelios de las tres especies de *Pleurotus* no comparten exactamente el grupo cromóforo de los estándares de las estatinas empleados, así como tampoco presentan un patrón de fragmentación similar a ellos, pero su comportamiento cromatográfico permite inferir que tienen características estructurales parecidas a las de los compuestos empleados como patrón. Para confirmar esta hipótesis es necesario aplicar técnicas analíticas como LC-MS o LC-QTOF/MS que permitan obtener resultados más certeros al respecto;
- las cepas de *Pleurotus* utilizadas para el estudio no son productoras de estatinas, deducción que está acorde con reportes de literatura como los de Schneider et. al y Gil-Ramirez et. al, quienes encontraron que dos cepas de *Pleurotus*: *ostreatus* y *ostreatus* (Jacq.Ex Fr.) Kummer respectivamente, no producen este grupo de metabolitos secundarios, pero si presentan un efecto hipocolesterolémico que los primeros autores atribuyen a la presencia de esteroides y/o ácido linoléico, compuestos reportados con acciones reductoras sobre los niveles de lípidos. En el estudio de Gil-Ramírez et. al. se menciona que a pesar de no ser una estatina la responsable de la bioacción, si hay una alteración en la síntesis de colesterol endógeno por inhibición de la HMG-CoA reductasa, mecanismo que es el empleado por las estatinas (193, 290).

4.4. CONCLUSIONES

- En los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de las tres especies de *Pleurotus* cultivadas empleando las doce fuentes de carbono, no se detectaron por CLAE-UV, picos que coincidieran con los t_R de las formas lactónicas de la simvastatina, la lovastatina, sus correspondientes hidroxiácidos y la pravastatina.
- Se detectaron en los micelios para las tres especies dos picos con t_R de 14,1min y 14,4min intermedios entre la forma hidroxiácida de la simvastatina y la lactónica de la lovastatina, y entre esta última y la lactónica de la simvastatina, con intensidades variables entre las fuentes de carbono empleadas.
- Relacionado con la identidad de los compuestos detectados por CLAE-UV se concluyó que:
 - No corresponden a triterpenoides;
 - El grupo cromóforo de los compuestos detectados no es exactamente el mismo que presentan las estatinas patrón y algunos derivados estructurales de las mismas, sin embargo tienen comportamientos cromatográficos que permiten pensar en estructuras similares a ellas;
 - Por CG-EM/SIM se determinó que no presentan el patrón de fragmentación de las formas lactónicas de la lovastatina y la simvastatina.
- La técnica de CLAE-UV es una metodología eficiente aplicable en la detección de estatinas naturales presentes en productos biotecnológicos.
- No es el empleo de Las FC no convencionales como componentes del medio de cultivo el factor que inhibe la biosíntesis de estatinas, debido a que el uso del medio reportado en literatura como óptimo para su producción en *Pleurotus* no estimula la biosíntesis de estos metabolitos en las especies empleadas en este estudio.
- Para las fructificaciones y las lamelas de las tres especies de *Pleurotus* obtenidas por FES el perfil cromatográfico es igual al presentado para los micelios obtenidos por FEL, lo que lleva a inferir que el estadio de maduración no incide en la producción de los componentes detectados por CLAE-UV para las cepas estudiadas.
- El empleo de una técnica como LC-MS o LC-QTOF/MS es una herramienta que permitiría confirmar o descartar las hipótesis planteadas relacionadas con la estructura de los metabolitos detectados.

**CAPITULO 5. CONTRIBUCIÓN DE LA
COMPOSICIÓN GENERAL DEL PRODUCTO
BIOTECNOLÓGICO A SU CARÁCTER
NUTRICEÚTICO**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ABN	Alcohol bencílico
AMQ	6-(N-alilamino)-7-metil-quinolina
ANS	Anhídrido succínico
AV	Harina de avena
AZ	Harina de arroz
BNZ	Ácido benzoico
BP	Blanco del proceso
BT	Bienestarina
BZX	2(3H)-benzoxazolona
CB	Harina de cebada
CFS	4-Clorofenilsulfona
CIN	Ácido cinámico
CTBA	Citrato de tributilacetilo
DAL	2-Decenal
DEC	Ácido decanoico
DEL	2,4-Decadienal
DHT	2,3-Dihidrotiofeno
DOP	Ftalato de octilo
EIC	Ácido eicosanoico
EMC	1-Etil-3-metilcilohexano
EPS	Exopolisacáridos
ESC	Escualeno
ESET	Estereato de etilo
EST	Ácido esteárico
EVA	Etilvainillina
FC	Fuente de carbono
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
FMI	3-Fenil-2-metilindol
FNA	Ácido fenilacético
FTBU	Ftalato de butilo
HBZ	p-Hidroxibenzaldehido
HC	Blanco de la harina de cereal
HDF	5-(1-Hidroxietil)-2(3H)-dihidrofuranona
HEX	Ácido hexanoico

HPT	Heptacosano
HTL	2-Heptenal
HXC	Hexacosano
I	Extracto proveniente de micelio
IAL	1H-Indol-carboxaldehído
IPP	2-Isopropilpsolareno
IPS	Intrapolisacáridos
LIET	Linoleato de etilo
LIME	Linoleato de metilo
LIN	Ácido linoleico
MA	Harina de maíz amarillo
MBZ	p-Metoxibenzaldehído
MIET	Miristato de etilo
MIR	Ácido mirístico
MP	Harina de maíz pinto
MVA	Metilvainillina
MVF	2-Metoxi-5-vinilfenol
MZ	Harina de maíz
NAL	Nonanal
NIT	Ácido m-nitroftálico
NON	Ácido nonanoico
NOS	Nonacosano
OAL	2-Octenal
OCS	Octacosano
OCT	Ácido octanoico
ODO	9,12-Octadecadienol
OLD	Oleamida
OLE	Ácido oleico
OLET	Oleato de etilo
OLME	Oleato de metilo
PAET	Palmitato de etilo
PAL	Ácido palmítico
PAME	Palmitato de metilo
PDET	Pentadecanoato de etilo
PDN	Ácido pentadecanoico
PEF	2-Pentilfurano
PEN	Ácido pentanoico
PTC	Pentacosano
SG	Harina de siete granos
ST	Salvado de trigo
SUCC	Ácido succínico
SY	Harina de soya
TI	Harina de trigo integral
TR	Harina de trigo
TTC	Tetracosano
UND	undecenal
XLN	p-Xileno

5.1. ANTECEDENTES

Como se había anotado anteriormente los hongos constituyen un alimento funcional por excelencia gracias a que proporcionan, adicional a los nutrientes propios de ellos, metabolitos que son aprovechados por el organismo humano para reducir el riesgo de algunas enfermedades debido a que ejercen una amplia gama de actividades biológicas. En general, estos metabolitos bioactivos tienen baja potencia en comparación con los fármacos tradicionales, pero desde que se ingieran regularmente y en cantidades significativas como parte de la dieta (nutraceúticos) o como suplementos (nutriceúticos), pueden tener un notable efecto fisiológico a mediano y largo plazo, siendo seguros y bien tolerados. Por otro lado, se espera que presenten menos efectos secundarios que muchas de los medicamentos habitualmente prescritos en el tratamiento de ciertas patologías. Aun cuando el efecto terapéutico se asocia principalmente a aquellos compuestos que se encuentran en mayor proporción en los cuerpos fructíferos o en los micelios del hongo, no se puede dejar de lado la contribución que a dicho efecto hacen otros metabolitos que son biosintetizados en menor proporción. Está comprobado que compuestos como los ácidos grasos y los polisacáridos entre otros presentan actividad biológica.

Esta parte de la investigación está centrada principalmente en los compuestos diferentes a los triterpenoides que forman parte de los extractos en AcOEt tanto de los blancos de las FC como de los productos biotecnológicos, con la finalidad de determinar, mediante reportes de literatura, si corresponden a bioactivos que contribuyan al carácter nutriceútico de los hongos del género *Pleurotus* cultivados biotecnológicamente.

5.1.1. Compuestos fúngicos bioactivos

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por los macrohongos se encuentran triterpenoides, ácidos grasos, ácidos de cadena corta, polifenoles, polisacáridos, compuestos nitrogenados, por citar algunos, que presentan diversas acciones biológicas ya comprobadas (291-294). A continuación se detallarán aquellos que sobresalen por sus actividades y su potencial en farmacoterapia.

5.1.1.1. Polisacáridos fúngicos

Se considera a los compuestos pertenecientes a este grupo como uno de los principales responsables de las actividades biológicas atribuidas a los hongos, organismos que sintetizan un amplio espectro de polisacáridos multifuncionales incluyendo estructurales (IPS) y EPS. Varios compuestos de este tipo se han aislado principalmente desde *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*,

Schizophyllum commune, *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, *Polyporus tricoloma* (2), *Grifola umbellatae*, *Agaricus blazei* y *Pleurotus*, todos ellos ricos en β -glucanos, sin embargo, la mayoría de estudios se han enfocado en su presencia en las fructificaciones y pocos están relacionados con los micelios y los medios agotados (74, 75).

Los EPS son polímeros de monosacáridos (>20) de alto peso molecular sintetizados intracelularmente y posteriormente excretados por los microorganismos a los alrededores (295), presentan una cadena altamente ramificada de peptidoglucanos con uniones $1 \rightarrow 3$ y $1 \rightarrow 6$ (17, 18, 34, 76, 82, 296-298) y al igual que los demás fungimetabolitos, la clase y contenido de ellos, depende de la FC empleada para su desarrollo, entre otras variables implicadas en los procesos fermentativos. La glucosa, sacarosa y maltosa han sido las FC seleccionadas como las más eficientes en la producción de estos bioactivos. Actualmente cerca de 180 especies de hongos incluyendo basidiomicetos, hongos filamentosos y levaduras de diferentes ambientes ecológicos, tienen la habilidad para sintetizar EPS en sistemas de cultivo en laboratorio (296). Los polisacáridos excretados por los hongos, especialmente por los basidiomicetos clasificados como comestibles y medicinales, poseen potencial inmunomodulador, antitumoral, hipoglicémico, antibacterial, antiviral, efecto antiparasitario y pueden ser usados como insecticidas y agentes nematocidas (296). En la actualidad al menos seis polisacáridos de origen fúngico se han investigado en cáncer humano con excelentes resultados (Lentinan, Schizophylla, Polisacarido-K, Polisacárido-P, Compuestos Activos Correlacionados con Hexosa (AHCC) y la fracción D de Maitake) (17).

Específicamente para *Pleurotus* hay diferentes estudios enfocados en la presencia de este grupo de compuestos, cuyos resultados ponen de manifiesto que son las especies pertenecientes a este género una fuente promisoría para la producción de polisacáridos con potencial farmacológico al ser cultivados por FES o FEL y que la potencia de las actividades es similar para las fructificaciones y los micelios (18, 34, 299, 300). Un estudio más reciente se enfocó en la evaluación del efecto de trece agentes estimulantes (ácidos grasos, solventes orgánicos y surfactantes), en la producción de biomasa y de EPS en *P. tuber-regium*. Los autores determinaron que el ácido linoleico suprime drásticamente la producción de biomasa y de EPS, entre tanto el ácido palmítico aumenta la cantidad de EPS, sin un efecto significativo en la biomasa y mencionan que este efecto de estimulación/inhibición puede deberse a la incorporación parcial en las membranas celulares fúngicas de los ácidos grasos, aumentando o decreciendo así la eficiencia de consumo de nutrientes desde el medio de cultivo (301). Un comportamiento similar se ha manifestado en *Ganoderma lucidum*, donde de igual manera los investigadores atribuyen a la modificación de la composición de

la membrana y a un aumento de su permeabilidad, es decir la explicación es dada en términos de la estructura y la función de la misma (302).

5.1.1.2. Ácidos grasos fúngicos

Otros de los metabolitos producidos por los macromicetos son los ácidos grasos cuya importancia radica tanto en su aplicación como quimiomarcadores como en la actividad biológica que presentan. Los lípidos juegan un papel importante en el cuerpo humano, actuando como hormonas o sus precursores, ayudando en el proceso de digestión y constituyendo una fuente de energía metabólica. Se encuentran como componentes estructurales y funcionales de las biomembranas, y son los bloques básicos de la mayoría de los lípidos. Dentro de ellos los poliinsaturados de las familias ω -6 y ω -3 exhiben excelentes propiedades biológicas en bajas concentraciones y son los precursores biosintéticos de los eicosanoides (prostaglandinas por ejemplo), moléculas señalizadoras para muchos sistemas del cuerpo, presentando efectos sobre enfermedades cardiovasculares, niveles de triglicéridos, hipertensión y artritis (303).

En estudios realizados con micelios de cepas de *Pleurotus abalonus*, *P. australian.*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* y *P. sapidus*, se encontró que el ácido graso predominante es el linoleico (68% de lípidos totales), mientras que en las cepas de *P. eryngii* el principal es el oleico (46%). En todas las cepas estudiadas, los ácidos oleico y palmítico estaban presentes en cantidades significativas (12%), mientras que el ácido esteárico era el constituyente minoritario de la fracción grasa. Mediante el empleo de las relaciones de C18: 1/ C18: 0, C18: 2/ C18: 1 y C18/ C16: 0 se pudieron agrupar las cepas de *Pleurotus* en seis grandes grupos, poniendo de manifiesto su aplicabilidad en quimiotaxonomía (304). El hecho de que esta clase de metabolitos puedan emplearse como quimiomarcadores en la diferenciación intragénica, aunado a las características funcionales hace que el estudio de los mismos en los hongos comestibles revista un especial interés.

5.1.1.3. Otros compuestos fúngicos

De las especies del reino fungi, se han aislado y caracterizado otros compuestos que igualmente exhiben acciones biológicas comprobadas. Tal es el caso del ácido oxálico, agente responsable del efecto antimicrobiano de *Lentinula edodes*; de los compuestos fenólicos antioxidantes identificados en el *Inonotus hispidus* (292), entre otros basidiomicetos (294); así como lectinas, lactonas, alcaloides, antibióticos y agentes quelantes de metales, importantes para las funciones inmunes en el organismo; o el éster fenilico del ácido cafeico identificado en *Agaricus bisporus*, *Marasmius*

oreades, *Lentinula edodes* y *Phellinus linteus*, que ha mostrado resultados prometedores en células MCF-7 de cáncer de mama en humanos (127, 305).

Las actividades biológicas de los compuestos antes descritos han llevado incluso a su uso en la industria cosmética aprovechando específicamente la presencia de componentes como el ácido láctico, carotenoides, ácido kójico, ácido galico, aminoácidos como la L-ergotionina y ceramidas (306).

Finalmente también se ha reportado la presencia de lectinas, así como de un variado número de vitaminas dentro de las que se cuentan riboflavina, niacina, folatos (307) y de compuestos heterocíclicos mayoritariamente nitrogenados, oxigenados y azufrados (308).

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Material fúngico

Para esta parte del análisis se empleó el material fúngico cultivado según la metodología descrita en el capítulo 1 numeral 1.2.1 y posteriormente se extrajeron como aparece detallado en el numeral 2.2.3.

5.2.2. Evaluación de la incidencia de la fuente de carbono sobre la composición de los productos biotecnológicos

La composición de los extractos tanto de los micelios como de los caldos agotados, se determinó por CG-EM bajo las condiciones especificadas en 2.2.5.

El contenido de EPS totales se calculó por el método colorimétrico de Dubois (309), previa precipitación con etanol en frío. Los cálculos se efectuaron a partir de una curva de calibración con glucosa en un rango de concentraciones de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ con 6 niveles. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca Varian modelo Cory 50 Con a 490 nm. Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis multivariante con el programa Statgraphics 5.1, con base en los resultados de los triplicados realizados para cada caso.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo el estudio de los extractos en AcOEt está dividido en tres partes: en la primera se determinó la composición particular de las FC, centrada en los constituyentes específicos de las agrupaciones previamente definidas en el capítulo 2 (ácidos, esteroides, aldehídos y otros), a excepción de los triterpenoides ya analizados ampliamente en el numeral 2.3.2.2, con el objetivo de conocer cuáles son propios de cada una de las FC. En la segunda parte se realizó el mismo análisis pero

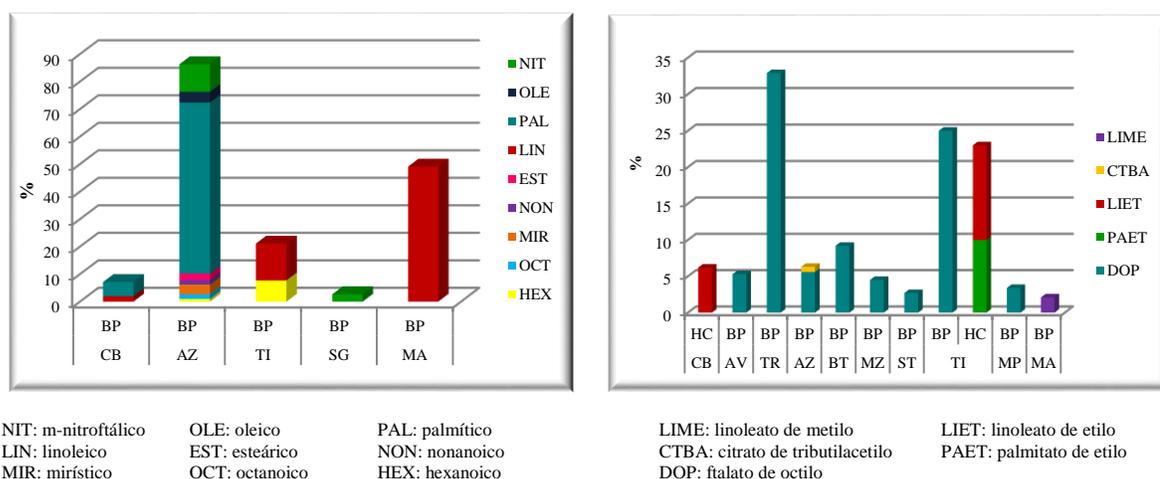
centrado en los micelios y los caldos agotados de las tres especies de *Pleurotus* obtenidas por FEL. Finalmente se evaluó el efecto de las diferentes FC en la producción de EPS.

Toda la discusión se centró en la influencia que la composición de los extractos analizados, pueda causar sobre el potencial nutriceútico de los productos biotecnológicos, teniendo en cuenta las bioacciones conocidas para los mismos.

5.3.1. Constituyentes particulares de las fuentes de carbono

En la figura 5-1 está la representación gráfica de los ácidos y los ésteres determinados en las FC así como el porcentaje relativo al total de los constituyentes detectados en cada uno de los extractos. Con respecto a los ácidos únicamente se encontraron en los blancos del proceso con cinco de las harinas empleadas (cebada, arroz, trigo integral, siete granos y maíz amarillo), resaltando que la de arroz es la que presenta el mayor contenido en términos tanto de variedad (8 compuestos) como de cantidad (86,3%), con el ácido palmítico como el mayoritario (62,2%). Entre tanto en trigo integral y maíz amarillo el ácido linoléico es el componente más abundante, resultados que están de acuerdo con los reportes en literatura, que indican que es éste último, junto con el palmítico, los ácidos grasos más comunes para los cereales en general (310, 311) y particularmente para las FC mencionadas (312-315). El hecho de que sólo aparecen en los BP puede ser debido a reacciones favorecidas por las sales adicionadas y al pH que permiten el paso de los compuestos al medio extracelular.

Figura 5-1: Comparación de los ácidos y ésteres presentes en los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y en las harinas de cereales.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

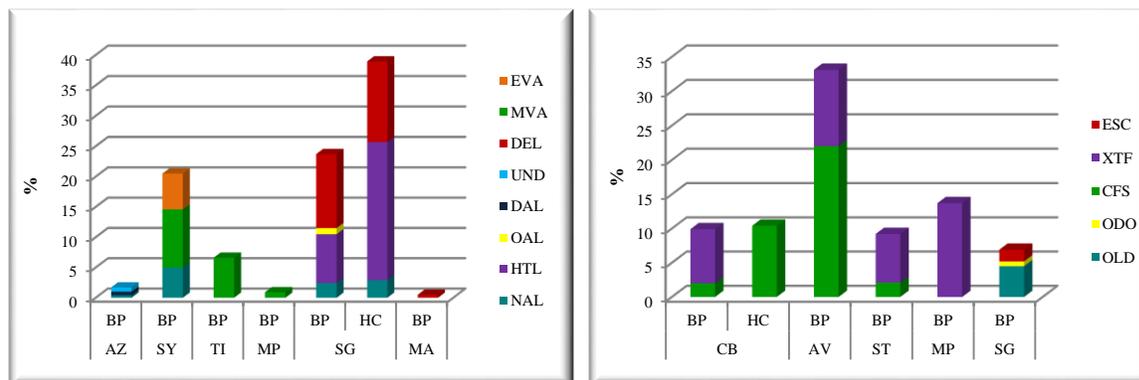
En cuanto a los ésteres del análisis de la figura 5-1, se puede afirmar que del mismo modo como ocurre con los ácidos, su presencia es casi exclusiva de los BP, resaltando la ausencia de los mismos

en soya y siete granos. El ftalato de octilo es el éster de aparición más generalizada, con una mayor proporción en el BP con trigo. El linoleato de etilo únicamente se determinó en las harinas de cebada y trigo integral y el palmitato de etilo solo en la última de éstas. Con respecto al citrato de tributilacetilo y el linoleato de metilo son característicos de los BP cuando se emplean harinas de arroz y de maíz amarillo respectivamente.

Los aldehídos conforman otro grupo importante de compuestos determinados, siendo la harina de siete granos la que tiene el mayor contenido de estos, tanto en términos de variedad como de cantidad en los BP y las HC, contrario al caso de arroz, maíz pinto y maíz amarillo con los menores contenidos (Figura 5-2).

Dentro de los denominados como otros compuestos (Figuras 5-2) se encuentra una amida, un compuesto azufrado, uno fosforado, un hidrocarburo y un alcohol, distribuidos en cinco de las doce FC utilizadas. Se destaca la presencia de la 4-clorofenilsulfona (CFS) y del óxido de trifenilfosfina (XTF) en cebada, avena y salvado de trigo, componentes estos que no son usuales en los cereales y que pueden proceder, en el primer caso, de residuos de pesticidas empleados en su cultivo (316, 317).

Figura 5-2: Aldehídos y otros compuestos presentes en los extractos en AcOEt de los blancos del proceso y las harinas de cereales.



EVA: etilvainillina
 DEL: 2,4-decadienal
 DAL: 2-decenal
 HTL: 2-heptenal
 MVA: metilvainillina
 UND: undecenal
 OAL: 2-octenal

ESC: escualeno
 CFS: 4-clorofenilsulfona
 OLD: oleamida
 XTF: óxido de trifenilfosfina
 ODO: 9,12-octadecadienol
 NAL: nonanal

CB harina de cebada; AV harina de avena; AZ harina de arroz; SY harina de soya; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

La mayoría de los compuestos catalogados en los últimos tres grupos (ésteres, aldehídos y otros) han sido determinados en diferentes cereales, formando parte en ocasiones de los volátiles (155, 318-320).

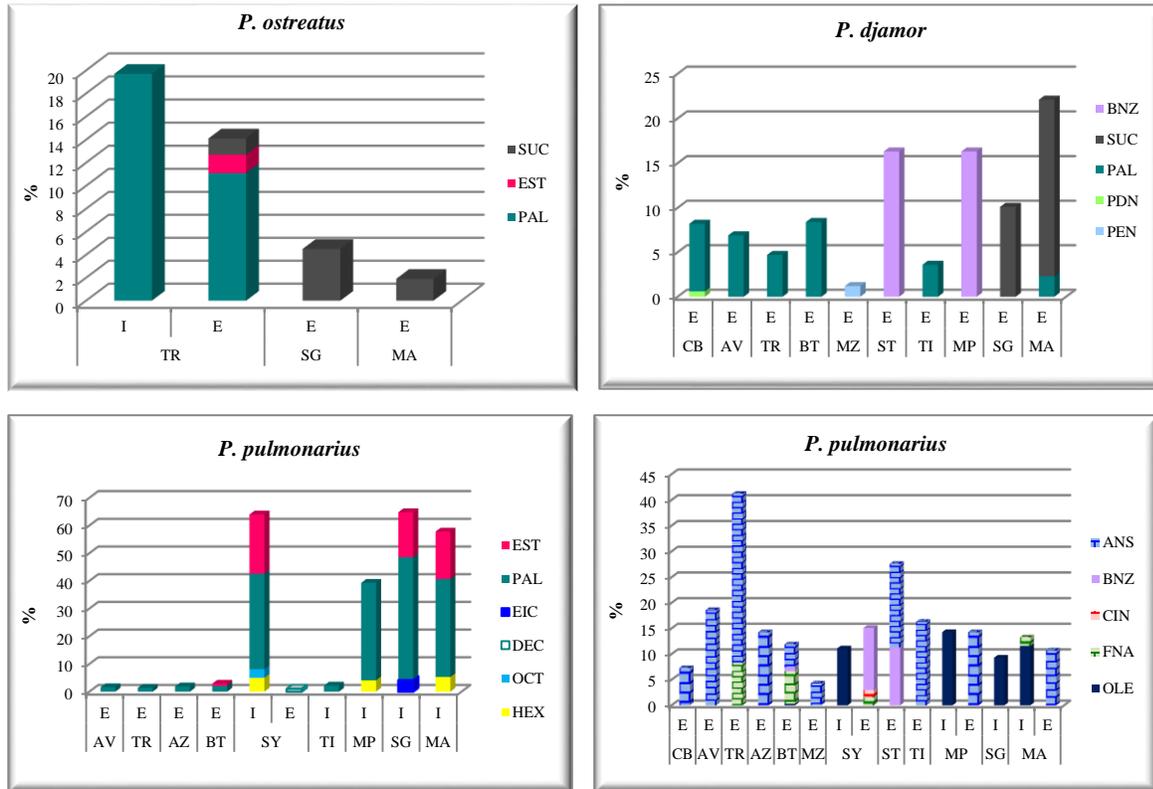
5.3.2. Determinación de los constituyentes de los productos biotecnológicos y el efecto de las FC en su producción

5.3.2.1. Ácidos

Al comparar los ácidos presentes en los extractos de micelios y medios agotados (Figura 5-3) con los determinados en los BP, se puede deducir que la mayoría de los compuestos de este tipo son productos del metabolismo del hongo durante la fermentación, resultado que permite con mayor certeza confirmar lo reportado en literatura, en donde se menciona que la disminución en el pH en este tipo de procesos, es un indicador de actividad fúngica generado por la producción de ácidos orgánicos (321). La mayoría de ellos fueron determinados en los medios agotados. De manera particular es clara la incidencia de las diferentes harinas empleadas como FC. Es así como los productos biotecnológicos obtenidos empleando harina de arroz, contienen cantidades que no superan el 15%, para el caso del medio agotado de *P. pulmonarius*, mientras que en siete granos y maíz amarillo para la misma especie, se genera una variedad más amplia e incluso en algunos casos la mayor proporción de los ácidos determinados en los *Pleurotus*.

En cuanto a la composición porcentual de los ácidos grasos, en todos los extractos analizados el contenido de ácido palmítico está en proporciones que fluctúan entre 1,4% - 44,4%, el esteárico entre 0,8% - 21,4% y el oleico 9,3% - 14,3%. Estos resultados contrastan con lo reportado para los hongos en general (279, 322) y para el caso particular del género *Pleurotus* (74, 166, 279) (Tabla 5-1), en donde se menciona que los ácidos grasos insaturados corresponden a proporciones entre el 52% y el 87% de la composición total de los extractos analizados y catalogan al ácido linoleico como uno de los componentes principales. A pesar de que no se puede realizar una comparación directa entre las cantidades enumeradas en la tabla 5-1, debido a que cada autor siguió procedimientos diferentes, las tendencias si se pueden determinar, llevando a inferir que hay un comportamiento contradictorio al emplear las FC no convencionales. En el caso particular del ácido linoleico su presencia no fue detectada en ninguno de los extractos analizados.

Figura 5-3: Comparación de los ácidos determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de *P. ostreatus*, *djamor* y *pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



SUCC: succínico EST: esteárico PAL: palmítico BNZ: benzoico PDN: pentadecanoico PEN: pentanoico
 EIC: eicosanoico DEC: decanoico OCT: octanoico HEX: hexanoico ANS: anhídrido succínico
 CIN: cinámico FNA: fenilacético OLE: oleico

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Tabla 5-1: Producción de ácidos grasos del género *Pleurotus* mediante el empleo de FC tradicionales y no convencionales.

ESPECIE	ACIDO GRASO (%)				REF.
	Palmitico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	
<i>ostreatus</i> ^a	15	5	18	45	(323)
<i>ostreatus</i> ^b	15,8 – 30,3	0,2 – 14,2	3,2 – 6,5	25,7 – 70,3	(93)
<i>abalonus</i> ^c	18,43 – 25,33	5,43 – 6,50	21,37 – 25,18	38,66 – 49,43	(304)
<i>calyptratus</i> ^c	16,05	6,69	6,69	61,26	(304)
<i>columbinus</i> ^c	22,24	4,24	13,20	57,50	(304)
<i>cornucopiae</i> ^c	18,59	3,76	5,57	68,46	(304)
<i>cystidiosus</i> ^c	16,59 – 32,17	3,81 – 6,92	20,49 – 36,39	33,26 – 38,59	(304)
<i>eryngii</i> ^c	15,17 – 15,79	3,87 – 5,15	43,97 – 46,87	30,84 – 34,92	(304)
<i>ostreatus</i> ^c	13,04 – 22,78	4,25 – 8,99	12,76 – 34,14	42,76 – 65,48	(304)
<i>pulmonarius</i> ^c	12,29 – 22,83	6,01 – 14,46	13,13 – 17,22	45,42 – 49,31	(304)
<i>sajor-caju</i> ^c	15,86 – 25,10	5,71 – 12,07	9,79 – 18,97	40,09 – 65,20	(304)
<i>sapidus</i> ^c	14,91	9,63	21,40	52,62	(304)
<i>ostreatus</i> ^d	14,2 – 16,3	2,01 – 4,08	8,75 – 21,1	53,8 – 70,5	(52)
<i>cornucopiae</i> . var. <i>citrinopileatus</i> ^d	22,3 – 23,6	5,26 – 7,93	10,5 – 13,0	48,4 – 51,5	(52)

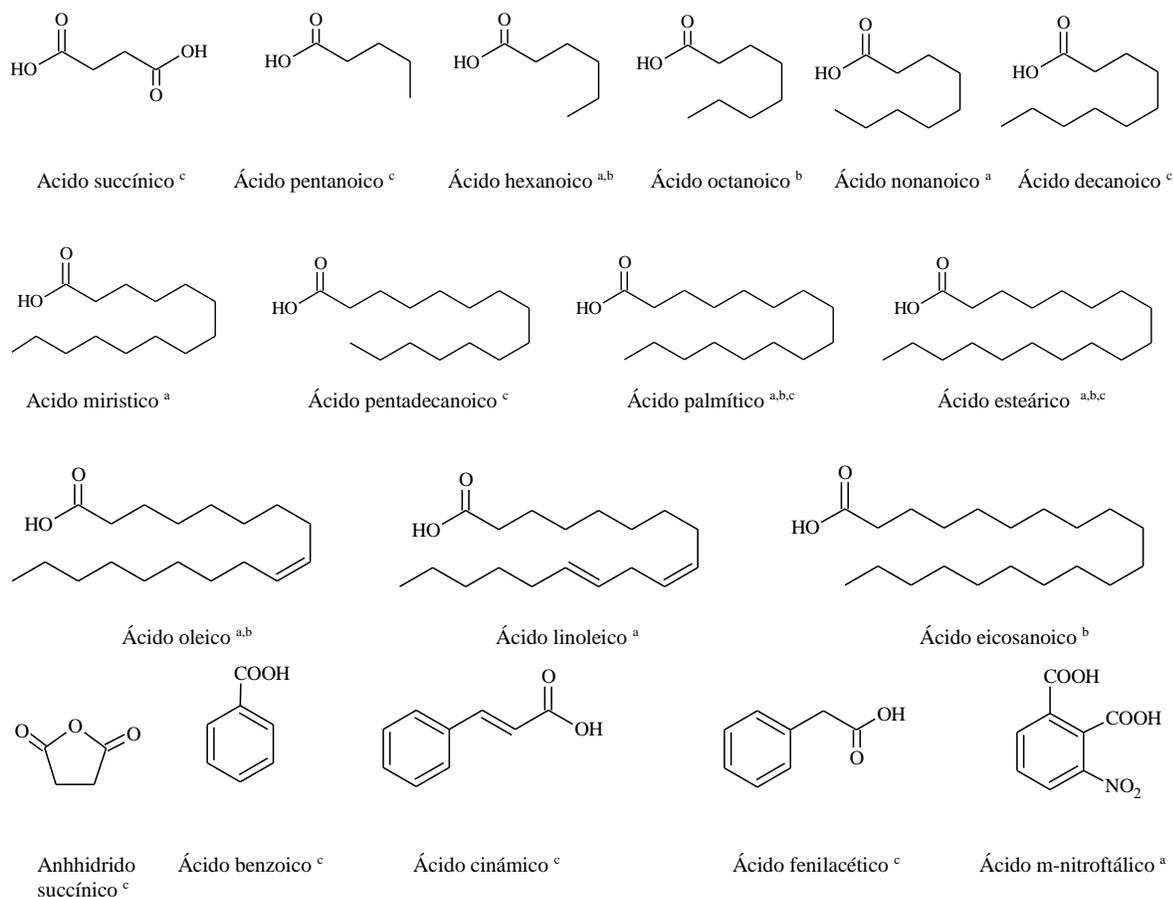
^a Fructificaciones nativas ^b Micelio cultivado con medio convencional ^c Micelio cultivado con PDA ^d Fructificaciones cultivadas por FES

Todos los ácidos encontrados han sido reportados en literatura como componentes de los *Pleurotus* (52, 150, 166, 324, 325), a excepción del succínico presente en micromicetos saprofitos como *Aspergillus niger*, *Penicillium bilaiae* y *Penicillium sp*, exudado como respuesta a la presencia de metales pesados y a las condiciones de nutrición (326). De igual forma este grupo de compuestos tiene reconocidas acciones biológicas dentro de las que se cuentan actividad antibacterial, antifúngica (327, 328) y antitumoral (329).

El estudio de la incidencia de la FC en la distribución y cantidad de los ácidos pone de manifiesto que no hay una tendencia clara entre la relación C/N y la producción de ellos. Así por ejemplo para el *P. pulmonarius* cultivado empleando siete granos, harina que favorece la biosíntesis en una alta proporción de este grupo de compuestos (74,1%), hay una relación C/N intermedia (17,53) y cercana a la de la harina de trigo (17,73), que incluso permite catalogarlos estadísticamente dentro del mismo grupo homogéneo, y por ende esperar una producción similar, sin embargo, con esta última harina no se determinaron ácidos. Estos resultados son similares a los arrojados por las especies *ostreatus* y *djamor* y contrastan con las investigaciones de Bepalova et. al. en el 2002, quienes emplearon relaciones C/N de 8, 15 y 40 para FEL de *P. ostreatus*, reportando que a mayor valor es menos favorable la lipogénesis, lo que permite inferir que el comportamiento no generalizado observado en este estudio es debido, tal vez, a que las fuentes de carbono son mucho más complejas (clase y contenido de carbohidratos y constituyentes propios de cada harina) que las empleadas en el trabajo citado o variaciones en las cepas empleadas, factores que pueden incidir en la biosíntesis de estos metabolitos, e incluso conducirían a la explicación de la ausencia de ácidos como el linoleico, comúnmente encontrado en el género al ser cultivado empleando medios convencionales (Tabla 5-1).

Aunado a esto es conocido que el contenido lipídico en todos los organismos, incluidos los hongos, dependen en gran medida de las condiciones de cultivo incluyendo los factores nutricionales, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura (52), entre otros, lo que está de acuerdo con los resultados de este estudio.

En la figura 5-4 están las estructuras de los ácidos determinados en las FC, los micelios y los medios agotados.

Figura 5-4: Estructuras de los ácidos determinados por CG-EM.

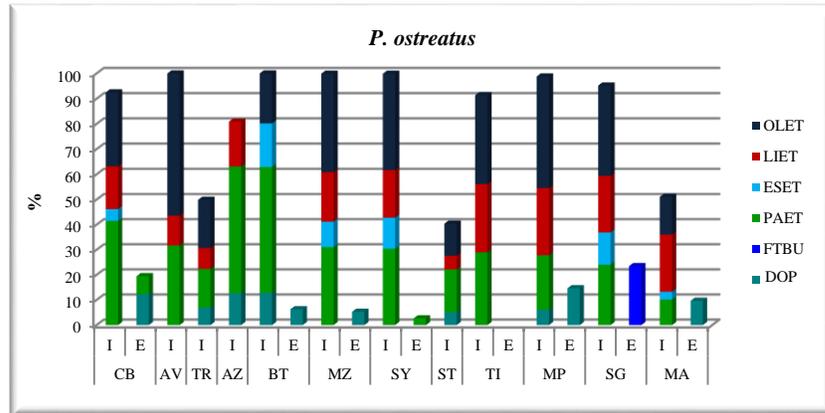
a) Presentes en las fuentes de carbono; b) en los micelios; c) y los medios de cultivo agotados.

5.3.3.2. Ésteres

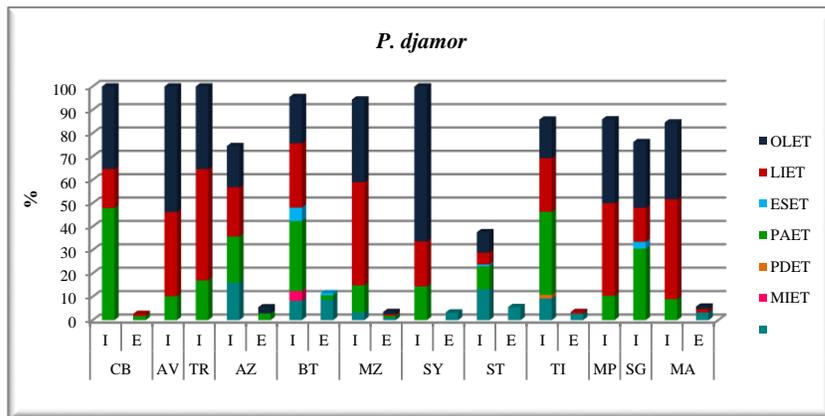
Con relación a los ésteres (Figura 5-5), en la mayoría de los casos constituyen los componentes más abundantes de los extractos, con predominancia del sustituyente etilo y estando asociados en mayores proporciones a los micelios que a los medios agotados. A excepción de los ftalatos todos los ésteres son de ácidos grasos, siendo los más destacados el palmitato, oleato y linoleato de etilo y en porcentaje menor el estereato de etilo. Sus análogos con radical metilo únicamente se determinaron en la especie *P. pulmonarius*. La biosíntesis de estos compuestos ha sido reportada por otros autores específicamente para fructificaciones silvestres de *Pleurotus sajor-cajú* (166).

Al igual como ocurre con los ácidos no hay una tendencia clara entre su producción y la relación C/N de las FC. Las características estructurales cambian para los ésteres con respecto a los ácidos, predominando en la mayoría de los casos los derivados de ácidos grasos insaturados sobre los saturados.

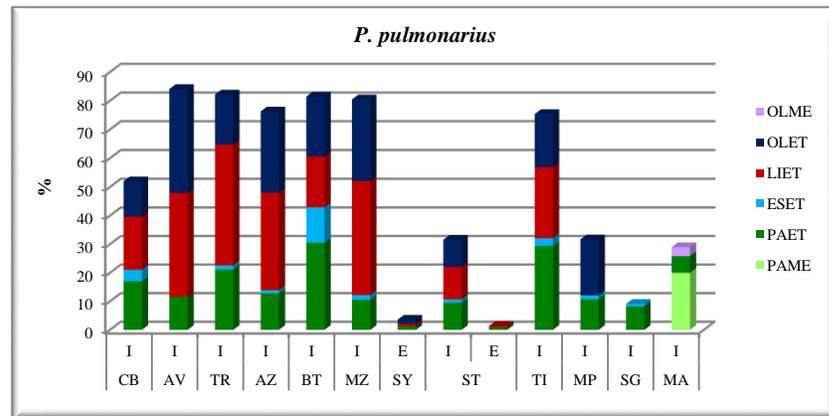
Figura 5-5: Comparación de los esteres determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de *P. ostreatus*, *djamor* y *pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



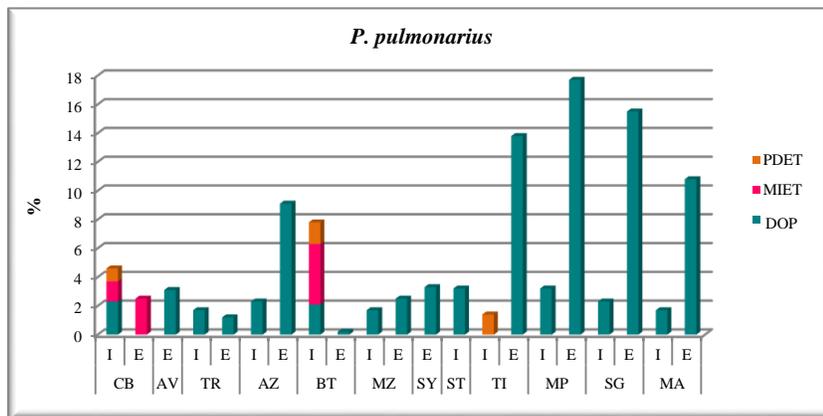
OLET: oleato de etilo LIET: linoleato de etilo ESET: estereato de etilo
 PAET: palmitato de etilo FTBU: ftalato de butilo DOP: ftalato de octilo



OLET: oleato de etilo LIET: linoleato de etilo ESET: estereato de etilo
 PAET: palmitato de etilo PDET: pentadecanoato de etilo MIET: miristato de etilo
 DOP: ftalato de octilo



OLME: oleato de metilo OLET: oleato de etilo LIET: linoleato de etilo
 ESET: estereato de etilo PAET: palmitato de etilo PAME: palmitato de metilo



PDET: pentadecanoato de etilo

MIET: miristato de etilo

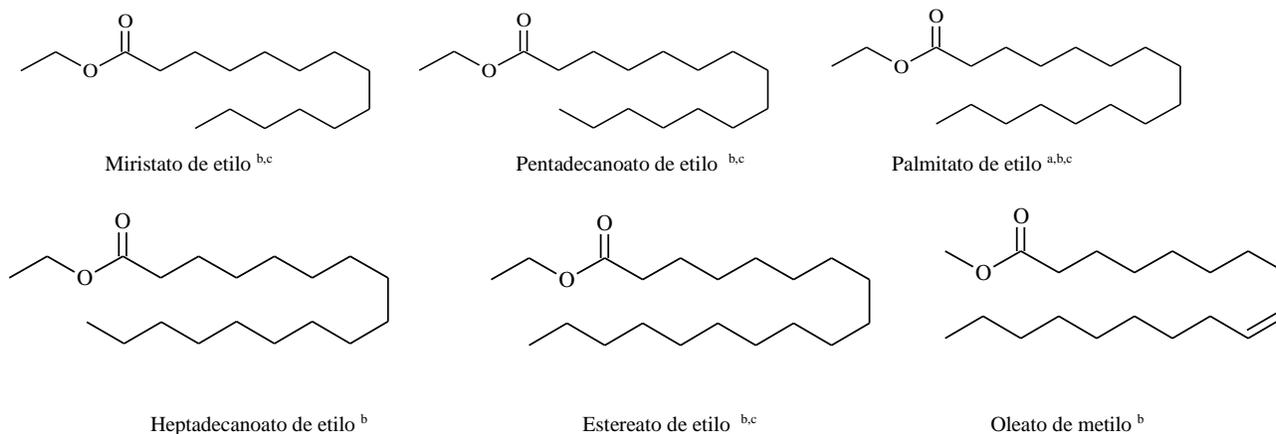
DOP: ftalato de octilo

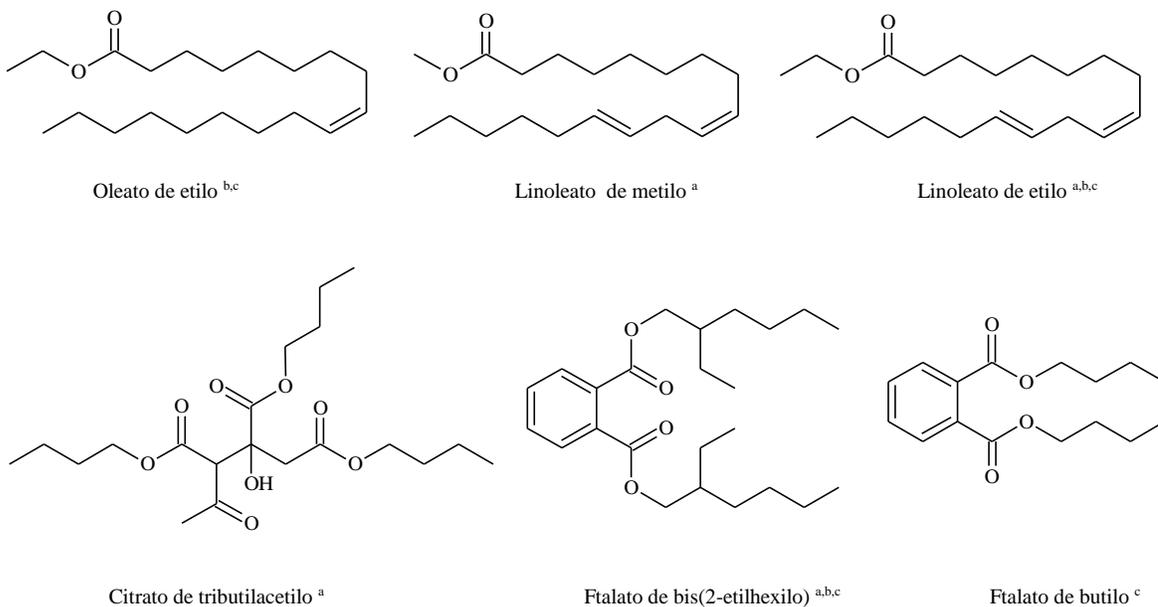
CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

El empleo de las FC no convencionales como componentes del medio para FEL de *Pleurotus*, aunado a las condiciones de la misma, favorece la producción de los ésteres frente a la de los ácidos. Relacionado con el aporte de este grupo de compuestos al potencial nutriceúutico de los productos biotecnológicos, se sabe que el miristato de etilo, el palmitato de etilo, de metilo y el estereato de etilo son los causantes de apoptosis en células tumorales humanas (330, 331), lo que pone de manifiesto el potencial como antitumoral del producto biotecnológico. Aunado a esto está la biodisponibilidad de los mismos gracias a que hay estudios que han demostrado que estos compuestos son absorbidos desde el tracto gastrointestinal en humanos de forma similar como ocurre con sus correspondientes ácidos grasos (332).

En la figura 5-6 aparecen las estructuras de los ésteres que fueron determinados en las FC y en los productos biotecnológicos.

Figura 5-6: Estructuras de los ésteres determinados por CG-EM.





a) Presentes en las fuentes de carbono; b) en los micelios y c) en los medios de cultivo agotados.

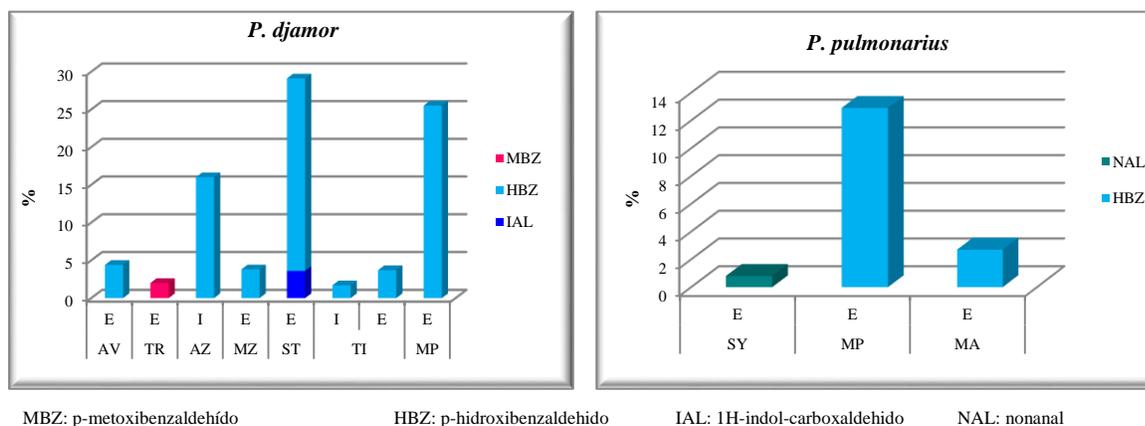
5.3.3.3. Aldehídos

Este grupo de compuestos junto con el palmitato de metilo, palmitato de etilo y el laureato de metilo, entre otros, son los responsables del aroma de los hongos (333, 334). Los aldehídos aromáticos determinados, la mayoría de ellos excretados a los medios agotados, corresponden a los reportados para varias especies de *Pleurotus* (150, 324, 325). Gutiérrez et. al estudiaron seis especies de este género (*cornucopiae*, *eryngii*, *floridanus*, *pulmonarius*, *ostreatus* y *sajor-caju*), concluyendo que muchos de los compuestos de este tipo son biosintetizados independientemente de la FC, lo que sugiere que estos son particularmente sintetizados por las especies de *Pleurotus* (325), hipótesis que se ve reforzada por los resultados de esta investigación.

Con respecto a los aldehídos alifáticos únicamente se determinó el nonanal en el medio agotado de *P. pulmonarius* cultivado empleando harina de soya. La presencia de este grupo de compuestos en los hongos se atribuye a productos de la oxidación y descomposición de ácidos grasos poliinsaturados con la intervención de enzimas lipoxigenasas e hidroxidasas (335), razón que podría explicar la baja proporción en la que están presentes en los productos biotecnológicos, debido a que, como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos poliinsaturados no son producidos por los hongos estudiados bajo las condiciones de obtención biotecnológica empleadas en esta investigación. Otra explicación es la naturaleza volátil de estos compuestos, razón por la que una extracción con AcOEt no es la metodología más apropiada para su aislamiento.

La presencia del 1H-indol-3-carboxaldehído, caracterizado por tener una estructura heterocíclica, podría ser explicada en el hecho de que se conocen reportes de metabolitos con estructuras similares provenientes de hongos como el caso del 1-metilindol-3-carboxaldehído, aislado de *Phenillus lintues* (336). Del análisis realizado sobre la producción de compuestos pertenecientes a este grupo funcional en los productos biotecnológicos, se puede concluir que: fueron determinados mayoritariamente en los medios agotados, lo cual está de acuerdo con reportes previos (325), son productos del proceso fermentativo, ninguno fue incorporado de las FC, se encuentran en mayores proporciones en la especie *djamor*, seguida por el *pulmonarius* y se determinó su ausencia en el *ostreatus* (Figura 5-7). En cuanto a las propiedades atribuidas a este grupo de compuestos, se conoce sobre la actividad antifúngica del p-metoxibenzaldehído (337).

Figura 5-7: Comparación de los aldehídos determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de *P. djamor* y *pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



MBZ: p-metoxibenzaldehído

HBZ: p-hidroxibenzaldehído

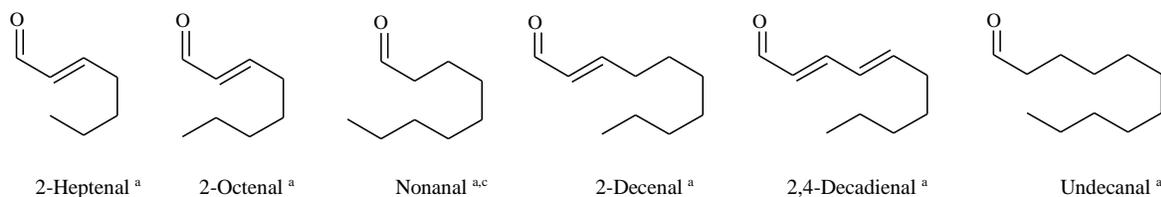
IAL: 1H-indol-carboxaldehído

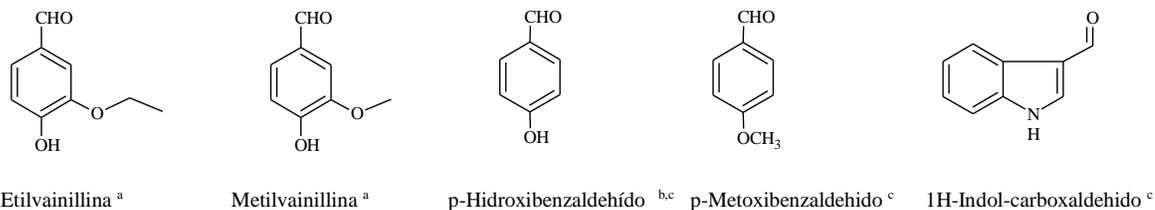
NAL: nonanal

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

La Figura 5-8 muestra las estructuras de los aldehídos que forman parte de la composición del extracto en AcOEt de las FC y de los productos biotecnológicos.

Figura 5-8: Estructuras de los aldehídos determinados por CG-EM.





a) Presentes en las fuentes de carbono; b) en los micelios y c) en los medios de cultivo agotados.

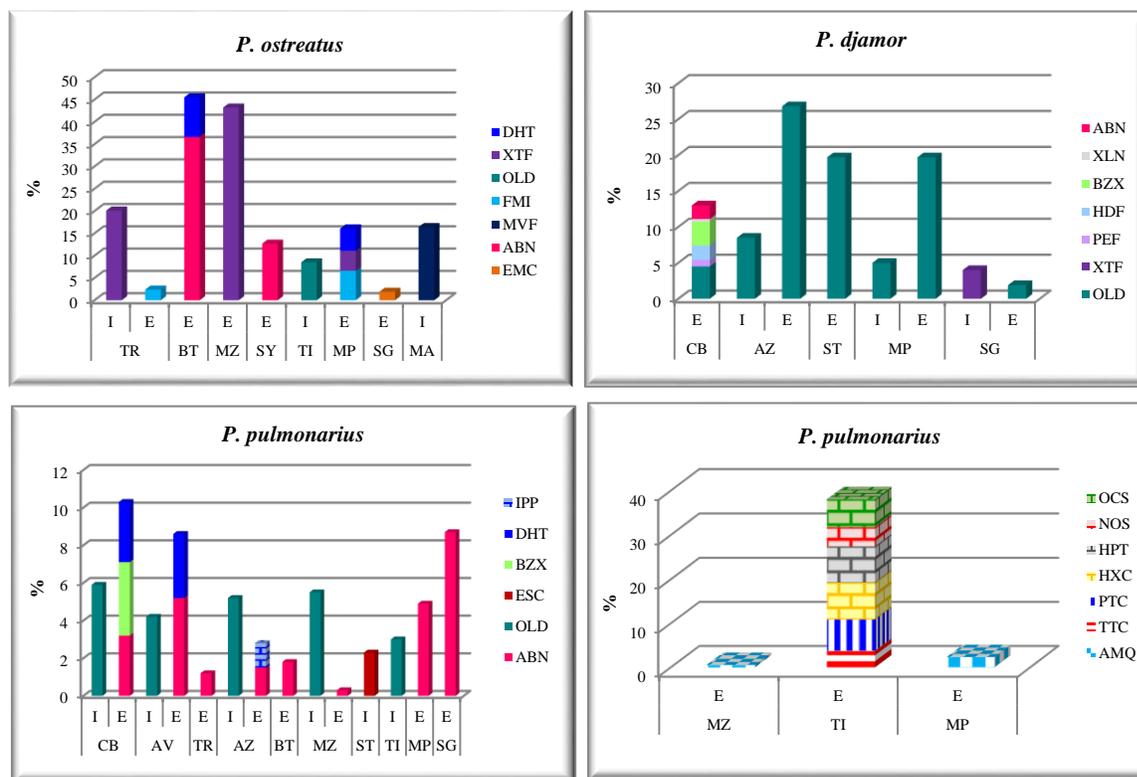
5.3.3.4. Otros compuestos

En esta agrupación están los metabolitos que no se clasifican en ninguna de las categorías descritas anteriormente, dentro de las que se cuentan: alcoholes, fenoles, amidas, hidrocarburos, cetonas, compuestos heterocíclicos y fosforados (Figura 5-9). Su presencia está relacionada predominantemente con los medios extracelulares agotados, con una mayor variedad estructural en la especie *pulmonarius* y su aparición con excepción de la oleamida en el medio agotado del *P. djamor* cultivado empleando harina de siete granos, puede ser atribuida a la biosíntesis y/o excreción hacia los caldos propia de los hongos, pero no a procesos de incorporación de componentes del sustrato.

Entre los alcoholes el bencílico fue el único componente determinado. Su producción en las tres especies no está relacionada con una FC particular. En cuanto a su distribución es más amplia en el *P. pulmonarius* (ocho FC), seguida por el *ostreatus* (dos FC) y en el *djamor* únicamente se encontró al emplear harina de cebada como FC. Su presencia se ha reportado en literatura para macromicetos (338), incluso en las especies objeto de este estudio (335) y de él se conoce que tiene propiedades bacteriostáticas y un olor débil a frutas (339). En el caso del *ostreatus* se observa una particularidad relacionada con la aparición del alcohol y la proporción C/N del sustrato empleado, siendo biosintetizado por el hongo cuando se utilizan bienestarina y harina de soya para su cultivo, harinas que tienen el menor valor de esta relación, sin embargo este comportamiento no es extrapolable a las otras especies. Hay ausencia total de los alcoholes de ocho átomos de C, reportados como componentes de los volátiles fúngicos (335), lo que puede atribuirse al hecho de que estos compuestos provienen del ácido linoléico (279) que no se determinó en ninguno de los casos estudiados.

El 2-metoxi-5-vinilfenol presente únicamente en *P. ostreatus* con un porcentaje del 16,4% en el micelio obtenido con maíz amarillo, comúnmente se relaciona con aromas “medicinales” (340) y se encuentra clasificado como un potente antioxidante, con una actividad comparable a la del α -tocoferol (341, 342).

Figura 5-9: Comparación de los compuestos catalogados como otros, determinados en los extractos en AcOEt de los micelios y los medios agotados de *P. ostreatus*, *djamor* y *pulmonarius* obtenidos por FEL con las diferentes FC.



DHT: 2,3-dihidrotiofeno
 ABN: alcohol bencílico
 PEF: 2-pentilfuranio
 HPT: heptacosano
 IPP: 2-isopropilpsolareno
 ESC: escualeno

XTF: oxido de trifenilfosfina
 EMC: 1-etil-3-metilcilohexano
 OLD: oleamida
 HXC: hexacosano
 AMQ: 6(N-alilamino)-7-metil-quinolina

FMI: 3-fenil-2-metilindol
 XLN: p-xileno
 OCS: octacosano
 HXC: hexacosano
 PTC: pentacosano

MVF: 2-metoxi-5-vinilfenol
 BZX: 2(3H)-benzoxazolona
 NOS: nonacosano
 TTC: tetracosano
 HDF: 5-(1-hidroxi-etil)-2(3H)-dihidrofuranona

CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

De igual forma, en los productos biotecnológicos obtenidos de *Pleurotus* se determinaron compuestos heterocíclicos de los siguientes tipos: monocíclicos derivados del tiofeno y del furano, bicíclicos derivados del indol y la quinolina, siempre presentes en los medios extracelulares y en cantidades inferiores al 9%. La presencia de compuestos heterocíclicos en hongos generalmente se atribuye bien sea a una serie de productos generados por la reacción de Maillard, consecuencia del proceso de secado (pirazinas sustituidas, furanos, pirroles, 2-metilolanos y lactonas) (335), o a productos biosintéticos (343), como en el caso de los responsables de las características alucinógenas de los géneros *Psilocybe*, *Panaeolina*, *Panaeolus*, *Copelandia*, *Conocybe*, *Gymnopilus*, *Stropharia* y *Pluteus* (336). Compuestos que comparten los núcleos determinados en los productos biotecnológicos, han sido reportados en *Pleurotus* (51, 150, 335, 343, 344).

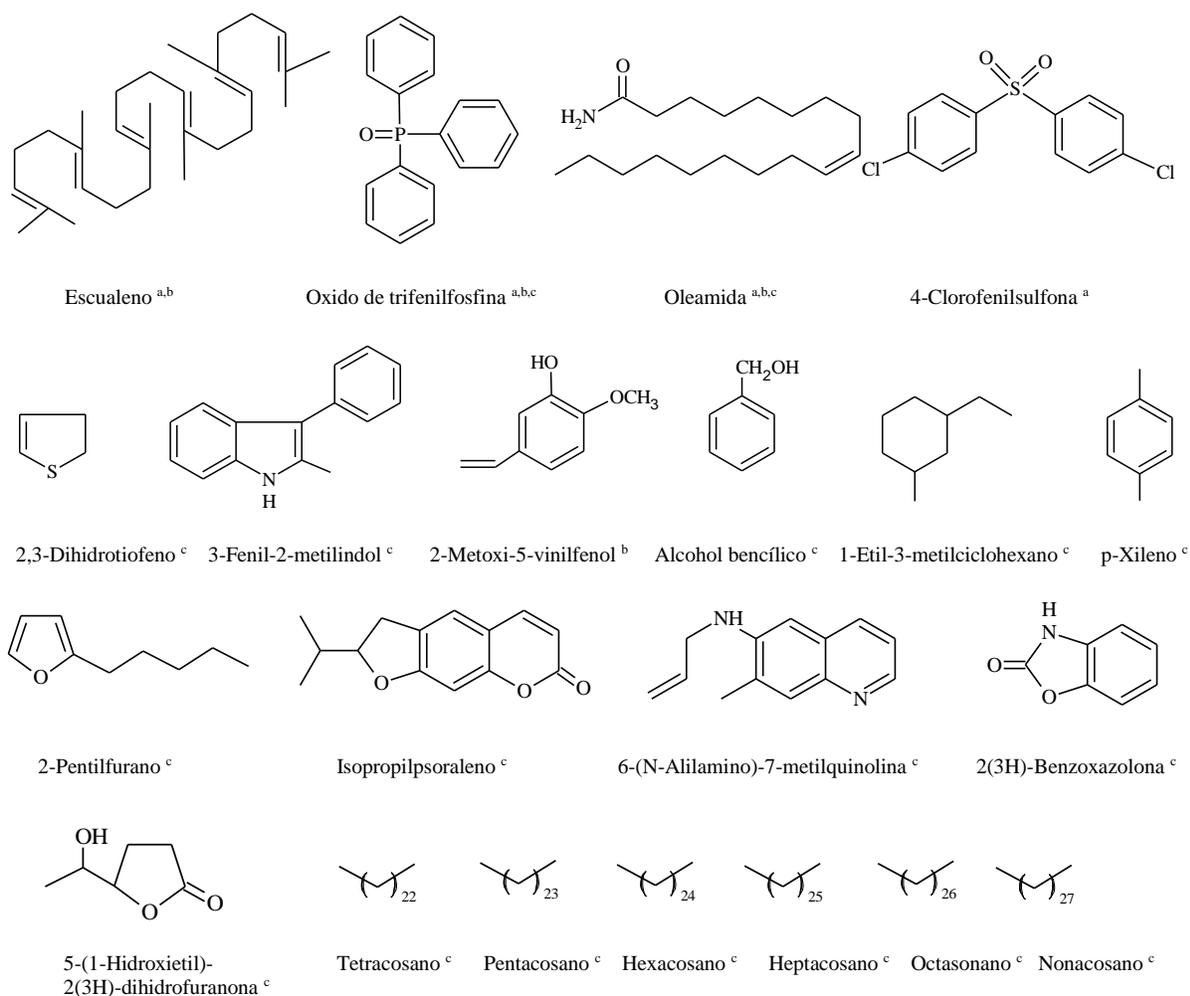
De igual forma se podría contemplar la opción de que provengan de la reacción de Maillard de las FC, generada por la alta temperatura empleada durante el proceso del autoclavado del medio de cultivo.

Los heterociclos tienen demostradas bioacciones como las benzoxazonas, extensamente distribuidas en plantas y caracterizadas por presentar actividades como detoxificantes y antibacteriales (345), el indol y sus derivados que cumplen un papel neurotransmisor, tienen actividad antioxidante, anticáncer, antienvjecimiento, antiinflamatoria, analgésica, regulan el ciclo diurno en humanos y participan en la coagulación sanguínea (51, 343). El isopropilpsolareno, determinado únicamente en *pulmonarius* cultivado con harina de arroz, es una furanocumarina de aparición exclusiva en plantas, de la que se conocen características de toxicidad para líneas celulares de cáncer de pulmón, de mama y de colon humano (346).

Con relación a los hidrocarburos todos se generan por el proceso fermentativo, la mayor variedad se encontró en el medio extracelular de la especie *pulmonarius* obtenida empleando harina de trigo integral, con las características estructurales de cadenas de C20 a C36. Entre tanto en el *ostreatus* únicamente se determinó el 1-etil-3-metilciclohexano y en el *djamor* el p-xileno. Este tipo de componentes se han identificado en *Aphylophorales* (174), *Ganoderma lucidum* (347), *Agaricus bisporus* (348), *Trichoderma harzianum* (349), *Inonotus obliquus* (350) y *Laetiporus sulphureus* (351), pero este es el primer reporte de su determinación en especies de *Pleurotus*. El papel de los hidrocarburos en los microorganismos no está plenamente definido, sin embargo aparentemente la presencia de los mismos en las paredes de las esporas fungales es debida a una función protectora (174).

Se encontró el óxido de trifenílfosfina en el micelio de *djamor* cultivado con harina de siete granos, en el micelio de *ostreatus* con trigo y en los medios agotados de la misma especie con maíz y maíz pinto. Este compuesto tiene un comprobado efecto inmunomodulador (352).

En las figura 5-10 están las estructuras de los componentes clasificados como otros que fueron determinados en las FC, los micelios y los medios agotados de los tres *Pleurotus* obtenidos por FEL.

Figura 5-10: Estructuras de los componentes clasificados como otros determinados por CG-EM.

Presentes en a) fuentes de carbono; b) en los micelios y c) en los medios de cultivo agotados (c).

Del análisis anterior se puede concluir que en términos generales los productos biotecnológicos obtenidos a partir de la FEL de las tres especies de *Pleurotus* utilizando FC no convencionales, tienen dentro de sus constituyentes diferentes componentes con comprobadas actividades biológicas que potencian el valor nutriceútico de los mismos, reforzando nuestra hipótesis de que los medios de cultivo agotados, al igual que los micelios, son una fuente promisoriosa de compuestos con altas posibilidades de ser empleados con fines preventivos, terapéuticos y/o farmacológicos, aprovechando los beneficios de algo que normalmente se desecha.

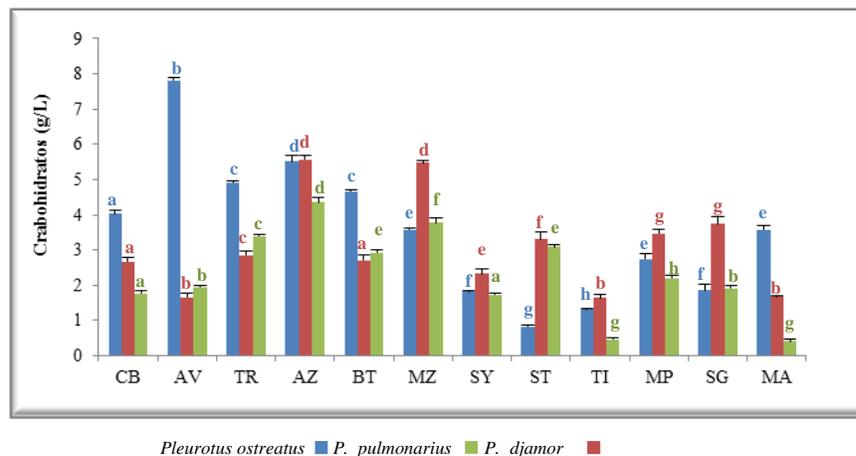
5.3.3. Variación en la producción de EPS con las FC empleadas para el cultivo

Cómo se mencionó anteriormente, los EPS pertenecen a un grupo de metabolitos de importancia farmacológica, que son obtenidos a través de diferentes procesos fermentativos que a su vez son

sometidos a evaluación constante en busca de la optimización de las técnicas aplicadas (103). El empleo de FC no convencionales, como es el caso de las usadas en este estudio, puede ser una efectiva herramienta para lograr ese objetivo.

En la figura 5-11 se encuentra representado el efecto de cada una de las doce FC sobre los EPS producidos por las tres especies de *Pleurotus*. El contenido está en un rango entre 0,81 g/L y 7,82 g/L para el *P. ostreatus*, para *P. djamor* fluctúa entre 1,64 g/L y 5,56 g/L y finalmente para el *P. pulmonarius* entre 0,41 g/L y 4,36 g/L. En cuanto a los reportes de literatura, en la tabla 5-2 se encuentran resumidos los valores calculados por otros investigadores específicamente en el género *Pleurotus*, a partir de los que se puede concluir que el uso de las FC no convencionales para el cultivo de las tres especies de *Pleurotus* mediante FEL, es una excelente alternativa cuando se busca el aumento de la producción de EPS, mejorando la calidad nutriceútica del producto biotecnológico. Este último planteamiento se basa en los reportes existentes de los que se sabe que este tipo de compuestos, aislados desde el género, tienen actividad antioxidante, antimicrobial (295), inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon, inducen la apoptosis (75) y son inmunoestimulantes (353).

Figura 5-11: Efecto de la fuente de carbono sobre el contenido de EPS para los *Pleurotus*.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soja; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo. Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a h basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Tabla 5-2: Contenido de EPS reportado en literatura para especies del género *Pleurotus*.

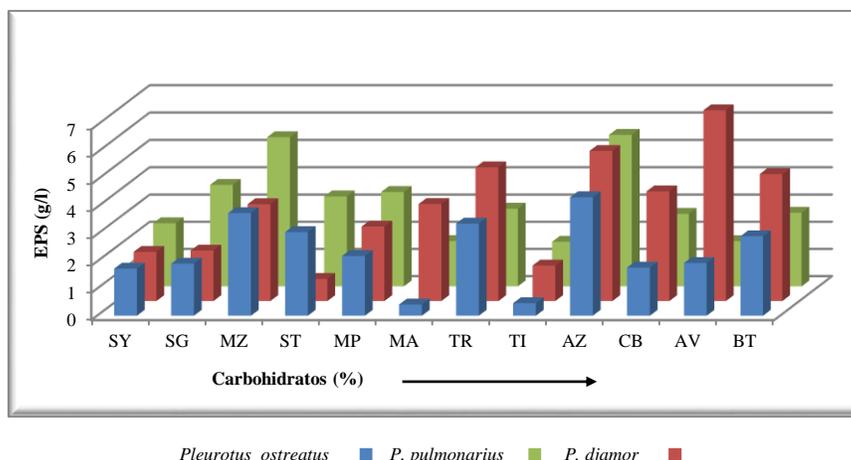
ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO	CONTENIDO DE EPS (g/L)	REF.
<i>flabellatus</i> , HK37 y <i>Pleurotus spp</i>	Extracto de cáscaras de ñames o papa, dextrosa y extracto de malta	0,180 - 0,540	(2)
<i>ostreatus</i>	Glucosa, maltosa, lactosa o almidón, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, peptona y extracto de levadura	0,07045- 0,10005	(295)
<i>pulmonarius</i>	Glucosa K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, peptona y extracto de levadura	0,30 - 0,42	(74)
<i>ostreatus</i>	Glucosa, galactosa, xilosa o arabinosa, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O y extracto de levadura	1,12 - 0,69	(296)
<i>ostreatus</i>	Glucosa, levadura, peptona y mezcla de diferentes sales	0,37 – 1,67	(354)
<i>pulmonarius</i>	Glucosa, levadura, peptona y mezcla de diferentes sales	0,35 – 1,00	(354)
<i>pulmonarius</i>	Diferentes medios de cultivo variando la FC, FN	0,018 – 2,64	(355)

En cuanto a la incidencia de las FC se determinó que, a excepción del *P. ostreatus* cultivado empleando harina de avena, es la harina de arroz la FC que favorece la producción de EPS en las tres especies, mientras que los contenidos más bajos se manifiestan con salvado de trigo para *P. ostreatus*, avena, trigo integral y maíz amarillo para *P. djamor* y trigo integral y maíz amarillo para *P. pulmonarius*. Con respecto a las diferencias en el contenido de EPS no hay un comportamiento extrapolable y particular para cada FC pues es totalmente especie-dependiente, lo que se ve reforzado por el análisis estadístico entre todas las variables, el cual pone de manifiesto que son pocos los casos en los que no hay diferencias significativas, resaltando la similitud en los comportamientos obtenidos con *P. pulmonarius* empleando harinas de soya, siete granos, cebada, avena y el *P. ostreatus* con harinas de soya y siete granos. Relacionado con el comportamiento generalizado, las especies *ostreatus* y *djamor* se destacan por tener contenidos de EPS mayores que el *P. pulmonarius*.

Es bien conocido por literatura que el tipo y la cantidad de carbohidratos presentes en las FC afectan la producción de EPS en los procesos fermentativos. Los resultados encontrados permiten deducir que las FC inciden en la producción de EPS con un efecto mayor que el observado para la biomasa (discutido en el capítulo uno). En la figura 5-12 están relacionados el contenido de carbohidratos de las FC (capítulo 1) con la producción de EPS para las tres especies de *Pleurotus*. De esta gráfica se puede concluir que no hay una correspondencia directa entre la producción de los metabolitos y el contenido total de carbohidratos de las FC, para ninguna de las tres especies estudiadas, llevando a inferir que el efecto podría estar más relacionado con la composición en términos del tipo de los azúcares constituyentes de cada una de ellas. En la tabla 5-3 están recopilados los datos que se encuentran en literatura relacionados con la composición de las FC. El menor contenido de glucosa y fructosa lo tiene la harina de arroz, que como se mencionó anteriormente, es la FC con la que se genera la mayor producción de EPS para *P. pulmonarius* y *P. djamor*, sustrato que de igual manera

está catalogado entre los más bajos niveles de maltosa y rafinosa. Para la especie *P. ostreatus* la tendencia es similar, siendo la harina de avena la más eficiente para producir EPS, pero con valores bajos en términos del contenido particular de cada uno de los carbohidratos. De esta forma al parecer no es el contenido de monosacáridos y disacáridos el factor determinante para la producción de estos metabolitos.

Figura 5-12: Efecto del contenido de carbohidratos sobre la producción de EPS en *Pleurotus* obtenidos por FEL.



CB harina de cebada; AV harina de avena; TR harina de trigo; AZ harina de arroz; BT bienestarina; MZ harina de maíz; SY harina de soya; ST salvado de trigo; TI harina de trigo integral; MP harina de maíz pinto; SG harina de siete granos; MA harina de maíz amarillo.

Tabla 5-3: Cantidades reportadas en literatura de los principales monosacáridos presentes en las FC empleadas para las FEL de *Pleurotus*.

HARINA DE CEREAL	GLUCOSA (g/100g)	FRUCTOSA (g/100g)	MALTOSA (g/100g)	SACAROSA (g/100g)	RAFINOSA (g/100g)	REF.
Trigo	0,03	0,04	0,12			(356)
		0,145		0,791	0,472	(357)
Trigo integral	0,03	0,03	0,21			(356)
Maíz	0,03	0,02	nd			(356)
Avena	0,02	0,03	0,14			(356)
	0,001			0,434	0,052	(357)
Arroz	0,02	0,01	nd			(356)
	0,010	0,007		0,707	0,079	(357)
Soya	0,06	0,11	nd			(356)
Cebada	0,072	0,078		1,36	0,234	(357)

Nd: no detectable

Por otro lado, las harinas de cereales están compuestas mayoritariamente por almidón en las siguientes proporciones (g/100g): maíz 92,0; arroz 85,8; trigo 73,9; avena 64,9; cebada 53,0; salvado de trigo 23,0; soya 12,3 (94, 356). Comparando los contenidos de este polisacárido en las harinas de maíz y arroz con la producción de EPS en las especies *P. pulmonarius* y *P. djamor* se evidencia una

correlación, lo que lleva a inferir que posiblemente es este carbohidrato la fuente principal de carbono utilizada para la producción de los bioactivos en estas dos especies y para estas dos harinas. Como dentro de los factores que afectan la biosíntesis de este grupo de compuestos, se ha encontrado evidencia experimental de que la adición de diferentes sustancias como son aceites vegetales, ácidos grasos y vitaminas (358), presumiblemente actúan mediando la permeabilidad de la célula, mediante la reorganización de la membrana celular y/o afectando la síntesis de enzimas que están envueltas en la biosíntesis de los EPS (359), y dado que las FC utilizadas en el presente estudio, son una fuente importante de este grupo de compuestos, podrían ser responsables de la eficiencia de su uso para la producción de dichos metabolitos.

En lo concerniente a la relación C/N y la producción de EPS, no se encuentran reportes en literatura de un comportamiento generalizado ni para el reino fungi, ni para el género *Pleurotus* en particular, como lo demuestran los estudios con el *P. citrinopileatus* obtenido empleando diferentes FC y FN, en donde se observó una relación directa entre la proporción C/N del medio de cultivo, la producción de biomasa y la cantidad de los bioactivos (34), y el realizado por El-Dein et. al en el 2004 y Diamantopolou et. al en el 2012 quienes mencionan la ausencia de una correlación entre la acumulación de EPS y la biomasa para *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* respectivamente (354, 355). Para el caso de las tres especies estudiadas en esta investigación, no se encontró una correspondencia directa entre ninguna de las tres variables (datos no mostrados), pero resulta interesante el hecho de que la harina de arroz, presente el valor más alto de la relación C/N.

Finalmente en lo que respecta a estudios realizados empleando las mismas FC pero con hongos diferentes, para *Grifola frondosa* se reportan los mayores títulos de EPS encontrados en literatura para la especie (6,53 g/L) utilizando harina de arroz, duplicando la cantidad obtenida con harina de maíz y con una marcada diferencia entre las harinas de avena, de trigo y la bienestarina que generaron valores inferiores a 1g/L (5). Esta tendencia es similar a la encontrada para las especies *P. pulmonarius* y *P. djamor*, aunque las cantidades para las tres últimas FC son mayores que para *Grifola*. Con respecto al estudio con *Ganoderma lucidum* sus resultados son contrarios a lo encontrado para *Pleurotus*, resaltando que la FC más eficiente para producción de EPS es la harina de cebada (1,75 g/L), seguida por la harina de avena (0,8 g/l) (4). Una vez más estos resultados fortalecen el hecho de que cada organismo es un caso particular y la producción de metabolitos es dependiente de la FC, de la especie y del género empleado para el estudio.

Tanto *Grifola frondosa* como las especies del género *Ganoderma* son considerados como una fuente de nutraceuticos por excelencia, de manera que los contenidos de los diferentes compuestos bioactivos presentes en ellos son un indicativo de la calidad de potenciales productos que pretendan

ser utilizados con el mismo fin. Desde este punto de vista, los productos biotecnológicos obtenidos a partir de la FEL de *Pleurotus pulmonarius*, *P. djamor* y *P. ostreatus*, cultivados empleando las FC no convencionales utilizadas en esta investigación, pueden catalogarse como una excelente fuente de nutriceúticos, teniendo en cuenta que el contenido de EPS en la mayoría de los casos es cercano al reportado para cultivos optimizados de *Ganoderma*, destacándose el comportamiento observado para *P. ostreatus* con harina de avena (7,82 g/L) con una producción de EPS superior a la reportada para *Grifola frondosa* como la más alta (6,53 g/L).

5.4. CONCLUSIONES

- La producción de los metabolitos no triterpenoidales en el género *Pleurotus* depende tanto de la fuente de carbono como de la especie.
- Dentro de la composición general de los micelios se encuentran los esterres de ácidos grasos en altas proporciones que pueden ser absorbidos por el organismo humano de la misma forma como ocurre con sus correspondientes ácidos, aumentando así el valor nutriceútico del producto final.
- Como constituyentes adicionales de los productos biotecnológicos se encuentran hidrocarburos, alcoholes, fenoles, amidas, compuestos fosforados y heterociclos, poseedores de actividades biológicas importantes, que aunque se encuentran en títulos pequeños pueden potenciar el valor nutriceútico tanto del micelio como del medio de cultivo agotado.
- El empleo de la mayoría de las FC dió como resultado una alta producción de EPS en algunos casos superando la producción del hongo *Grifola frondosa*, considerado el hongo comestible antitumoral por excelencia.
- Debido a las características estructurales y a las diferentes actividades reportadas en literatura para los compuestos encontrados en el caldo de cultivo agotado, el mismo se hace acreedor a un valor agregado, descartando la consideración general de los biotecnólogos de que este producto no presente utilidad y debe ser desechado.

**CAPITULO 6. CORRELACIÓN ENTRE EL pH
INICIAL DE LA FERMENTACIÓN Y LA
COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS
BIOTECNOLÓGICOS**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AV	Harina de avena
CB	Harina de cebada
CG	Cromatoma de gases
E	Extractos en AcOEt de los medios agotados
EPS	Exopolisacáridos
FC	Fuente de carbón
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
I	Extractos en AcOEt de los micelios
IPS	Intrapolisacáridos
LB	Liebermann-Burchard
MA	Harina de maíz amarillo
SG	Harina de siete granos
ST	Salvado de trigo

6.1 ANTECEDENTES

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo de investigación, diferentes factores afectan los procesos fermentativos en términos tanto de producción de biomasa como de la composición de los productos biotecnológicos obtenidos. En este capítulo se discutirá acerca del efecto del cambio del pH inicial sobre el potencial valor nutriceútico, tanto del micelio como del medio agotado de los *Pleurotus* obtenidos por FEL, determinado por los cambios en la producción principalmente de triterpenoides y de otros compuestos que aporten al carácter funcional de los mismos. Con base en los resultados del efecto de las diferentes FC como componentes del medio de cultivo sobre la composición de las especies objeto de este estudio, se decidió continuar con esta parte del trabajo con los productos de la FEL que generaban los límites de la mayor y la menor producción de compuestos triterpenoidales. Con base en este criterio las tres especies se cultivaron con salvado de trigo y harina de cebada, el *P. pulmonarius* con harina de siete granos, el *P. djamor* con harina de avena y el *P. ostreatus* con las harinas de avena, siete granos y maíz amarillo. Las variaciones en el pH se efectuaron una unidad por encima (6,6) y una por debajo (4,6) del valor determinado como óptimo para la producción de *Pleurotus* (1).

6.1.1. El papel del pH en los procesos fermentativos

Dentro de los factores químicos que deben ser controlados en un proceso fermentativo se encuentra el pH. Su valor inicial puede regular la actividad enzimática durante una fermentación, afectar la estabilidad de la membrana, su función, la morfología y estructura celular, la solubilidad de las sales, el estado iónico del sustrato, la captación de nutrientes y los productos de la biosíntesis (259). La búsqueda del pH óptimo de crecimiento es una práctica común, ya sea para la adaptación de cepas o aislamientos, para el crecimiento en sustratos artificiales (sólido o líquido) y/o para la producción y búsqueda de nuevos metabolitos. En general, las células pueden únicamente crecer en un cierto rango de pH (125) que en la mayoría de los trabajos realizados con hongos basidiomicetos, para cultivos líquidos o sólidos, se encuentra entre 5.5 y 6.5 (36). Existe un número importante de estudios relacionados con el efecto del cambio en esta variable en biotecnología fúngica, sin embargo, la mayoría de ellos se han realizado en erlenmeyers en los que el pH no se puede controlar durante el proceso de cultivo y por ende únicamente se estudia la influencia del pH inicial (360).

En la tabla 6-1 están resumidos algunos de los resultados más relevantes relacionados con el tema específicamente para el reino fungi.

Tabla 6-1: Estudios relacionados con el efecto de cambios en el pH en procesos fermentativos empleando hongos.

ESPECIE	OBJETIVO DEL ESTUDIO	OBSERVACIONES	REF.
<i>Monascus purpureus</i>	Producción de estatinas y esteroides	pH bajos aumentan la producción de estatinas pero disminuye la de esteroides	(209)
<i>Penicillium crustosum</i>	Producción de esteroides	pH 7,0 ideal para favorecer la producción	(209)
Diferentes especies del reino	Producción de EPS	Favorecido en el rango entre 3,0 y 6,5	(359)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de biomasa	Mayor producción a pH de 6,0 menor a pH 3,0	(36)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de biomasa y bioactivos	Óptimo 6,5 para biomasa, reducción gradual hasta 3,5 aumenta EPS. 5,5 ideal para IPS.	(125)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de biomasa y polisacáridos	Óptimo 6,5	(361)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de IPS y ácidos ganodéricos Producción de EPS	No hay variaciones significativas en su producción con el pH Óptimo pH 5,5	(362)
<i>Lentinula edodes</i>	Producción de biomasa y evaluación de actividad antibacteriana	3,0 a 3,5 favorable para producción de biomasa 4,5 mejor actividad antibacteriana	(363)
<i>Cordyceps militaris</i>	Condiciones óptimas de crecimiento, producción de EPS y cordicepina	pH 6 es ideal	(88)
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Producción de biomasa y EPS	pH 4,0 para biomasa y 6,0 para EPS	(364)
<i>Tremella fuciformis</i>	Producción de EPS	pH óptimo 8,0	(365)
<i>Lyophyllum decastes</i>	Producción de EPS e IPS	Ideal valor del pH entre 7- 8	(366)
<i>Grifola frondosa</i>	Producción de EPS y biomasa	Óptimo pH 5,0	(367)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de ácidos ganodéricos	Aumenta la producción con pH de 3,0 hasta el 4to día y cambiando los siguientes 6 días a 4,5	(133)
<i>Auricularia auricula</i>	Producción de EPS	Aumento con dos fases del pH como iniciar con 5,0 las 48h y luego a 5,5	(368)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Optimización de la producción de polisacáridos y ergosterol	pH óptimo 5.0 para la producción de los dos componentes.	(369)
<i>Antrodia camphorata</i>	Crecimiento celular, EPS y distribución de pesos moleculares de EPS	pH 4,0 para crecimiento y 5,0 para EPS	(370)
<i>Antrodia camphorata</i>	Producción de biomasa, compuestos fenólicos y polisacáridos, actividad antioxidante y habilidad para captación de radicales libres	pH 3,0 para crecimiento, 5,0 favorece actividad antioxidante, producción de compuestos fenólicos y polisacáridos	(371)
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Producción de polisacáridos	Ideal pH inicial 5,5	(34)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Producción de biomasa	Aumento en el pH decrece la productividad	(372)
<i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>Miniatus</i>	Crecimiento micelial y producción de exopolisacáridos	pH inicial entre 2,0 y 4,0 ideal EPS	(373)

Como se muestra en la tabla anterior la mayoría de los trabajos se han enfocado en la optimización de las condiciones para la obtención de polisacáridos y de biomasa, dejando de lado el efecto causado sobre otros metabolitos de igual importancia como los triterpenoides. Relacionado con este grupo de compuestos la atención se ha centrado en los ácidos ganodéricos, característicos del género

Ganoderma, hecho este que llevó a plantear esta sección del estudio, enfocada en la producción de triterpenoides y de otros compuestos biosintetizados por los hongos y en ocasiones excretados a los medios de cultivo, que en capítulos anteriores se han descrito como importantes contribuyentes al carácter funcional de los productos biotecnológicos obtenidos desde procesos fermentativos de *Pleurotus*, empleando FC no convencionales, como son en este caso particular las harinas de cereales seleccionadas y el salvado de trigo.

6.2. METODOLOGÍA

6.2.1. Material fúngico

Se realizaron los cultivos como se describió en el capítulo 1 numeral 1.2.1, variando el pH inicial hasta obtener valores de 4,6 y 6,6 con soluciones de NaOH o HCl 0,1 M según el caso. Las FC empleadas para cada ensayo fueron las siguientes: para el *Pleurotus pulmonarius* harinas de cebada (CB), siete granos (SG), maíz amarillo (MA) y salvado de trigo (ST); para el *Pleurotus djamor* harinas de cebada (CB), de avena (AV) y salvado de trigo (ST) y para *Pleurotus ostreatus* se utilizaron las harinas de cebada (CB), avena (AV), maíz amarillo (MA) y salvado de trigo (ST).

6.2.2. Obtención y análisis de los extractos de *Pleurotus*

Cada uno de los productos biotecnológicos se extrajo como se describió en el numeral 2.2.3 y se determinó su composición siguiendo la metodología detallada en los numerales 2.2.4 a 2.2.6.

En cuanto a la determinación de polisacáridos totales se realizó como está descrito en el numeral 5.2.2.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hasta este punto de la investigación se ha determinado que el tipo de harina empleado como FC cambia en forma considerable la composición del producto obtenido a través de la FEL de las tres especies de *Pleurotus*, conllevando a variaciones en el potencial nutriceúutico de los mismos y con base en que el pH es uno de los factores determinantes en este tipo de procesos, se hace imperioso el estudio del efecto que puede producir la variación de su valor inicial sobre la composición de los extractos en AcOEt, tanto de los micelios como de los medios agotados para las tres especies de *Pleurotus*.

6.3.1. Efecto del cambio en el pH inicial sobre la composición del producto biotecnológico de *Pleurotus ostreatus*

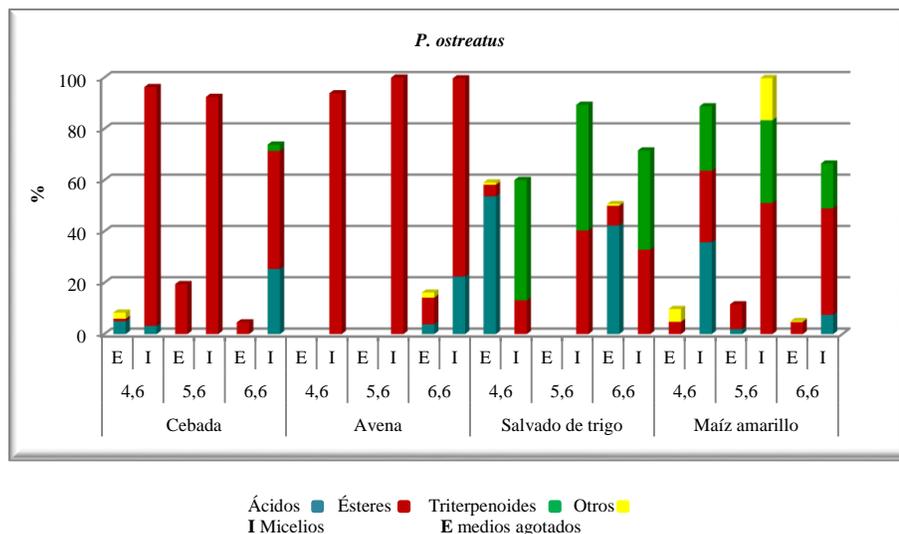
En el capítulo 2 se determinó que para esta especie cultivada con las harinas de cebada y de avena se generan bajas producciones de triterpenoides, contrario al efecto producido por el salvado de trigo y el maíz amarillo. Fue este el criterio que dirigió la selección de estas FC para evaluar la incidencia del cambio en el pH inicial del cultivo. En la figura 6-1 se encuentra la representación gráfica de los resultados obtenidos con los compuestos agrupados como se ha venido haciendo hasta ahora en ácidos, ésteres, triterpenoides y el grupo heterogéneo denominado “otros” (CG en anexo 6A). Del análisis de dicha figura se ve claramente que para el *P. ostreatus*, independientemente del pH inicial, en las harinas de cebada y avena hay una producción casi nula de triterpenoides, buena de ésteres y baja de ácidos grasos, comportamiento contrastante con el evidenciado cuando se emplea salvado de trigo y maíz amarillo, en donde se presenta buena producción de triterpenoides, disminución en el contenido de ésteres y aumento en la producción de ácidos. Así mismo, la mayor proporción de los bioactivos determinados, cuando se utiliza cebada, avena y maíz amarillo, se encuentran en el micelio. El aumento del pH disminuye la proporción de ésteres siendo más marcado el efecto con el empleo de la harina de cebada, mientras que en el caso de los ácidos su biosíntesis se ve favorecida, sin embargo no se presenta influencia apreciable en el contenido de los triterpenoides.

Del análisis de la figura 6-1, se observa que el uso de los pH 4,6 y 6,6 favorece la biosíntesis de los ácidos grasos independientemente de la FC empleada. A pH 4,6 y 6,6 con las cuatro FC, se determinó la presencia esporádica de los ácidos palmítico (más frecuente), oleico y esteárico en proporciones que varían entre 3,2% en el micelio a pH 4,6 cultivado con harina de cebada, hasta 36,5% en el caldo agotado al mismo pH pero con salvado de trigo. De estos compuestos únicamente el primero de ellos ya se reportó como constituyente del *P. ostreatus*, en la primera fase del presente estudio, en donde se tomó como pH inicial 5,6 (empleando harina de trigo).

Para el caso de los ésteres, además de aquellos con radical etilo determinados como los componentes mayoritarios de la mayoría de micelios obtenidos a pH 5,6 con las diferentes FC (capítulo 5), a pH 4,6 y 6,6 se ve favorecida la producción de los correspondientes ésteres metílicos, de igual forma asociados a los micelios obtenidos con las harinas de avena y el salvado de trigo. Es conocido que su generación es a través de una reacción posiblemente mediada por la enzima S-adenosilmetionina (SAM) que cataliza ese tipo de procesos (374).

Dentro de los componentes agrupados como otros, independientemente del pH su producción es baja y no se encontraron compuestos adicionales a los descritos en el capítulo 5. Si bien es cierto que el cambio del pH estimula la producción de estos metabolitos, su efecto es mínimo.

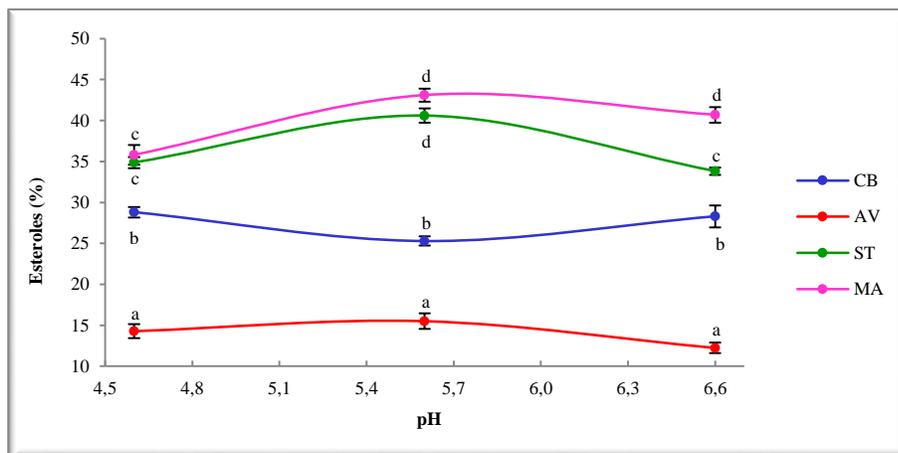
Figura 6-1: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de *P. ostreatus*.



En términos generales la composición triterpenoidal de los extractos no se afecta de una forma apreciable con el pH cuando se utiliza harina de cebada o avena, contrario a lo que sucede con el empleo de salvado de trigo y el maíz amarillo. Esta observación se confirma al analizar los resultados plasmados en la figura 6-2 donde se presenta el contenido total de esteroides para los extractos de los micelios de *P. ostreatus*, de cuyo análisis y con respecto a las variaciones en el tipo de estructuras determinadas a cada pH (Tabla 6-2), se puede determinar que si bien el efecto no es tan marcado en el contenido total, si lo es en el número de estructuras de este tipo. Hay algunas particularidades como es la presencia del estigmast-5-en-3-ol (I) y el estigmast-4-en-3-ona (XV) cuando se usa harina de cebada a pH 6,6. El salvado de trigo a pH inicial de 5,6 continúa siendo la mejor elección en términos de la biosíntesis de este grupo de metabolitos, destacándose un considerable número de estructuras de tipo triterpenoidal.

De igual forma se presentan tendencias colectivas relacionadas con las variaciones estructurales de los triterpenoides, tal es el caso de una predominancia de los núcleos estigmasta sobre los ergosta a pH 4,6 y 6,6, al contrario de lo ocurrido a pH 5,6. Relacionado con los sustituyentes del C3, que varían entre hidroxilo o grupos ceto, no hay un comportamiento generalizado con el pH.

Figura 6-2: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de *P. ostreatus*.



CB harina de cebada; AV harina de avena; MA harina de maíz amarillo; ST salvado de trigo
 Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a la d basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Tabla 6-2: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de *P. ostreatus*.

TRITERPENOIDE ^a / pH	HARINA DE CEBADA			HARINA DE AVENA			SALVADO DE TRIGO			HARINA DE MAÍZ AMARILLO		
	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6
I. Estigmast-5-en-3-ol	NC		1,5	NC			2,8	4,7	3,2	8,9	8,3	14,7
II. Ergost-5-en-3-ol								1,5		1,1		
IV. Estigmast-3,5-dien-7-ona										2,3		
V. Estigmastanol								1,1		3,3	2,3	9,4
VI. Ergost-5,7,9(11),22- tetraen-3-ol		NC						2,0			2,9	
VII. Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno		NC						2,9			1,7	
IX. Ergost-5,7,22-trien-3-ol											17,1	
X. Ergost-7,22-dien-3-ol		NC					1,4	1,4				
XI. Estigmast-3-ona		NC					14,1	16,0	13,5	4,2		6,8
XIII. Ergost-4,6,8(14),22- tetraen-3-ona		NC										
XIV. 4,4-Dimetilcolest-5,7,14,22-tetraen-3-ol		NC										
XV. Estigmast-4-en-3-ona		NC	1,5	NC			13,2	6,1	14,1	3,3		
XVI. Ergost-3-ona							8,8	11,9	7,9			
XVII. Ergost-4-en-3-ona								1,4				
TOTAL	NC	NC	3,0	NC	----	----	41,3	48,0	38,7	23,1	32,3	30,9

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

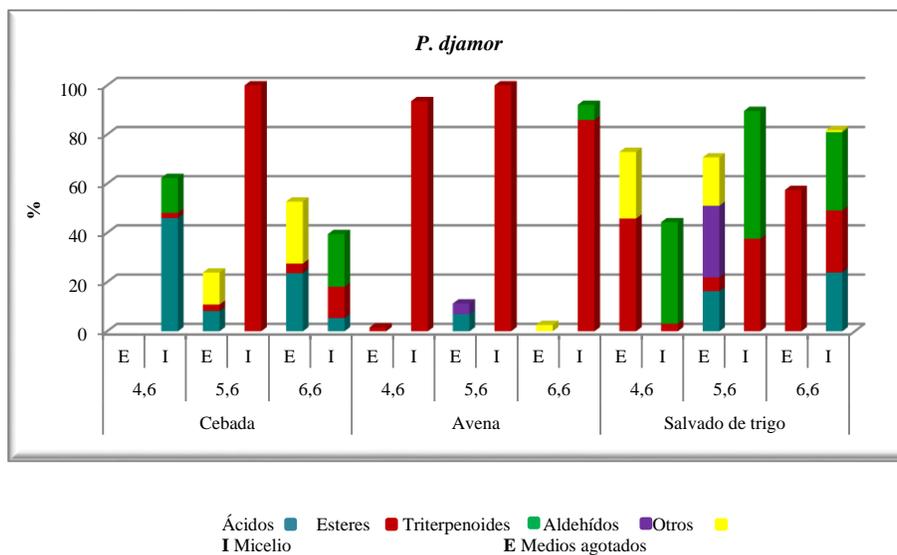
6.3.2. Efecto del cambio en el pH sobre la composición del producto biotecnológico de *Pleurotus djamor*

Los cambios en el pH inicial sobre los componentes de los extractos en AcOEt tanto de los micelios como de los medios agotados de la especie *P. djamor*, se encuentran representados gráficamente en la figura 6-3 (CG en anexo 6B). La selección de las FC de igual manera se realizó con el criterio

descrito anteriormente, siendo las harinas de cebada y avena en las que se promovió la menor producción de triterpenoides en el micelio, contrario a lo observado con salvado de trigo. En términos colectivos, el empleo del salvado de trigo como FC es el que más afecta la composición tanto de los medios como de los micelios al variar el pH.

Es notoria la aparición de ácidos en los micelios a 4,6 y a 6,6 al utilizar harina de cebada, así como a 6,6 con salvado de trigo, particularidad que se había descrito para la especie *ostreatus*, aunado a la presencia esporádica de los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, destacándose las proporciones altas del ácido palmítico (19,8%) y del ácido linoleico (22,6%) en el micelio obtenido con harina de cebada.

Figura 6-3: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de *P. djamor*.



Los esteroides son los componentes mayoritarios en los micelios para el caso de harina de avena independientemente del pH, pero su producción es afectada por el pH con el uso de la harina de cebada siendo mayor a 5,6, seguida por 4,6 y finalmente la más baja a 6,6. La presencia de estos compuestos generalmente está asociada a los micelios, sin embargo llama la atención su determinación en cantidades altas (45,8% y 57,4%) en los caldos obtenidos con salvado de trigo a pH 4,6 y 6,6.

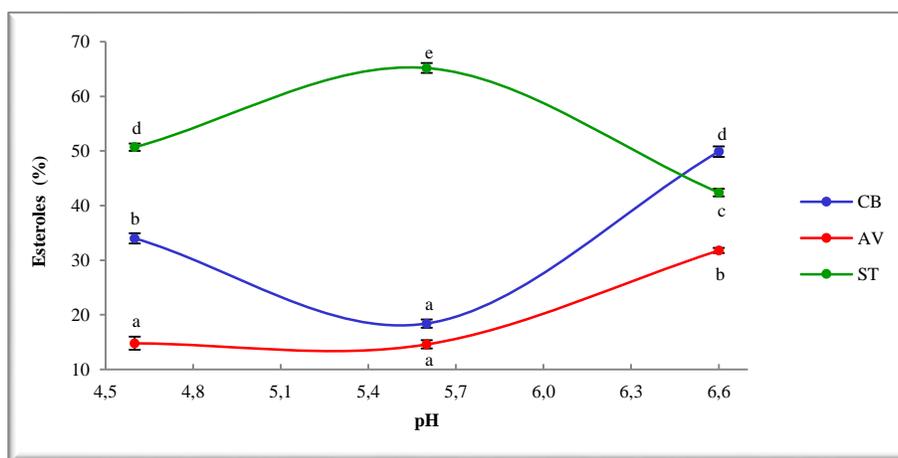
La proporción en la que se encuentran los componentes agrupados en otros, es mayor a pH 6,6 al emplear las harinas de cebada y avena, pero se encuentran en proporciones bajas a este mismo pH con salvado de trigo (0,7%). A pesar de esta variación, se conserva la tendencia de su aparición principalmente en los medios agotados. Relacionado con las estructuras determinadas, el único

cambio comparado con lo mencionado en el capítulo anterior corresponde a la aparición de la bis-(octilfenil)-amina, presente en una proporción del 27,1% en el caldo proveniente de la fermentación con salvado de trigo a pH 4,6. Si bien este compuesto se ha reportado como componente minoritario del aceite esencial de los frutos de la planta *Bridelia retusa* (375), no hay información de su existencia en el reino fungi.

Por último con respecto a los triterpenoides, a los pH 4,6 y 6,6 con la harina de cebada aparentemente se estimula la biosíntesis de triterpenoides, de igual modo ocurre con la harina de avena a 6,6. Con el salvado de trigo se presenta un aumento en la producción de los mismos a 5,6 y una disminución a 6,6 (Figura 6-4). Los componentes triterpenoidales de los extractos de los micelios junto con su proporción se encuentran consignados en la tabla 6-3. Cabe anotar que con salvado de trigo a 4,6 y 6,6 se determinaron dos 3-oxo-triterpenoides (**XIX** y **XX**) en bajas proporciones que no habían sido encontrados en ninguno de los casos estudiados hasta este punto de la investigación, y de los cuales se ha reportado su presencia en el reino plantae (376-378) pero no en el reino fungi.

El núcleo ergosta predomina sobre el estigmasta a pH 5,6, valor en el que únicamente se determinaron triterpenoides al emplear salvado de trigo como FC. Entre tanto el núcleo estigmasta es el principal presente a pH 4,6 y al igual como se describió con el *P. ostreatus* no se mostraron comportamientos generalizados con respecto al sustituyente del C3, que varía dependiendo del pH y de la FC usada para la FEL.

Figura 6-4: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de *P. djamor*.



CB harina de cebada; AV harina de avena; ST salvado de trigo.
Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la e basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Tabla 6-3: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de *P. djamor*.

TRITERPENOIDE ^a / pH	HARINA DE CEBADA			HARINA DE AVENA			SALVADO DE TRIGO		
	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6
I. Estigmast-5-en-3-ol	6,8		10,2	NC		3,7	2,7	5,7	2,6
II. Ergost-5-en-3-ol	1,4		4,2					1,4	1,1
V. Estigmastanol	1,1		2,4				0,8	1,7	1,4
VI. Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol							2,1	1,9	1,8
VII. Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno								NC	1,7
VIII. Ergost-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno								NC	0,6
IX. Ergost-5,7,22-trien-3-ol						NC	6,8	3,3	5,4
X. Ergost-7,22-dien-3-ol								1,3	1,2
XI. Estigmast-3-ona	1,7					NC	9,8	12,0	5,2
XII. 6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona								9,7	
XV. Estigmast-4-en-3-ona	3,2		4,6	NC		2,5	8,8	5,2	4,6
XVI. Ergost-3-ona							7,1	7,2	4,6
XVII. Ergost-4-en-3-ona							2,2	1,5	1,2
XVIII. Ergost-4,22-dien-3-ona								1,1	
XIX. Estigmast-7-en-3-ona							0,9		
XX. Ergost-8(14)-en-3-ona									0,5
TOTAL	14,2	----	21,4	NC	----	6,2	41,2	52,0	31,9

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

6.3.2. Efecto del cambio en el pH sobre la composición del producto biotecnológico de *Pleurotus pulmonarius*

En el caso de esta especie la composición a los tres pH de los medios agotados obtenidos al emplear harina de cebada, en términos generales, cambia con relación a la presencia o ausencia de los constituyentes denominados como otros (Figura 6-5: CG en anexo 6C). Caso contrario ocurre con la harina de siete granos con la que el pH afecta de forma más evidente la composición de los caldos. En los micelios con salvado de trigo se manifestó mayor producción de triterpenoides a pH 4,6 y 5,6 y de los componentes catalogados como otros a 6,6. Con la harina de cebada se disminuye la presencia de triterpenoides con respecto a 5,6 con aumento de ácidos y entre tanto a 4,6 y 6,6 los perfiles no sufren mayores alteraciones. Los cambios presentados con el pH usando la harina de siete granos son más apreciables que con las FC restantes, resaltando una baja producción de triterpenoides a 5,6 con alta presencia de ácidos, en contraposición al comportamiento a los pH 4,6 y 6,6. Estos resultados se confirman con lo obtenido en la determinación del contenido de esteroides por el método de LB representados gráficamente en la figura 6-6.

Figura 6-5: Efecto del pH sobre la composición porcentual de los extractos en AcOEt de *P. pulmonarius*.

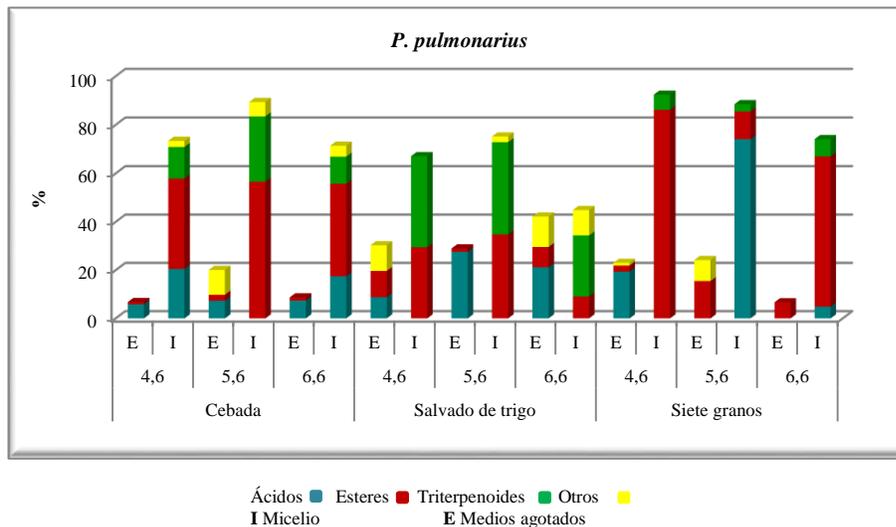
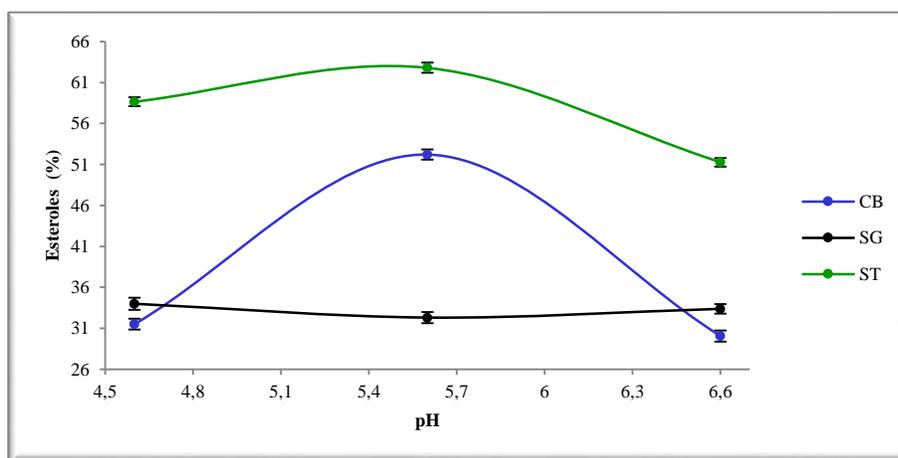


Figura 6-6: Efecto del pH sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de *P. pulmonarius*.



CB harina de cebada; ST salvado de trigo; SG harina de siete granos
 Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la f basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

En cuanto a las variaciones sobre las estructuras de los componentes pertenecientes a las diferentes agrupaciones, el comportamiento es el mismo exhibido por los micelios de las especies *ostreatus* y *djamor*, a pH de 4,6 y 6,6. Aunado a lo anterior está el hecho de que en la especie *pulmonarius*, cultivada empleando harina de cebada a pH 6,6 se encontraron los ésteres 9-oxo-nonanoato de metilo (0,9%), hexadecanoato de hexadecilo (4,9%) y hexadecanoato de octadecilo (1,7%), que no se habían determinado hasta este punto de la investigación, pero de los que hay reportes como componentes volátiles del micelio del hongo marino facultativo *Paecilomyces variotii* (379) e

incluso estudios relacionados con la caracterización de algunas enzimas involucradas en su biosíntesis (380).

En la agrupación de los componentes denominados otros se destaca la presencia de oleamida al emplear salvado de trigo a 4,6 y 6,6 en proporciones del 10,6 y 12,6% respectivamente, compuesto que había sido determinado a pH 5,6 solamente en *P. ostreatus*.

En lo concerniente con las estructuras de los triterpenoides, no se determinaron componentes adicionales a los encontrados a pH 5,6, se observa la mayor diversidad de este tipo de compuestos cuando se emplea salvado de trigo a pH 4,6, sin embargo el mayor contenido de esteroides se presenta a 5,6. Las diferencias en el número de estructuras son más evidentes con el uso de harina de cebada. A diferencia del comportamiento descrito para *P. ostreatus* y *P. djamor* en el que hay una correlación entre el pH y el tipo de núcleo triterpenoidal predominante, para el *P. pulmonarius* no hay un comportamiento generalizado, al igual que con relación al tipo de sustituyente en el C3.

Tabla 6-4: Influencia del pH en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt de micelio de *P. pulmonarius*.

TRITERPENOIDE ^a / pH	HARINA DE CEBADA			SALVADO DE TRIGO			HARINA DE SIETE GRANOS		
	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6	4,6	5,6	6,6
I. Estigmast-5-en-3-ol	2,7	2,4	2,1	3,1	3,2	3,1	3,7	1,5	2,4
II. Ergosta-5-en-3-ol	2,1		1,6	1,4					
IV. Estigmast-3,5-dien-7-ona			1,3	1,6					
V. Estigmastanol				2,5		2,2			
VI. Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	2,6	1,2	2,7	1,5	1,5	2,1		NC	NC
VII. Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno	3,1	1,6	3,3	1,5	1,3	1,6			NC
VIII. Ergost-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno	0,9					0,9			
IX. Ergost-5,7,22-trien-3-ol		21,7			16,3				
X. Ergost-7,22-dien-3-ol	1,8			1,0	0,7				
XI. Estigmast-3-ona	1,2		0,7	8,1	5,2	7,5	NC		2,2
XII. 6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona					3,3	7,1		NC	
XV. Estigmast-4-en-3-ona	4,5		2,7	8,3	3,2	4,6	2,5		2,5
XVI. Ergostan-3-ona				4,1	3,4	7,3		1,5	
XVII. Ergost-4-en-3-ona				1,2					
TOTAL	18,9	26,9	14,4	34,3	38,1	36,4	6,2	3,0	7,1

NC: no cuantificable

^a Los porcentajes están calculados por áreas relativas con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

El pH del medio es un factor muy importante pero a menudo descuidado. Diferentes estudios han demostrado la importancia de controlar esta variable durante todo el proceso fermentativo. Sin embargo, algunos investigadores proponen variar su valor a lo largo de la fermentación con la finalidad de mejorar la producción bien sea de un compuesto en particular o de la biomasa (381). En el caso de esta parte de la investigación, se evaluó el efecto del pH inicial, evidenciándose que el impacto de los cambios de esta variable sobre la composición tanto de los micelios como de los

caldos, es dependiente de la especie y de la FC empleada. No obstante, hay algunos comportamientos generales que permiten seleccionar las condiciones que lleven a potenciar el valor nutriceútico del producto biotecnológico obtenido por FEL de los *Pleurotus*. Tal es el caso del uso del salvado de trigo a un pH de 5,6 que permite, en todas las especies, la mayor producción de componentes triterpenoidales en el micelio, en términos tanto de variaciones estructurales como de la cantidad de los mismos. Si bien, también hay un efecto en la producción de los componentes diferentes a estos, es la presencia de los triterpenoides, la que contribuye de una forma más benéfica, por la variedad de estructuras generadas y la cantidad presente, aumentando el potencial valor nutriceútico de los productos cultivados.

Los cambios en la composición de los productos biotecnológicos inducidos por el pH, pueden ser atribuidos a alteraciones morfológicas durante las etapas de la formación del micelio, que incluso llegan a desencadenar en la muerte celular, como ha sido demostrado por estudios en el reino, específicamente en *Ganoderma lucium*. En esta investigación los autores observaron que al variar el pH se altera el tamaño de los pellets y cambia la viscosidad del medio, conllevando a una perturbación en la transferencia de oxígeno, lo que resulta en aumento o disminución en la producción de los bioactivos, dependiendo de las condiciones del ensayo (382, 383). Papaggiani en una completa revisión relacionada con las características morfológicas fúngicas y la producción de metabolitos en procesos sumergidos, menciona que a valores de pH por encima de 5,5, las paredes celulares de muchos organismos están negativamente cargadas, tendiendo a causar una separación de las células agregadas por repulsiones electrostáticas. En general la tendencia del micelio para formar pellets aumenta cuando el valor del pH del medio aumenta. Con respecto a la relación morfología – producción de metabolitos, el mismo autor menciona estudios en el hongo *Aspergillus niger* en el cual, cuando su crecimiento se da en forma de filamentos favorece la producción de enzimas pécticas, mientras que si es en forma de pellets predomina la formación de ácido cítrico (122). Los resultados de estos reportes podrían explicar las diferencias encontradas para los productos biotecnológicos de los tres *Pleurotus* objetos de estudio, no obstante, es necesario realizar estudios de la morfología de las colonias, que deben incluir el diámetro, número, forma de compactación, estructura y color de los pellets, entre otras características morfológicas, así como el análisis de la producción de los bioactivos durante el tiempo de la fermentación.

Otra justificación a los cambios observados con el pH, está relacionada con la alteración en la actividad de las enzimas excretadas por los hongos, a la que algunos autores atribuyen se debe la gran diversidad en la forma, tamaño, color, textura, estructura y el sabor de los cuerpos fructíferos.

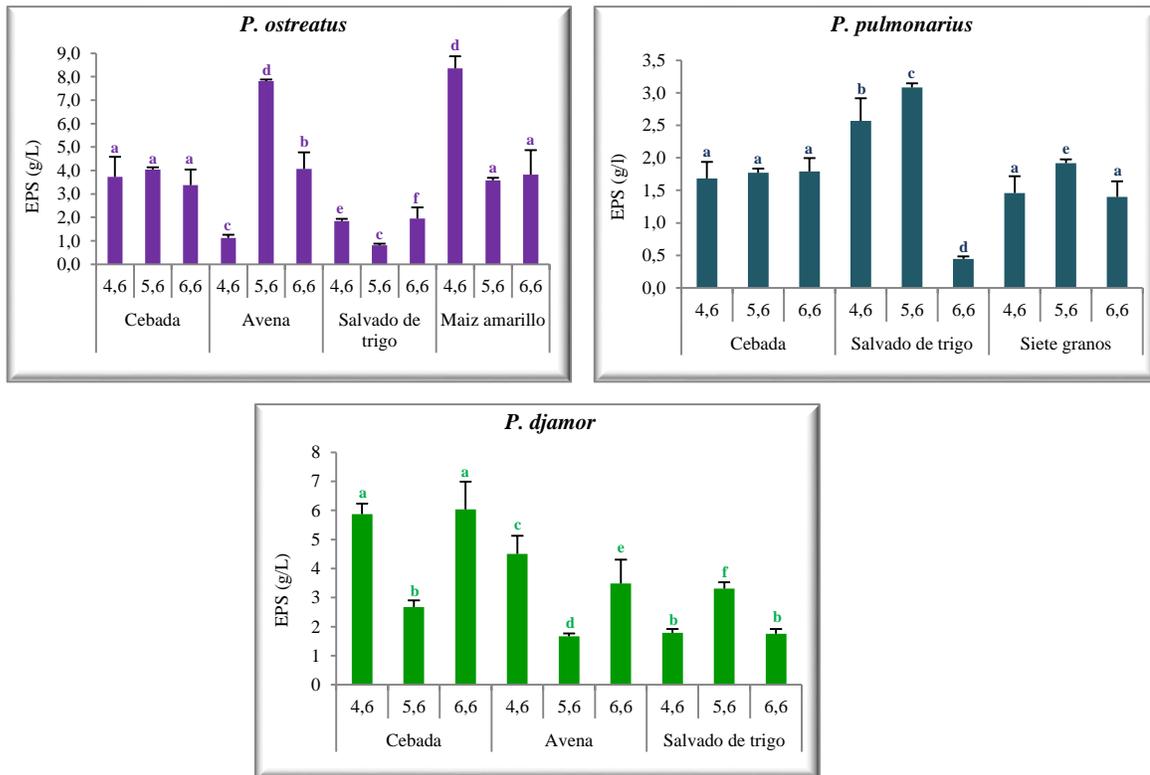
Las especies de *Pleurotus* cuentan con un amplio espectro enzimático y una importante capacidad para secretar una serie de enzimas de propiedades y funciones distintas, que les facilita su crecimiento sobre un extenso número de sustratos. Ellas son de diferentes tipos: (1) las secretadas por el micelio para biodegradar el sustrato de crecimiento; (2) las que participan en la transformación de la fase micelial a la fase de la fructificación; (3) las responsables de la autólisis y (4) enzimas constitutivas/inductivas características del micelio y del cuerpo fructífero (384). La actividad de estas enzimas (enzimas ligninolíticas) excretadas durante el proceso de degradación de los sustratos utilizados para el cultivo de los *Pleurotus*, se puede afectar por el pH generando una reducción en la eficiencia del proceso de degradación de los componentes mayoritarios de la biomasa lignocelulósica y por ende, no habría una producción eficiente de los compuestos de bajo peso molecular que pueden ser asimilados para la nutrición y posterior crecimiento de los hongos (49, 50, 85, 90, 385) desencadenando en una alteración en la biosíntesis de bioactivos. Este comportamiento se confirmó al advertir a simple vista reducciones en la producción de biomasa micelial a los pH de 4,6 y 6,6. Observaciones similares han sido reportadas por otros investigadores como es el caso del trabajo de Diaz en el 2009 sobre *P. ostreatus* obtenido por FEL, en el que se determinó que el pH inicial es un factor que modifica el patrón de producción y actividad de las lacasas (386).

6.3.3. Impacto del cambio del pH inicial en la producción de exopolisacáridos

La influencia del pH en la producción de EPS en las tres especies de *Pleurotus* cultivadas con las distintas FC seleccionadas, está representada en la figura 6-7. De su análisis se puede concluir que el efecto depende de la especie y de la FC usada. Así por ejemplo para el *P. ostreatus* no se observan cambios estadísticamente significativos con los tres pH usando harina de cebada como componente principal del medio de cultivo, con harina de avena la mayor producción se conserva a pH 5,6, contrario al caso del salvado de trigo y la harina de maíz amarillo, con las que se obtienen aumentos tanto a pH 4,6 (125% y 134%) como a 6,6 (138% y 6%) comparados con el pH de 5,6. Para el *P. pulmonarius* de igual forma, con harina de cebada el pH no afecta la producción de los metabolitos, contrario a lo observado con salvado de trigo, con el que a diferencia de la especie *ostreatus* las variaciones de dicho factor, conllevan a una reducción en los EPS del 17% a pH 4,6 y del 83% a pH 6,6. Con la harina de siete granos igualmente el cambio en el pH provoca un decrecimiento en el contenido de los metabolitos de 24% y 27% respectivamente. Por último para el *P. djamor* tanto con el uso de harina de cebada como la harina de avena, los pH de 4,6 y 6,6 repercuten en aumentos en el contenido de los bioactivos que fluctúan entre 109% y 170%. A pesar de que con algunos de los valores de pH evaluados se evidenciaron reducciones en el contenido de EPS comparados con 5,6, continúan estando dentro de los valores reportados en literatura e incluso en ocasiones supera los

mismos. Estos resultados, de igual forma como se describió en el apartado anterior, pueden ser consecuencia de las diferentes alteraciones ocasionadas por las variaciones del pH como son los cambios en la morfología y la eficiencia del consumo de los componentes del sustrato, entre otros.

Figura 6-7: Influencia del pH en la producción de EPS en *Pleurotus*.



Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la **a** a la **f** basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para los triterpenoides, se manifiestan diferencias entre los valores del pH que favorecen la producción de uno u otro grupo de metabolitos. Como se mencionó para el caso de los triterpenoides son el uso del salvado de trigo y el pH de 5,6, las condiciones óptimas, independiente de la especie y teniendo en cuenta la unión tanto de cantidad como el número de estructuras presentes. Para el caso de los EPS estas mismas condiciones favorecen su producción, pero exclusivamente para la especie *P. pulmonarius*, entre tanto para el *P. ostreatus* es el uso de harina de maíz amarillo a 4,6 o harina de avena a 5,6 y para *P. djamor* la ideal sería harina de cebada a 4,6 o 6,6. Comportamientos similares han sido reportados en literatura, en los que los autores mencionan que es necesario seleccionar el pH inicial del proceso biotecnológico dependiendo del objetivo planteado (209), que para el caso particular del estudio de la incidencia de diferentes factores sobre el potencial nutriceútico de las tres especies de *Pleurotus*, se seleccionó

como 5,6, teniendo en cuenta el alto contenido que representan los compuestos triterpenoidales en términos de porcentajes de la composición total de los extractos y la variedad en el número de estructuras encontradas,

6.4. CONCLUSIONES

- El efecto del pH inicial sobre la composición de los productos biotecnológicos es dependiente de la especie y de la FC empleada.
- El uso del salvado de trigo a pH inicial de 5,6 favorece la producción de compuestos triterpenoidales, en términos del número de estructuras y/o la proporción de esteroides presentes en los extractos en AcOEt de las tres especies de *Pleurotus* cultivadas.
- Desde el punto de vista de la composición de los productos biotecnológicos, la selección de un pH inicial para el proceso fermentativo de los *Pleurotus*, empleando fuentes de carbono no convencionales, depende del tipo de metabolitos que se deseen obtener.
- Con base en lo anterior y con el objetivo de evaluar posteriormente el cambio a consecuencia del uso de elicitores y del tipo de fermentación, con miras a potenciar el valor nutriceúutico del producto biotecnológico, se seleccionó como el valor ideal 5,6 por el aumento en la producción de los componentes triterpenoidales determinado bajo estas condiciones.

**CAPITULO 7. EFECTO DE LA ELICITACIÓN
CON DIODOS EMISORES DE LUZ EN LA
COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS
BIOTECNOLÓGICOS DE *Pleurotus***

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AM	LED amarillo
AZ	LED azul
BL	Luz blanca
E	Extracto proveniente de medio de cultivo agotado
EPS	Exopolisacáridos
FC	Fuente de carbono
FEL	Fermentación en estado líquido
I	Extracto proveniente de micelio
IPS	Intrapolisacáridos
LB	Liebermann-Burchard
LED	Diodo emisor de luz
OC	Oscuridad
RJ	LED rojo
VR	LED verde

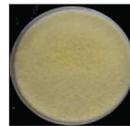
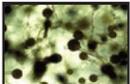
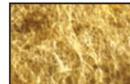
7.1. ANTECEDENTES

El estudio de los productos del metabolismo fúngico ha llevado a importantes desarrollos desde el punto de vista farmacológico, biotecnológico y químico, con el descubrimiento de compuestos con estructuras novedosas algunos de ellos biológicamente activos. Dentro de las herramientas empleadas para favorecer la producción de metabolitos en procesos biotecnológicos, se encuentra el uso de elicitores. En este capítulo se analizarán las variaciones que sobre la composición de los productos biotecnológicos obtenidos por FEL de *Pleurotus* tiene el uso, como elicitores abióticos, de diodos emisores de luz (LED) de cuatro longitudes de onda diferentes: amarillo, verde, azul y rojo y cómo dichos cambios pueden alterar el valor nutriceútico de los mismos.

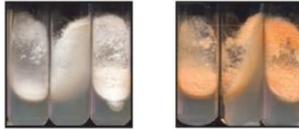
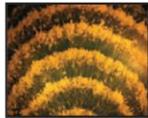
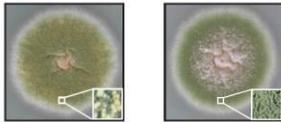
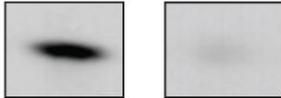
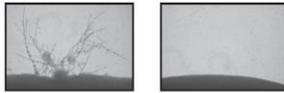
7.1.1. Generalidades de los elicitores

De manera genérica se define a los elicitores como aquellas herramientas que estimulan la producción de ciertos metabolitos (387). Se clasifican con base en su origen y su estructura molecular. Los bióticos tienen origen biológico, generalmente derivados de patógenos o del organismo mismo, pueden ser de composición definida, cuando sus estructuras moleculares se conocen, o tener composiciones complejas. Los abióticos no son de origen biológico y se clasifican en factores físicos y químicos. Dentro de éstos se enmarca el uso de la luz (387) un factor que regula procesos fundamentales, no únicamente en fotótrofos sino también en una amplia variedad de organismos incluyendo a los hongos, como se observa en la figura 7-1 en la que se compara el comportamiento de algunas especies pertenecientes a este reino bajo diferentes condiciones de luz. La luz emitida por diodos es una alternativa de reciente aparición en el ámbito de los estudios de procesos biotecnológicos, que ha arrojado interesantes resultados en términos de las variables de interés para este campo de la ciencia.

Figura 7-1: Respuesta de diferentes hongos a la luz (388).

Phylum	Organismo	Oscuridad	Luz
Zygomycota	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		
	Fotocarotenogénesis Inducción de la biosíntesis de carotenoides en micelio		
	Fotomorfogénesis Inhibición de la formación de micróforos		
	Fototropismo Orientación de macróforos hacia la luz		

Continuación figura 7-1: Respuesta de diferentes hongos a la luz (388).

Ascomycota	<i>Neurospora crassa</i>	
	Fotocarotenogénesis Inducción de la biosíntesis de carotenoides	
	Control del ritmo circadiano Fija el ritmo del ciclo circadiano	
	<i>Aspergillus nidulans</i>	
	Fotomorfogénesis Inhibición del desarrollo sexual e inducción del desarrollo asexual	
	Control del metabolismo secundario Inhibición de síntesis de esterigmatocistina	
Basidiomiceto	<i>Coprinopsis cinerea</i>	
	Fotomorfogénesis Maduración del cuerpo fructífero	
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	Fotomorfogénesis Inhibición de apareamiento y fructificación haploide	

7.1.2. Los diodos emisores de luz

Los estudios de nuevas aplicaciones de los LEDs abren una importante puerta para evaluar su efecto sobre los productos naturales, máxime cuando su uso ha estado restringido casi exclusivamente al área de la electrónica. La luz emitida por estos dispositivos emplea una forma de electroluminiscencia resultante de la excitación electrónica de un material semiconductor. El color de la luz emitida está determinado por la combinación de los materiales del chip y la manera en la cual estos están ensamblados. En la tabla 7-1 aparecen los materiales de los chips más comunes para LEDs y su longitud de onda de emisión.

Con las características de una longitud de onda de bandas delgadas, bajo consumo energético, larga vida útil, fiabilidad, eficacia, sus características ligeras y tamaño pequeño, los LEDs son considerados como las fuentes óptimas de luz para el cultivo de algas fotoautotróficas (389, 390) y plantas en fotobiorreactores (391).

Tabla 7-1: Materiales más comúnmente empleados en los chips de LEDs y color de luz emitida.

COLOR	LONGITUD DE ONDA (nm)	COMPOSICIÓN DEL SEMICONDUCTOR
Infrarrojo	880	GaAlAs/GaAs
Ultra rojo	660	GaAlAs
Super rojo	633	AlGaInP
Super naranja	612	AlGaInP
Naranja	605	GaAsP/GaP
Amarillo	585	GaAsP/GaP
Blanco incandescente	4500K (CT)	InGaN/SiC
Blanco pálido	6500K (CT)	InGaN/SiC
Blanco hielo	8000K (CT)	InGaN/SiC
Verde puro	555	GaP
Súper azul	470	GaN/SiC
Violeta azul	430	GaN/SiC
Ultravioleta	395	InGaN/SiC

Yen en el 2012 investigó el efecto de diferentes LEDs sobre el crecimiento celular y el contenido lipídico de la levadura pigmentada *Rhodotorula glutinis*, encontrando que la irradiación tiene un efecto positivo sobre el primero de los aspectos analizados, pero no tiene impacto significativo sobre el contenido lipídico. Sin embargo, la unión de la irradiación con una fermentación del tipo alimentada y un proceso de microfiltración logró aumentos cercanos al 50% para los dos casos (392). Así mismo, se ha investigado el uso de luz azul intermitente en el alga verde *Haematococcus pluvialis* sobre el crecimiento celular y la producción de astaxantinas, variando la intensidad, la frecuencia de la luz (393, 394) y el tipo de fermentación con resultados promisorios para este clase de procesos (395).

7.1.3. LEDs y el reino fungi

Debido a que los hongos son sésiles y las esporas sirven como unidades de su distribución en el medio ambiente, éstas sólo se producirán cuando el organismo crezca bajo las condiciones apropiadas, por ejemplo sobre la superficie del suelo, y la luz es una señal fiable para indicar si este es el caso. La luz influencia varias respuestas fisiológicas diferentes como son la conidiación asexual, el ciclo circadiano, el metabolismo secundario, la pigmentación y el desarrollo sexual, por lo que no sorprende que los hongos sean objeto de la acción de la luz en un amplio rango de longitudes de onda desde el UV hasta la luz roja lejana. La luz azul es el tipo de luz más asociado con la fotomorfogénesis fúngica, puede activar los pasos metabólicos o el crecimiento directo de estructuras fúngicas. Los fotoreceptores son moléculas que reciben los fotones a través de cromóforos especiales que absorben la luz y trasducen la energía de los fotones en la célula para promover una respuesta. Los hongos poseen variedad de fotoreceptores, algunos de los cuales han sido analizados en los últimos años, como es el caso de las proteínas similares a las fototropinas

White Collar 1 y 2 (WC1 y WC2) del ascomiceto *Neurospora crassa*, responsables de las respuestas del organismo a la luz azul (396), que en actualidad se sabe también están presentes en *Trichoderma atroviride* y en los basidiomicetos *Cryptococcus neoformans* y *Coprinus cinereus* (397). El *Neurospora* es un paradigma para la fotobiología, la bioquímica y la genética por su enigmático proceso de percepción y trasducción de la luz. Los estudios relacionados con el tema han llevado a clonar y caracterizar dos genes reguladores de este tipo de luz, así como al conocimiento de las respuestas que causa en el organismo y que involucran: 1) biosíntesis de carotenoides miceliares, formación de conidias, fototropismo de conidióforos y cambios del potencial de membrana durante el ciclo asexual; 2) formación del protoperitecio, biosíntesis de carotenoides en las paredes del peritecio y fototropismo de picos periteciales, durante el ciclo sexual. Después de la percepción de la luz, una ruta de señalización conduce a respuestas tempranas como son la hiperpolarización de las membranas celulares, el aumento en la resistencia de entrada y la inducción de la biosíntesis micelial de carotenoides, todas observadas después de los 30 min de exposición. No sorprende que haya respuestas que solo ocurren después de varias horas de inducción como es el caso de la estimulación de la formación de fotoperitecio y macroconidias (fotoconidiación) (398).

Silva et. al en el 2005, reportaron la caracterización de los mecanismos implicados en la regulación por la luz azul en *Mucor circinelloides*, relacionada con la síntesis de carotenos (fotocarotenogénesis) y el fototropismo positivo de sus esporangioforos, este último fenómeno también observado con luz verde. Los resultados de esa investigación indicaron que la respuesta fototrófica depende del gen *mcwc-1a*, mientras que la fotocarotenogénesis depende del gen *mcwc-1c*, sugiriendo la existencia de al menos dos rutas de transducción de la señal luminosa en *M. circinelloides*. Esta es una situación más compleja que la observada en ascomicetos y basidiomicetos, donde sólo parece existir una única ruta que controla todas las respuestas a la luz azul. Ello hace de *M. circinelloides* un organismo especialmente interesante para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en estas respuestas (399). Dentro de otros fotoreceptores fúngicos se conocen los fitocromos para longitudes de onda del rojo y rojo lejano, el verde por opsinas en *N. crassa* y *Leptosphaeria maculans*, y azul/UV (onda larga) se detectan por el dominio PAS (Per-Arnt-Sim), la proteína VIVID y posiblemente por criptocromos en *Neurospora crassa* (397). De igual forma se han encontrado genes que codifican para los fotoreceptores de luz azul en basidiomicetos como *dst1* en *Coprinus cinereus* y *phrA* y *phrB* en *Lentinus edodes* (400).

En la tabla 7-2 se encuentran resumidos algunos de los resultados más relevantes relacionados con el uso de LEDs en el reino fungi.

Tabla 7-2: Estudios relacionados con el uso de LEDs en biotecnología fúngica.

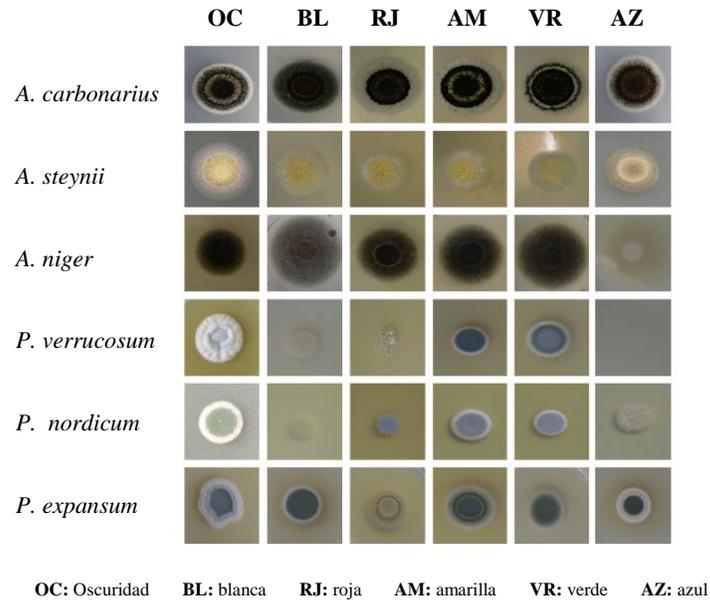
HONGO	OBJETIVO	OBSERVACIÓN	REF.
<i>Monascus purpureus</i>	Evaluación del crecimiento y la producción de pigmentos en FES	Oscuridad estimulación Iluminación directa supresión Luz azul y roja afecta producción del pigmento y morfología del cultivo, verde y azul inhiben producción del pigmento, verde aumenta la biomasa	(401)
<i>Coprinus cinereus</i>	Influencia sobre la conidiación	Luz azul requerida para la fructificación	(402)
<i>Coprinus cinereus</i>	Genes envueltos en la fotomorfogénesis	Caracterización de los genes	(403)
<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus steynii</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Crecimiento y biosíntesis de ocratoxina A por FEL	Luz roja y azul inhibe crecimiento y producción de ocratoxina Amarillo y verde efecto positivo	(404)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Review	Luz azul y roja regula el balance entre el desarrollo sexual y el asexual.	(405)
<i>Mucor circinelloides</i>	Review	Acumulación de beta carotenos y el fototropismo del cuerpo fructífero	(405)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de biomasa por FEL	Azul > blanca > oscuridad > rojo > amarillo	(406)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Producción de ligninoperoxidasa, biomasa y EPS por FEL	Con excepción de la luz verde hay decrecimiento o no hay diferencias significativas de la actividad LiP y proteínas extracelulares Amarillo, verde y rojo aumentan la producción de biomasa, azul y blanco reducen EPS	(397)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Producción de biomasa, consumo de sucrosa y actividad fitasa por FES	LED azul inhibe crecimiento, rojo promueve	(407)
<i>Monascus</i>	Desarrollo de células, producción de ácido γ -aminobutirico (GABA), lovastatina y citrina.	Luz roja estimula la producción de pigmentos, citrina y Lovastatina, azul estimula producción de GABA	(408)
<i>Pleurotus eryngii</i>	EPS y biomasa	Longitudes de onda cortas favorecen la producción de EPS pero reducen la de biomasa	(409)

Los cambios en la longitud de onda empleada ocasionan de igual forma alteraciones en la morfología de los organismos, como se evidencia en la figura 7-2 con variaciones en las coloraciones, la forma, la esporulación y el crecimiento de los micromicetos evaluados (404).

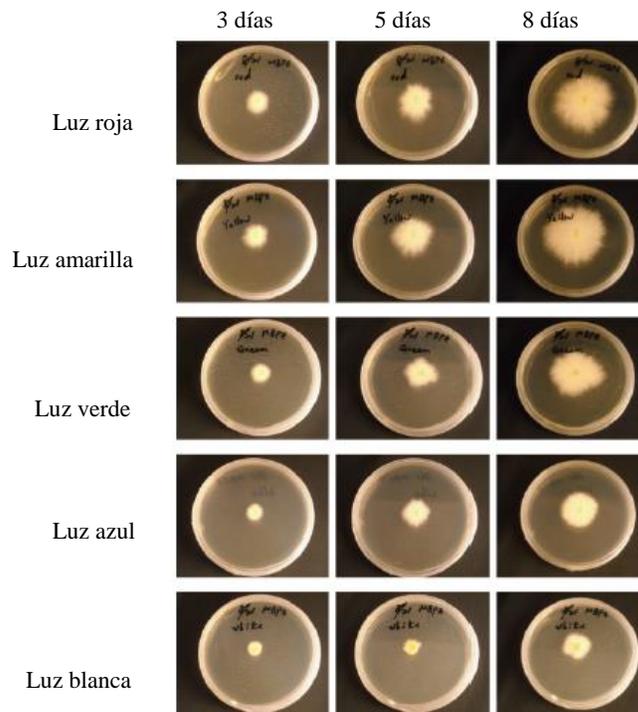
En lo que respecta con el género *Pleurotus*, Poyedinok et. al mencionado por Gregori et. al en el 2007, encontraron que la irradiación con luz roja y verde proveniente de lámparas de argón y helio-neón, estimulan el crecimiento vegetativo del micelio de *P. ostreatus* acortando el tiempo de colonización del sustrato y el de fructificación, con aumentos entre el 36% y 51% en la eficiencia biológica (43). En el 2010 un grupo de investigadores japoneses, usaron las características de los diodos emisores de luz para estudiar el efecto de la calidad, la intensidad y los ciclos repetidos luz-oscuridad, en el crecimiento del micelio de *P. ostreatus*, observando que la luz azul estimula la

supresión del crecimiento y que su efecto es dependiente de la intensidad. Los mismos autores mencionan la existencia de estudios en donde se ha observado que simultáneamente 15 genes están sobre-regulados y 13 infra-regulados por estimulación con luz azul en *Pleurotus* (410). Otros estudios han reportado que la longitud de onda y la intensidad de la luz influyen la esporulación (400), agregación hifal (411) y la formación de primordios de hongos ostra (412).

Figura 7-2: Morfología de varios hongos en respuesta a diferentes colores de luz (404).



En el 2013 Jiun-Yan realizó el único trabajo reportado sobre la producción de metabolitos en el género *Pleurotus* y el uso de LEDs, dirigido a evaluar la producción de EPS, biomasa obtenida por FEL y el crecimiento hifal en cajas de Petri, para la especie *P. eryngii*. De estos ensayos se concluyó que la luz roja y amarilla promueven el crecimiento del micelio en FES, con luz azul el proceso es más lento pero se obtiene una alta densidad (Figura 7-3). Respecto a los EPS, la mayor producción se genera con la luz verde y azul, seguida por el amarillo y finalmente el rojo. Aunado a esto los autores investigaron cuantitativamente la relación entre la longitud de onda de los LEDs, la biomasa y la producción de EPS, encontrando una correlación lineal positiva entre la longitud de onda y la producción de biomasa tanto en FES como en FEL, y lineal negativa con la generación de EPS (409).

Figura 7-3: Crecimiento hifal de *Pleurotus eryngii* en estado sólido bajo diferentes LEDs (409).

7.1.4. Los elicitors y la producción de triterpenoides en hongos

Las investigaciones relacionadas con este tema han sido limitadas. En el 2010 se reportó el uso de iones de metales pesados (AgNO_3 , CuCl_2 , CdCl_2 , CdCl_3 , MnSO_4 y HgCl_2) como elicitors para aumentar el contenido de ácidos ganodéricos durante FEL de *Ganoderma lucidum*. Este tipo de sales se han empleado para inducir la producción de biomasa, la acumulación de terpenoides y de otros metabolitos secundarios en productos naturales, siendo el cobre uno de los más utilizados debido a que aumenta la actividad de las enzimas involucradas en las rutas metabólicas, inducida por la acumulación de componentes de la señal aumentando la producción de metabolitos bioactivos, incluyendo los terpenoides. Sin embargo, cuando este ion se encuentra en exceso, puede interferir con numerosos procesos fisiológicos resultando en alta toxicidad para las células, llegando incluso a causar daños morfológicos en las mismas. Los autores mencionan que hasta ese momento no se tenía conocimiento de procesos de elicitación aplicados a la producción de metabolitos secundarios en hongos. La extrapolación de la efectividad del uso de los iones Cu^{2+} en la elicitación de la biosíntesis de los ácidos ganodéricos con *Ganoderma* fue corroborada, con aumentos con respecto al control del 25%, 31% y 61% en la producción de biomasa, EPS y ácidos ganodéricos respectivamente (413).

En el mismo año los autores reportaron el papel elicitor de una proteína aislada desde el micelio de *Tuber melanosporum* que enriquece la biosíntesis de polisacáridos y ácidos ganodéricos durante la

fermentación del *Ganoderma*, con un aumento del 31,2% del último grupo de compuestos respecto al control. Adicionalmente reportaron que la biosíntesis es afectada significativamente por el tiempo transcurrido en la fermentación antes de la adición del elicitor proteico, con un valor óptimo en el día 4 del cultivo (414).

Más recientemente, en el 2012 Ching-Jen et. al evaluaron la elicitación con factores químicos (quitosan y CaCl_2) y físicos (temperatura y aireación) sobre la producción de triterpenos y la actividad antitumoral en el basidiomiceto *Antrodia cinnamomea*. La actividad antibacterial del quitosán hace de este un buen candidato como elicitor para los hongos, así como los iones Ca^{2+} catalogados como mensajeros secundarios generales, que pueden elevar la presión osmótica de las paredes de las células fúngicas, desempeñando un papel como agente estresante. Como resultado determinaron que el quitosán es el elicitor químico más potente, adicionado en una concentración de 100 mg/L generando un aumento en la producción de biomasa y de triterpenoides cercanos al 7% y 24% respectivamente. Sumado a esto reportaron un enriquecimiento en la producción de los componentes de interés bajo condiciones de limitación en el contenido de oxígeno y con fluctuaciones de la temperatura (145).

Con base en los resultados descritos anteriormente, se planteó esta parte de la investigación dirigida a evaluar el efecto que tiene el uso de los LEDs sobre las rutas biosintéticas de los *Pleurotus* obtenidos por FEL, lo que traería como consecuencia un efecto sobre el potencial valor nutriceútico de los productos biotecnológicos.

7.2. METODOLOGÍA

7.2.1. Espectros de emisión de los LEDs

Los espectros de emisión para cada una de las bombillas LEDs utilizadas en el proceso de elicitación, se tomaron en un espectrofotómetro OCEAN OPTICS USB 2000 con un detector de arreglo de diodos de silicio 2048.

7.2.2. Material fúngico

Se realizaron los cultivos como se describió en el capítulo 1 numeral 1.2.1, con la variación de que el agitador orbital se cubrió con una caja rodeada internamente por espejos, empleados con el objetivo de maximizar la luz emitida por una bombilla central Minidicroica Dragon Puck con un potencial eléctrico de 12 V y una potencia de 3. Se utilizaron bombillas de colores azul, verde, rojo y amarillo, conectadas a un módulo LED OT 18/200-240/700 DIM/OSRAM. Las fermentaciones

con luz blanca y en la oscuridad se emplearon como controles positivo y negativo respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a 100 rpm, durante 9 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Como FC se empleó salvado de trigo y el pH inicial fue 5,6.

7.2.3. Obtención y análisis de los extractos de *Pleurotus*

Cada uno de los productos biotecnológicos se extrajo como se describió en el numeral 2.2.3 y se determinó su composición siguiendo la metodología detallada en los numerales 2.2.4 a 2.2.6.

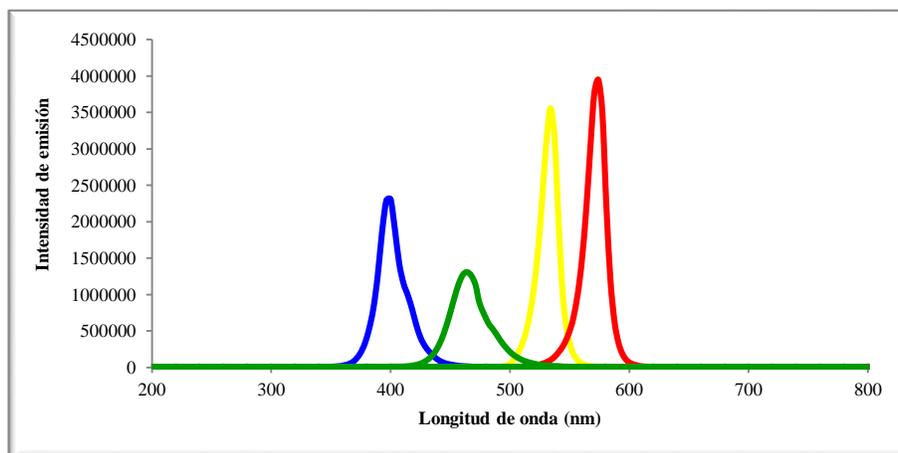
En cuanto al cálculo de los EPS se realizó como está descrito en el numeral 5.2.2.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Con base en los resultados descritos a lo largo de esta investigación, se empleó como FC para evaluar el efecto del uso de los LEDs, el salvado de trigo a un pH inicial de 5,6, teniendo en cuenta que son estas las condiciones más eficientes en términos de la producción de triterpenoides, para las tres especies estudiadas.

En la figura 7-4 están los espectros de emisión de los diferentes diodos empleados, característicos para este grupo de dispositivos con un solo pico de emisión (415). De allí se puede observar que el LED amarillo es el que posee un rango de emisión de longitud de onda más bajo, seguido por el rojo, el azul y finalmente el verde.

Figura 7-4: Espectros de emisión de los LEDs empleados como elicitores.



Azul 389 nm-407 nm; verde 446 nm-481 nm; amarillo 526 nm-540 nm y rojo 563 nm-580 nm.

7.3.1. LEDs y composición del *Pleurotus ostreatus*

El efecto del uso de los LEDs sobre la composición tanto de los micelios como de los medios agotados para la especie *P. ostreatus* está representado en la tabla 7-3. De su análisis se puede concluir que para el caso de la composición de los micelios, hay un efecto significativo global al comparar con la luz blanca, destacándose la generación de ácidos (rojo > amarillo > azul > verde) así como de los componentes catalogados como otros (amarillo > azul = verde > rojo) y una reducción en menor proporción para el caso de los triterpenoides (rojo < azul < verde < amarillo) y los ésteres (rojo < amarillo < azul < verde). En lo que respecta con la oscuridad la tendencia se asemeja a la observada con el empleo de los LEDs.

Para el caso de los medios agotados de igual forma se advierte la aparición de ácidos excepto empleando la luz azul, siendo su cantidad mayor con el LED amarillo, seguido por el rojo y finalmente el verde. Así mismo, se observa la presencia de esteroides con los cuatro elicitores, con una mayor proporción que al usar la luz blanca, siendo más marcado el efecto con el LED verde, seguido por el amarillo, el rojo y en menor proporción el azul. Con esta última longitud de onda de igual forma se encuentran en los medios los constituyentes catalogados como otros. La composición de los caldos agotados obtenidos en la oscuridad se asemeja a la obtenida con el LED azul.

Tabla 7-3: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de *P. ostreatus*.

	^a	ÁCIDOS	TRITERPENOIDES	ESTERES	OTROS
Micelio		14,1	29,8	4,8	27,2
		1,7	22,4	3,8	27,3
		21,8	20,7	6,1	47,9
		29,8	31,8	15,6	12,9
		0,0	48,0	40,4	0,0
		28,8	28,2	3,0	18,6
Medio		0,0	0,0	0,3	15,6
		16,2	0,0	15,6	0,0
		61,6	7,8	8,7	0,0
		21,7	0,8	2,8	12,0
		0,0	0,0	0,0	0,0
		3,3	0,0	0,8	8,7

^a Como controles positivo y negativo se emplearon los productos obtenidos con luz blanca y oscuridad.

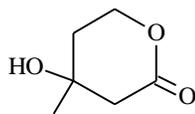
Los ácidos determinados tanto en los medios como en los micelios al emplear LEDs corresponden al palmítico y al linoleico, encontrándose que el LED amarillo incrementa la biosíntesis de estos dos compuestos. En cuanto a la excreción esta se encuentra regida por la longitud de onda del LED, es

así como el LED amarillo favoreció la excreción de los ácidos mencionados, seguido por el rojo acompañados adicionalmente del benzoico (3,6%), el oleico (4,5%) y el esteárico (1,3%), todos los anteriores reportados en literatura como componentes de los *Pleurotus*. La estimulación en la producción de este grupo de compuestos aumenta el potencial como nutriceútico de los productos biotecnológicos obtenidos, entre ellos el ácido linoleico que como es bien sabido, es importante para el crecimiento humano, el mantenimiento de la salud a través de la producción de prostaglandinas y la regulación de la presión sanguínea, los lípidos en sangre, las respuestas inmunes, la inflamación y la apoptosis (166).

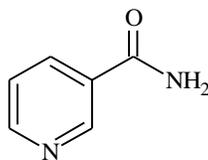
En lo que respecta con el efecto de los LEDs sobre variaciones estructurales en el grupo de los esterios, no se manifestaron cambios relevantes en estos. De igual forma como se estableció con la luz blanca, se determinaron esterios etílicos de ácidos grasos y en proporciones bajas los metílicos (0,5-4,2%). Como se mencionó en el capítulo 6 la presencia de estos últimos componentes fue exclusiva a pH 4,6 y 6,6, llevando a pensar que su biosíntesis pueda atribuirse como una respuesta de los organismos a condiciones de estrés, bien sea por la disminución en la actividad enzimática que dificulta la degradación y posterior incorporación de los componentes de los sustrato para su crecimiento o por las condiciones generadas al emplear los LEDs.

Con relación a los componentes denominados otros, como se precisó en el capítulo 5, se encontraron compuestos heterocíclicos en bajas proporciones y con aparición restringida y diferenciada entre los elicitores. Dentro de sus estructuras se incluyen:

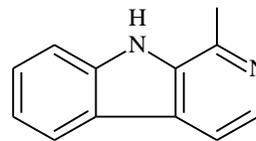
- a) derivados del pirano como el tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona más conocido como mevalonolactona producida por *Lactobacillus plantarum* y con propiedades antifúngicas comprobadas (416), precursor biosintético de varios terpenoides, esteroides, carotenoides, isoprenoides y pentanoides (417);
- b) nicotinamida o 3-piridinocarboxamida reportada en *Pleurotus ostreatus* como uno de los componentes responsable, junto con el ácido linoleico, de la actividad antioxidante del hongo (166)
- c) harmano o 1-metil-9H-Pirido[3,4-b]indol, alcaloide del tipo β -carbolina que ha sido identificado en algunas carnes y también en alimentos de origen vegetal (418).



tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona



3-piridinocarboxamida



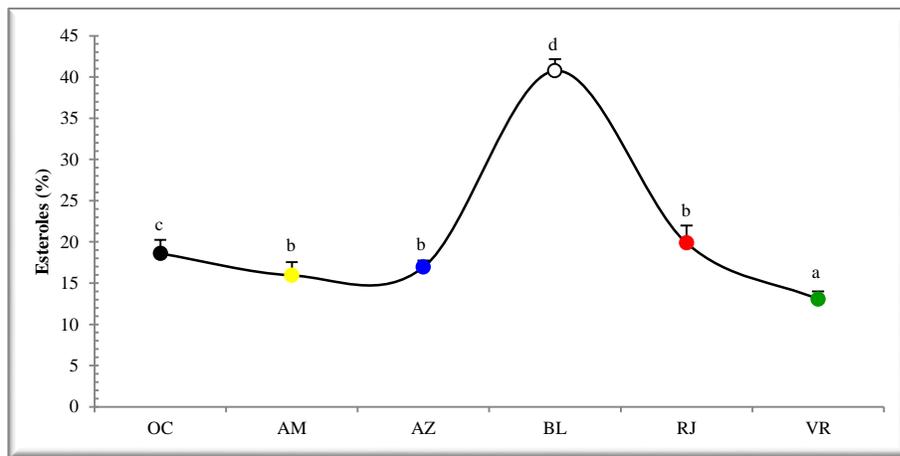
1-metil-9H-Pirido[3,4-b]indol

Ninguno de estos componentes había sido determinado sin el uso de la elicitación. En todos los micelios elicitados al igual que en la oscuridad se determinó la presencia del pentadecilresorcinol (olivetol) en proporciones que van desde 12,9% con el LED rojo hasta 47,9% con el amarillo. Es un compuesto fenólico que pertenece al grupo de los alquilresorcinoles, considerados como uno de los componentes más importantes presentes en el salvado de diferentes cereales y responsables de los beneficios en la salud humana de los mismos, sin embargo, no se determinó como constituyente de esta FC. También se han reportado en plantas, bacterias, hongos (419), algas, musgos y animales, poseen propiedades como antioxidantes (420), antimicrobianos, antiparasitarios y citotóxicos (421).

El efecto de la elicitación en la biosíntesis de los componentes triterpenoidales para *P. ostreatus*, está representada tanto en términos del contenido total de esteroides como en las estructuras de los mismos (Figuras 7-5 y 7-6). Como se mencionó anteriormente hay una reducción en la producción de estos metabolitos con todos los LEDs, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre el contenido total de esteroides obtenido con el uso del amarillo, el azul y el rojo. En términos del número de estructuras, con ninguno de los elicitores éste se ve aumentado con respecto al blanco, resaltándose algunas particularidades como el caso del compuesto **I** que es el triterpenoide mayoritario producido independientemente de la longitud de onda del elicitor, así como en la oscuridad. Los triterpenoides **VI**, **VII**, **XV** y **XVII** únicamente se determinaron con la luz blanca y en contraste, ninguna estructura es de producción restringida al uso de los elicitores. En términos generales el uso de los LEDs favorece la biosíntesis de los nucleos estigmasta con sustituyentes –OH en el C3, en contraste con la tendencia presentada en el blanco, en el que predominan los ceto con núcleo ergosta. Aunado a esto, con el empleo de la luz amarilla se determinó la presencia en los caldos de cultivo del estigmast-5-en-3-ol (**I** - 1,3%) y estigmast-4-en-3-ona (**XV** - 6,5%), así como este último con el LED rojo en un 0,8%, particularidad que no se había observado bajo ninguna de las condiciones evaluadas en este trabajo, permitiendo inferir que la excreción es selectiva y promovida por la elicitación, lo que aporta un valor agregado a los medios agotados que potencia las características nutriceúticas del producto biotecnológico total obtenido empleando este tipo de

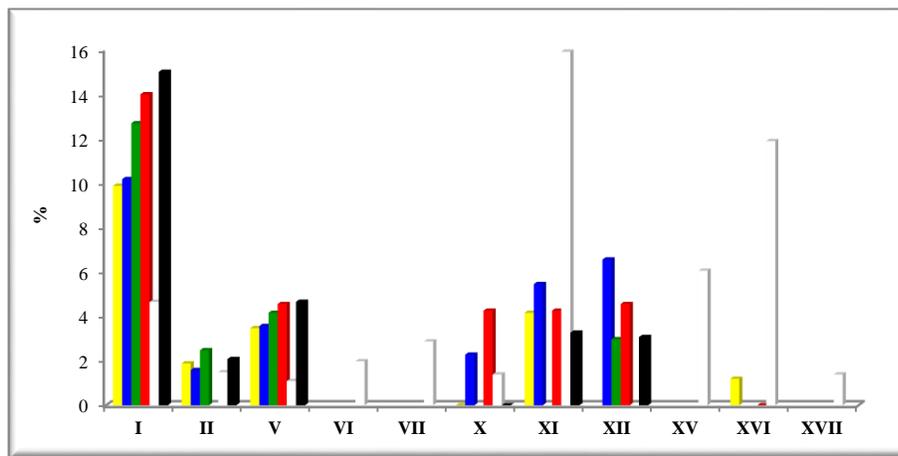
elicitores, teniendo en cuenta las actividades biológicas reportadas para este par de compuestos (422, 423).

Figura 7-5: Efecto de los elicitores sobre el contenido total de esteroides por 100g de extracto en AcOEt para el micelio de *P. ostreatus* cultivado empleando como FC salvado de trigo.



OC Oscuridad **AM** Amarillo **AZ** Azul **BL** Blanco **RJ** Rojo **VR** verde
 Los resultados son datos después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la **a** a la **d** basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Figura 7-6: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de *P. ostreatus*.



- | | |
|---|--|
| I. Estigmast-5-en-3-ol | II. Ergost-5-en-3-ol |
| V. Estigmastanol | VI. Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol |
| VII. Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno | X. Ergosta-7,22-dien-3-ol |
| XI. Estigmast-3-ona | XII. Estigmast-6-hidroxi -4-en-3-ona |
| XV. Estigmast-4-en-3-ona | XVI. Ergostan-3-ona |
| XVII. Ergost-4-en-3-ona | |

7.3.2. LEDs y composición del *Pleurotus pulmonarius*

Para el *P. pulmonarius* como se observa en la tabla 7-4 el uso de los diodos genera un aumento en la producción de ácidos en el micelio, destacándose la estimulación de la biosíntesis de los ácidos linoleico y palmítico que no se producía con la luz blanca y que, al igual que en el *ostreatus*, es el LED amarillo el que lleva a su mayor producción. En los caldos agotados se ve que la excreción de estos compuestos con el LED azul y el verde es menor, siendo la disminución más crítica con el primero de ellos, contrario al comportamiento para el rojo y el amarillo, siendo la mayor proporción la alcanzada con este último. Tanto las cantidades como el número de estructuras de tipo éster producidos en el micelio y los excretados a los caldos agotados experimentan reducciones al usar los LEDs, siendo más evidente el efecto en los micelios. Así mismo se determinó la presencia ésteres etílicos y metílicos predominando los últimos al emplear los diodos. En lo que respecta con el grupo de los otros se estimuló la producción en los micelios del olivetol con todos los elicitores e incluso en la oscuridad, de igual manera como se describió para el *P. ostreatus*. El diodo que emite luz verde favorece la excreción de derivados del furano (1,1%) ya determinados en el *P. ostreatus* así como del aldehído del ácido linoleico (7,9%) (335).

Tabla 7-4: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de *P. pulmonarius*.

	a	ÁCIDOS	TRITERPENOIDES	ESTERES	OTROS
MICELIOS		12,2	40,2	2,1	30,1
		15,1	30,6	2,5	25,1
		17,8	28,9	3,7	21,3
		11,5	22,5	2,1	35,7
		0,0	38,1	34,8	2,3
		9,9	18,8	5,8	55,0
MEDIOS		0,0	0,0	0,2	0,0
		23,8	2,1	0,0	9,0
		45,8	3,4	1,1	0,0
		36,5	0,2	0,3	0,4
		27,6	0,0	1,4	0,0
		0,3	0,0	1,9	0,0

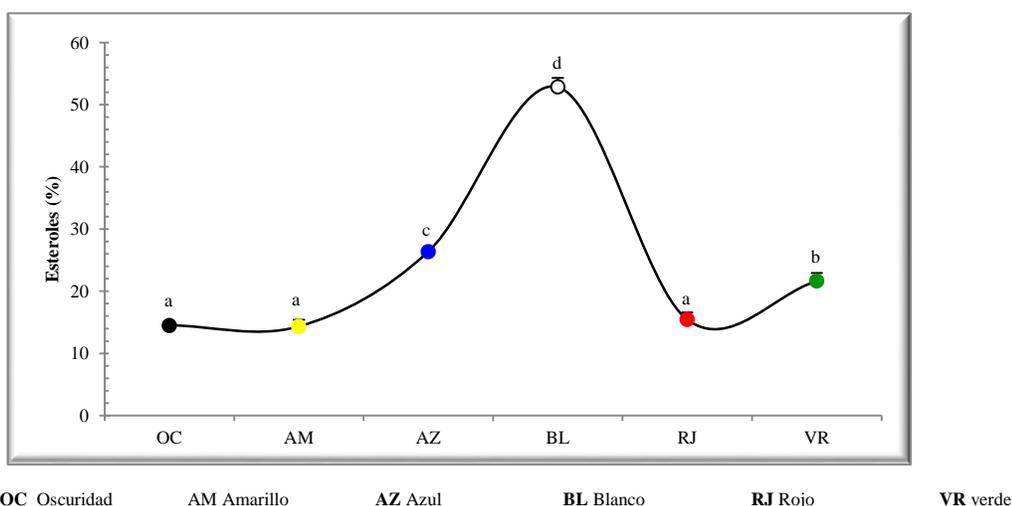
^a Como controles positivo y negativo se emplearon los productos obtenidos con luz blanca y en la oscuridad.

Finalmente el efecto de los elicitores sobre la producción de los componentes triterpenoidales varía con la longitud de onda del diodo, causando un ligero aumento con la luz azul y reducciones con los LEDs restantes, aparentemente de forma directa con respecto a la longitud de onda del dispositivo (a mayor longitud de onda mayor reducción). En los caldos agotados se demostró la presencia, de igual manera como con el *P. ostreatus*, de los esteroides **I** (0,7%) y **XV** (2,7%) con LED amarillo, así

como este último con el LED rojo en un 0,2%. Adicionalmente esta particularidad también se observó con el diodo verde con los mismos compuestos pero en proporciones del 0,5% y del 1,6% respectivamente.

La variación en el contenido de esteroides totales del extracto en AcOEt del micelio, determinado por el método de LB con cada uno de los elicitores y los controles, está graficado en la figura 7-7, donde se observa la reducción causada por el uso de los diodos y la conservación de la tendencia manifestada en los datos consignados en la tabla 7-4.

Figura 7-7: Efecto de los elicitores sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de *P. pulmonarius* cultivado empleando como FC salvado de trigo.

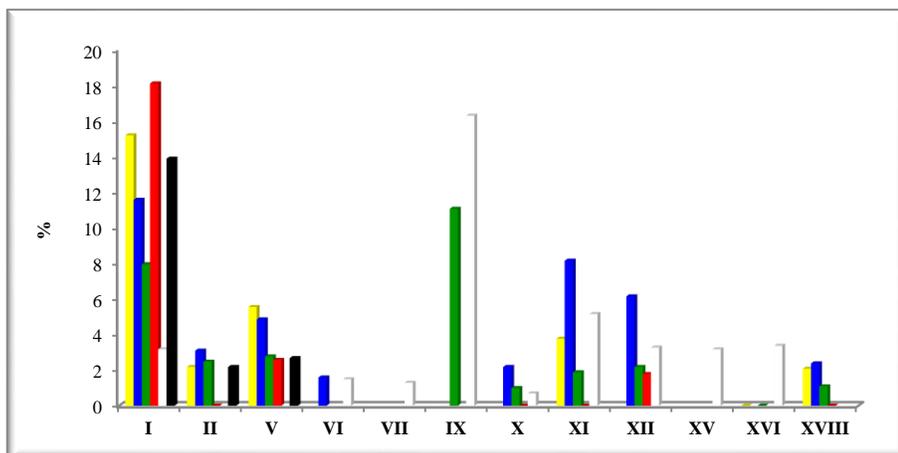


Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a d basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Con respecto a las estructuras que constituyen la fracción triterpenoidal, la figura 7-8 permite apreciar de manera comparativa el contenido relativo de cada uno de estos presentes en los extractos de los micelios de *P. pulmonarius* obtenidos con los cuatro LEDs, así como con los controles positivo y negativo. No se produce aumento en el número de estructuras determinadas con ninguno de los elicitores comparado con la luz blanca. Sin embargo, al igual que en el caso del *P. ostreatus* se observan algunas peculiaridades, como es el caso de los compuestos **VII** y **XV**, cuya presencia solo se observó con el control positivo, y el estigmastanol (**V**) que se produce únicamente cuando hay elicitación, independiente de la longitud de onda del LED, así como en la oscuridad. Estas observaciones llevan a determinar que los elicitores pueden producir efecto negativo, como es el caso de los compuestos **VII** y **XV** y positivo para **V**, lo que permite determinar que si están incidiendo sobre las rutas biosintéticas del *P. pulmonarius*, en lo referente al tipo de estructuras que se generan y no en la cantidad total de los esteroides.

En cuanto a la biosíntesis del esteroide estigmast-5-en-3-ol (**I**), componente mayoritario tanto al emplear los LEDs amarillo, azul y rojo como con ausencia de luz, se observó que triplica y en algunos casos incluso alcanza hasta seis veces su producción comparado con el blanco positivo, resultado que se había evidenciado en el *P. ostreatus*, con la diferencia de que para este último el comportamiento era similar con todos los elicitores. El componente triterpenoidal mayoritario al emplear el LED verde es el ergosta-5,7,22-trien-3-ol (**IX**), al igual que con el control positivo, con un ligero aumento en la cantidad presente en este último, lo que lleva a inferir que la biosíntesis de dicho esteroide no se ve afectada con esta longitud de onda, en contraste con el efecto producido por los otros elicitores, hipótesis que se confirma al comparar los perfiles con el blanco positivo y con la luz verde, en el que se observan el mayor número de similitudes entre las estructuras presentes. De igual forma estos resultados se pueden atribuir a la presencia de fotoreceptores específicos para esta longitud de onda en la especie *P. pulmonarius*, que generan un comportamiento diferente al presentado por el *P. ostreatus*. El núcleo estigmasta predomina sobre el ergosta al emplear los diodos, así como la presencia del -OH independientemente de la longitud de onda, a excepción de la luz amarilla con la que los dos sustituyentes aparecen en proporciones iguales.

Figura 7-8: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de *P. pulmonarius*.



- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| I. Estigmast-5-en-3-ol | II. Ergost-5-en-3-ol |
| V. Estigmastanol | VI. Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol |
| VII. Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno | IX. Ergosta 5,7,22-trien-3-ol |
| X. Ergosta-7,22-dien-3-ol | XI. Estigmast-3-ona |
| XII. Estigmast-6-hidroxi-4-en-3-ona | XV. Estigmast-4-en-3-ona |
| XVI. Ergostan-3-ona | XVIII. Estigmast-4,22-dien-3-ona |

7.3.3. LEDs y composición del *Pleurotus djamor*

Para el caso de esta especie como se demuestra al analizar los datos consignados en la tabla 7-5, que el comportamiento es semejante en algunos casos al descrito para el *P. pulmonarius* y el *P. ostreatus*,

con la aparición de ácidos en los micelios al emplear los elicitores, a excepción del LED rojo, así como una disminución en su excreción hacia los caldos agotados con excepción del caso del empleo del LED verde en el que se evidencia un aumento del 20%; disminución en el contenido de triterpenoides en la biomasa y presencia de los mismos en los medios con LED verde; reducción en la cantidad de los esteroides en el micelio con todas las longitudes de onda, con respecto a su excreción de igual forma hay una reducción con rojo, azul y amarillo, mientras con verde se manifiesta un aumento; finalmente en el grupo de los otros se observó la aparición del olivetol en micelios y una reducción de las proporciones de los otros excretados a los caldos agotados por la ausencia de la oleamida y el p-hidroxibenzaldehído que habían sido determinados con el control positivo (capítulo 5).

Las estructuras determinadas para todos los tipos de compuestos antes descritos corresponden a las ya mencionadas para las dos especies restantes, con la presencia adicional del indol en el caldo agotado resultante del ensayo bajo condiciones de ausencia de luz (1,5%), que ha sido reportado en algunos hongos como *Cortinarius lebre* (424), *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*, atribuyendo su presencia en estos últimos al producto de reacciones de rompimiento de amino ácidos (343).

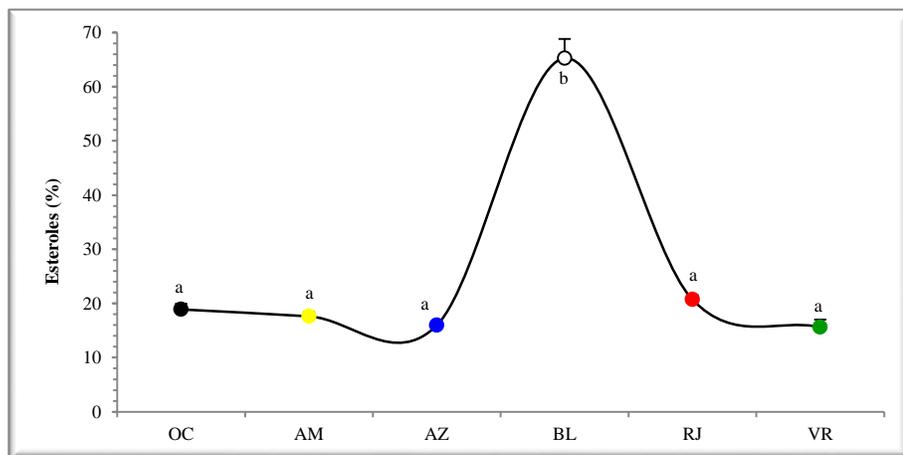
Tabla 7-5: Influencia de los LEDs en la composición porcentual total de los extractos en AcOEt de los micelios y de los medios agotados de *P. djamor*.

	^a	ÁCIDOS	TRITERPENOIDES	ESTERES	OTROS
MICELIOS		15,7	22,4	1,4	39,1
		14,6	17,1	10,9	43,0
		30,9	25,0	5,9	30,3
		0,0	20,9	0,0	14,1
		0,0	52,0	37,6	0,0
		15,3	24,2	8,4	0,0
MEDIOS		8,5	0,0	0,5	2,3
		19,7	1,2	22,2	0,0
		0,2	0,0	0,8	2,1
		6,2	0,0	1,5	10,0
		16,3	0,0	5,6	19,7
		44,0	2,5	1,8	9,7

^a Como controles positivo y negativo se emplearon los productos obtenidos con luz blanca y en la oscuridad.

El cambio sobre el contenido total de esteroides presentes en la biomasa, con el uso de los diodos, no tiene diferencias estadísticamente significativas, entre las longitudes de onda de emisión ensayadas (Figura 7-9) incluida la ausencia de luz, pero en todos los casos su proporción es menor que la obtenida con el control positivo.

Figura 7-9: Efecto de los elicitors sobre el contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt para el micelio de *P. djamor* cultivado empleando como FC salvado de trigo.

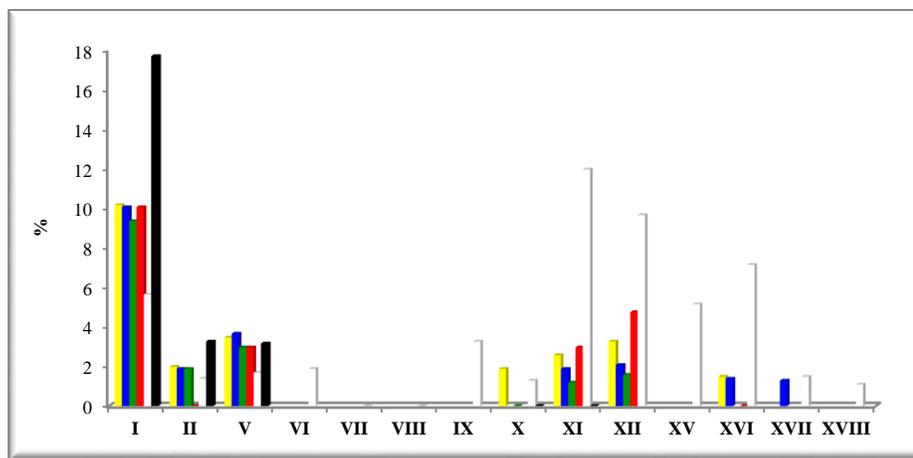


OC Oscuridad AM Amarillo AZ Azul BL Blanco RJ Rojo VR verde

Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la **a** a **b** basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

En lo que respecta a las variaciones en las estructuras (Figura 7-10), el núcleo estigmasta prevalece sobre el ergosta al emplear los LEDs, pero no hay un comportamiento generalizado con respecto al sustituyente en el C3, contrario a lo que ocurre con las especies restantes.

Figura 7-10: Influencia de los LEDs en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto en AcOEt del micelio de *P. djamor*.



I. Estigmast-5-en-3-ol
 II. Ergost-5-en-3-ol
 V. Estigmastanol
 VII. Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno
 IX. Ergosta 5,7,22-trien-3-ol
 XI. Estigmast-3-ona
 XV. Estigmast-4-en-3-ona
 XVII. Ergostan-4-en-3-ona
 VI. Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol
 VIII. Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno
 X. Ergosta-7,22-dien-3-ol
 XII. Estigmast-6-hidroxi-4-en-3-ona
 XVI. Ergostan-3-ona
 XVIII. Estigmast-4,22-dien-3-ona

Con relación al número de compuestos identificados se conserva la tendencia descrita hasta el momento, con una disminución en la producción de los triterpenoides con la elicitación por medio de los LEDs comparados con la luz blanca, con los triterpenoides **VI**, **VII** (cantidad no cuantificable), **VIII** (cantidad no cuantificable), **IX**, **XV** y **XVIII** determinados exclusivamente con ésta clase de luz. El estigmast-5-en-3-ol (**I**) continúa produciéndose en mayor proporción tanto con los LEDs como en la oscuridad comparado con la luz blanca, pero el aumento es menor.

En la tabla 7-6 están reunidos los resultados descritos en los numerales anteriores para las tres especies con los cuatro elicitores y los dos controles. De su análisis se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- a) Independientemente de la especie, el uso de los elicitores aumenta la producción de ácidos, de los constituyentes catalogados como otros y reduce la de esterés, presentes en los micelios;
- b) Si bien el aumento en la producción de ácidos grasos se puede ver como una ventaja, su incidencia real en el valor nutriceúutico no tiene un gran peso por que produce la disminución en la cantidad de esterés, que como se indicó anteriormente dentro del organismo humano cumplen las mismas funciones;
- c) En los caldos agotados el efecto sobre la excreción de ácidos, otros y ésteres cambia dependiendo de la especie;
- d) El porcentaje de esteróles calculado en los extractos en AcOEt de los micelios disminuye con todos los elicitores para las tres especies, sin evidenciarse aumentos en el número de estructuras determinadas, pero con la prevalencia del nucleo estigmasta en las tres especies y del -OH en el C3 en *P. ostreatus*;
- e) La excreción de triterpenoides hacia los caldos agotados es una singularidad dependiente de la especie y del elicitor empleado.

Tabla 7-6: Resumen del efecto de los diferentes LEDs empleados sobre la composición de los micelios y los caldos agotados para las tres especies de *Pleurotus*.

ESPECIE		ACIDOS		ESTERES		OTROS		TRITERPENOIDES	
		I	E	I	E	I	E	I	E
<i>P. ostreatus</i>		+	-	--	-	++	+	-	-
		+	+	--	++	++	-	--	-
		++	++	--	+	++	-	--	+
		++	+	-	+	+	+	-	+
		++	+	--	-	+	+	-	-
		-	-	+	-	-	-	+	-

I micelios E Medios agotados

Continuación tabla 7-6: Resumen del efecto de los diferentes LEDs empleados sobre la composición de los micelios y los caldos agotados para las tres especies de *Pleurotus*.

ESPECIE		ACIDOS		ESTERES		OTROS		TRITERPENOIDES	
		I	E	I	E	I	E	I	E
<i>P. djamor</i>		+	+	--	--	++	-	-	-
		+	++	-	++	++	--	--	+
		++	+	--	--	++	-	-	-
		-	+	--	-	+	--	-	-
		+	++	--	-	-	--	-	++
		-	-	+	+	-	+	++	-
<i>P. pulmonarius</i>		++	--	--	-	++	-	+	-
		++	-	--	-	++	+	-	+
		++	++	--	+	++	-	-	+
		++	++	--	+	++	-	-	+
		+	--	--	+	++	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	+	-

I micelios E Medios agotados

Los resultados hasta aquí mostrados confirman los reportes de literatura de los que se sabe que la respuesta de los organismos a un elicitor, es dependiente de la interacción entre los dos, de esta forma cada caso es particular y no se puede generalizar sobre el comportamiento tanto de las especies como de los elicitors empleados (388, 404). Tal es el caso de reportes como el de Babitha et. al en el 2008 en donde se indica que al emplear luz de diferentes colores, obtenidos cubriendo los erlenmeyers del cultivo con papel seda del color deseado e irradiando el cultivo con un bombillo convencional, no hay un aumento en la producción de los pigmentos característicos del hongo *Monascus purpureus* con respecto al control, pero se demostró un aumento al realizar el cultivo en la oscuridad con disminución en la producción de biomasa, particularidad a la que los autores no encuentran una explicación, debido a que va en contra del postulado del papel fotoprotector de los biopigmentos (401).

Otro reporte está enfocado en la actividad LiP y en el contenido de proteínas extracelulares, EPS y biomasa de *Phanerochaete chrysosporium*, en el que se encontró que la luz de diferentes longitudes de onda ejerce un efecto tanto supresor como estimulante dependiendo de la variable analizada, pero en general la luz verde tiene efectos positivos, la azul y la ultravioleta efectos negativos, rojo, amarillo y blanco tienen efectos mezclados (397), estudio que valida el comportamiento individual de cada organismo y de cada tipo de compuesto.

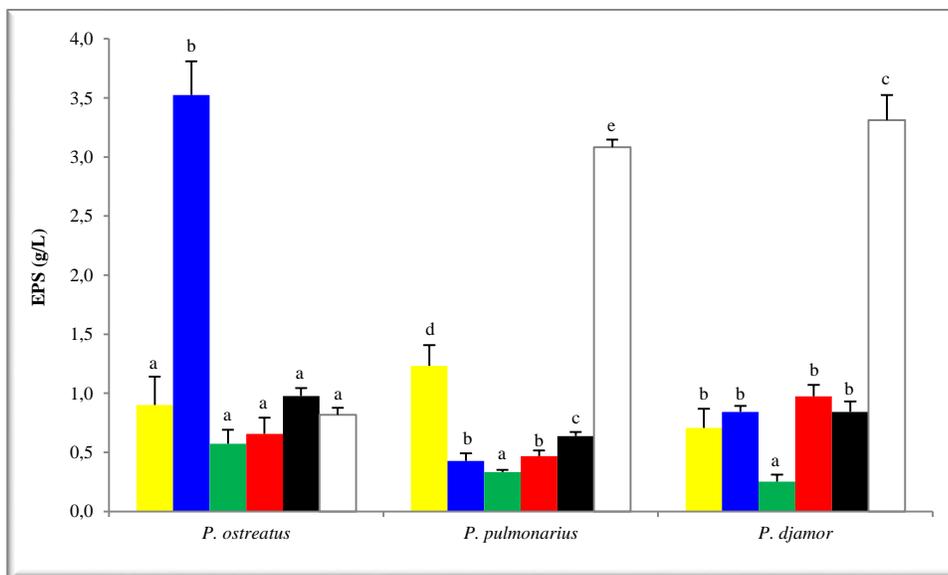
A pesar de que los LEDs, bajo las condiciones del proceso aplicado, no ejercieron un efecto positivo en la biosíntesis de los triterpenoides, se aumentó la producción de otros constituyentes como los

ácidos grasos y algunos heterocíclicos, así como el fenómeno de excreción de triterpenoides, resultados que mejoran el potencial nutriceúutico de los productos biotecnológicos de *Pleurotus* obtenidos por FEL con salvado de trigo como FC. Es este un primer paso para futuras investigaciones, en las que se contemplen conjuntamente otras variables del proceso biotecnológico que permitan activar la producción de triterpenoides, como el empleo de un tipo de fermentación diferente, que desencadene en respuestas como las reportadas para la levadura pigmentada *Rhodotorula glutinis*, usada en la producción de biodiesel, en la cual a pesar de no darse un impacto significativo de los LEDs sobre su crecimiento y el contenido lipídico, la unión de la irradiación con una fermentación de tipo alimentada y microfiltración, logró un aumento en la producción de biomasa desde 38,3 g/L a 72,4 g/L comparado con el control y un aumento del contenido lipídico del 51,2% (392).

7.3.4. LEDs y producción de EPS

En la figura 7-11 está la representación gráfica que relaciona la producción de EPS para las tres especies de *Pleurotus* con los cuatro LEDs empleados, comparados con el control positivo y la oscuridad.

Figura 7-11: Cambios en la producción de EPS con los diferentes LEDs para *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*.



Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a e basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

De su análisis se puede concluir que el efecto, al igual como se demostró con los anteriores componentes, es dependiente de la especie y del elicitor. Para el *P. osreatus* a excepción de la luz

azul, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de EPS como función de las diferentes longitudes de onda, incluyendo la luz blanca y la oscuridad. Entre tanto, la irradiación con una longitud de onda corta (azul) genera un aumento en la producción de este grupo de metabolitos equivalente a cuatro veces más del producido con la luz blanca. En el caso del *P. pulmonarius*, con ninguno de los elicitores se alcanza una producción similar a la obtenida con la luz blanca y por el contrario con el LED verde hay una reducción del 89%, mientras que entre el azul y rojo, sin diferencias significativas, la reducción es del 86% y con el LED amarillo se da el menor decrecimiento (60%). Para la especie *P. djamor* no se advierten aumentos en el contenido de EPS con ninguno de los elicitores, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades producidas con la longitud de onda amarilla, azul, roja y la oscuridad, pero sí un menor contenido con el empleo del LED verde. El comportamiento con este último dispositivo fue el mismo independiente de la especie.

Los resultados para las tres especies contrastan con el único reporte de literatura para el género, específicamente para la especie *P. eryngii*, en el que se menciona que con todas las longitudes de onda se aumenta el contenido de los bioactivos de interés comparado con la luz blanca y que la mayor producción de EPS fue de 0,425 g/L y 0,455 g/L obtenida al elicitar con luz verde y azul respectivamente. Este último comportamiento se observó con la especie *P. ostreatus* pero exclusivamente con el LED azul. De igual forma estos autores investigaron cuantitativamente la relación entre la longitud de onda de los elicitores, la biomasa en FEL y en FES, realizada esta última en caja de Petri, y la producción de EPS, observando una relación lineal positiva entre el crecimiento hifal en FES (cm/día) y el crecimiento micelial en FEL (mg/L/día) vs longitud de onda, así como una relación inversa entre la tasa de rendimiento de EPS y la longitud de onda. Estos resultados implican que un aumento en la longitud de onda conduce a un aumento en la producción de biomasa, pero disminución en la de EPS y argumentan que, como es conocido por la ecuación de Planck-Einstein, la luz con una corta longitud de onda contiene alta energía y que esta característica puede ser más perjudicial para el crecimiento de biomasa del *P. eryngii*, sometiéndolo a altas condiciones de estrés, en las que es conocido que los organismos excretan EPS para protegerse de las condiciones adversas del medio ambiente. Por esto dedujeron que el fenómeno es un sistema de defensa para protección del micelio, lo que concuerda con que la menor producción de EPS se obtuvo bajo la oscuridad con la mayor producción de biomasa (409). Esta relación no es extrapolable ni al comportamiento observado para las especies empleadas en nuestro estudio, ni al reportado para el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (397), en el que los autores encontraron que no hay una relación directa entre la producción de EPS y la longitud de onda del elicitor, y por el contrario

con una longitud de onda corta se genera la cantidad más baja de los bioactivos. Las diferencias en los comportamientos de estos dos géneros, aportan más evidencia de que la producción de los metabolitos es especie y género dependiente.

Las tres especies de *Pleurotus* aquí estudiadas tienen habilidades diferentes para “distinguir” entre las longitudes de onda de los elicitores, el *P. ostreatus* no discrimina entre las longitudes de onda moderadas, largas, la luz blanca y la oscuridad pero si la onda corta (azul). Le sigue con una mayor habilidad el *P. djamor* que presenta una respuesta similar entre amarillo, azul, rojo y oscuridad, pero diferente con el LED verde y con la luz blanca. El *P. pulmonarius* es de las tres especies la que exhibe una diferenciación más particular entre los elicitores, con respuestas similares entre dos longitudes de onda completamente diferentes como son las correspondientes al azul y al rojo, pero diferencia entre la luz blanca, la oscuridad y una λ intermedia (amarilla). De igual manera estos resultados plantean la probabilidad de la presencia de diferentes fotoreceptores en cada uno de las especies, que a su vez contribuyen a una amplia variedad de respuestas y por ende aumentan las posibilidades de encontrar variaciones estructurales de los metabolitos biosintetizados por el uso de este grupo de elicitores.

Los resultados presentados en este capítulo se pueden complementar con estudios relacionados con la influencia sobre la producción de biomasa y los patrones de desarrollo del micelio en FEL, las características del crecimiento hifal en cajas de Petri, la distribución de los pesos presentes en los EPS y de la proporción de β -1,3-1,6-glucanos, componentes con reconocidas bioacciones presentes en los basidiomicetos (59, 425, 426), así como el seguimiento de la biosíntesis durante la fermentación, no solo de los EPS, sino de todos los componentes que fueron determinados en este capítulo, debido a que en previos trabajos se ha encontrado que con el uso de los LEDs se afectan las cinéticas tanto de crecimiento y de actividad de ciertas enzimas (397), como de las reacciones biosintéticas para la producción de metabolitos primarios y secundarios propios del reino fungi (408).

De igual forma, las diferencias que la elicitación con LEDs produce, pueden deberse a alteraciones en las respuestas genéticas, las cuales se pueden conocer mediante el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el control de las distintas respuestas a la luz en los receptores específicos para este género (410), tema en el que hasta el presente no se ha incursionado.

7.4. CONCLUSIONES

- No hay una correlación entre la longitud de onda de los diodos emisores de luz y la producción de los metabolitos de interés determinados en los productos biotecnológicos de las tres especies de *Pleurotus*.
- Se observaron algunas generalidades como el caso de que en los micelios de las tres especies el uso de los elicitores aumenta el contenido de ácidos grasos, de los agrupados como otros y reduce la producción de esteroides y triterpenoides.
- La incidencia de los elicitores sobre la composición de los caldos agotados, incluyendo los EPS, es especie dependiente.
- En lo referente a variaciones estructurales, exclusivamente en lo relacionado con los triterpenoides, se evidenciaron diferencias entre los componentes determinados en la biomasa obtenida con el empleo de LEDs y el control positivo, resaltando el predominio del núcleo estigmasta sobre el ergosta.
- Con el uso de los dispositivos emisores de luz se manifestaron procesos de excreción de los triterpenoides estigmast-5-en-3-ol y estigmast-4-en-3-ona, en las tres especies pero variando tanto la longitud de onda del elicitor que causa la respuesta, como la proporción en la que estos se encuentran en cada una de los caldos.
- De acuerdo con la respuesta presentada a la elicitación posiblemente las especies de *Pleurotus* estudiadas contienen fotorreceptores diferentes.

**CAPITULO 8. FES vs FEL: ESTUDIO DE LA
APLICABILIDAD DEL PRODUCTO
OBTENIDO POR FEL COMO INÓCULO PARA
FES Y SUS EFECTOS SOBRE EL POTENCIAL
NUTRICEÚTICO DEL PRODUCTO FINAL**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
CCC	Cromatografía en columna clásica
CCD	Cromatografía en capa delgada
DOP	Octilato de octilo
EB	Eficiencia biológica
ESET	Estereato de etilo
EST	Ácido esteárico
FC	Fuente de carbono
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
FN	Fuente de nitrógeno
IL	Inóculo líquido
LB	Liebermann-Burchard
LIET	Linoleato de etilo
LIME	Linoleato de metilo
LIN	Ácido linoleico
OLET	Oleato de etilo
OLME	Oleato de metilo
PAET	Palmitato de etilo
PAL	Ácido palmítico
PC	Proporción de contaminación
SMG	Semilla grano
TC	Tiempo de colonización
TP	Tasa de producción

8.1. ANTECEDENTES

De los resultados arrojados hasta este punto de la investigación, relacionados con la incidencia de una serie de factores inherentes a la producción biotecnológica de tres especies de *Pleurotus* como son el empleo de FC no convencionales, diferentes pH en la fermentación y el uso de elicitores, se han observado importantes correlaciones entre las variables antes mencionadas y la composición del producto biotecnológico (biomasa micelial-medio de cultivo agotado) y por ende en el potencial nutriceútico de los hongos, lo que proporciona un punto de partida para aquellos investigadores interesados en la obtención de alimentos funcionales, suplementos dietarios o producción de bioactivos, con base en procesos biotecnológicos. Sin embargo, se presenta también otra cuestión de interés tanto para la biotecnología como para las otras áreas que están involucradas en el estudio de los productos naturales y en su bioprospección, como es el evaluar la forma en la que el tipo de fermentación puede afectar el producto obtenido, bien sea desde el punto de vista de su composición, las bioacciones ejercidas por sus metabolitos, la actividad enzimática y/o la eficiencia del proceso en términos de generación de biomasa, entre otros. Es así como en esta última parte del presente estudio se abordó dicha problemática mediante la evaluación de dos tópicos: 1) La aplicabilidad del empleo del producto de la FEL como inóculo para obtener fructificaciones por FES, mediante el análisis de los diferentes parámetros que catalogan a este tipo de técnicas como eficientes; y 2) La variación en la composición del micelio obtenido por FEL comparada con las fructificaciones producidas a través de FES.

8.1.1. FES vs FEL: una comparación entre las dos técnicas

Como se mencionó en el capítulo 1, estos tipos de procesos básicamente difieren en el estado del sustrato. En la FEL los sustratos son líquidos, los componentes son preferiblemente solubles en agua, cuyo porcentaje es mayor del 80%, o se encuentran en suspensión (lo que proporciona condiciones limpias de cultivo) y son adicionados en concentraciones conocidas, mientras que en la FES el proceso ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles. En la tabla 8-1 se presenta un cuadro comparativo entre las ventajas y las desventajas de cada una de estas técnicas. Como se puede concluir del análisis de esta tabla, cada uno de los tipos de fermentación tiene tanto características positivas como negativas y la elección del empleo de uno u otro proceso, depende más del objetivo que se persigue. La FEL se aplica cuando lo que se busca es la generación de micelio, de un bioactivo

o grupo de bioactivos específicos, en el caso de las FES su principal producto son las fructificaciones generalmente utilizadas con fines comerciales como alimento.

Tabla 8-1: Comparación entre FEL y FES (37, 427).

FES		FEL	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Amplio desarrollado en países orientales	Dificultad de garantizar la calidad y homogeneidad permanente de las fuentes de materias primas	Obtención de biomasa y bioactivos se realiza bajo condiciones limpias	Complejidad de los medios de cultivo
Bajos costos	Procesos de asepsia bastante tediosos	Materias primas de alta calidad (control fitosanitario e inocuidad certificadas)	Generación de cantidades apreciables de efluentes líquidos
Reducción del volumen del reactor por unidad de sustrato convertido	Imposibilidad de automatización y escalamiento del proceso	Reducción del tiempo de obtención de biomasa	
Uso directo del producto fermentado (sustrato) rico en proteína como alimento animal	Registro complejo del pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos	Producción independiente de factores ambientales	
Facilidad de utilizar residuos agroindustriales			
Mínimo consumo de agua y baja producción de efluentes líquidos			

En lo referente a los reportes de estudios comparativos de la FES con respecto a la FEL en hongos, están enfocados hacia la producción de cierto tipo de metabolitos y de enzimas. Cuando crecen en sustratos sólidos, algunas especies pertenecientes a este reino han mostrado un espectro notablemente alterado de los metabolitos secundarios, como en el caso de los *Streptomicetos*, en los que la biosíntesis de metabolitos secundarios parece estar asociada a la formación de hifas aéreas y la producción de esporas en la fase estacionaria de crecimiento, incluso varios metabolitos secundarios se producen solamente durante el crecimiento en sustratos sólidos, aunque los hongos en cuestión pueden ser cultivados en procesos sumergidos (289). En la tabla 8-2 se recopilan algunos de los estudios relacionados con la comparación de los dos procesos, así como el objetivo que se perseguía y el resultado encontrado por los autores. De los datos allí consignados se puede observar que no hay una generalidad con respecto a la eficiencia de un tipo de cultivo sobre otro, cada caso es particular y dependiente de diferentes factores dentro de los que se incluyen el género, la especie, el tipo de metabolito o de producto esperado, la composición del sustrato y por ende de las diferentes variables que, como se describió en capítulos anteriores, afectan los procesos fermentativos.

Tabla 8-2: Comparación de los procesos de FES y FEL para la obtención de productos de interés comercial y/o farmacéutico en hongos.

ESPECIE	OBJETIVO DEL ESTUDIO	OBSERVACIÓN	REF.
<i>Aspergillus niger</i>	Evaluar la cinética de la producción de enzimas	Menor efectividad por FES	(428)
<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de biosurfactantes	No hay diferencias en su composición ni cualitativa ni cuantitativamente por FES y FEL	(429)
<i>Panus tigrinus</i>	Producción de lacasa y manganeso peroxidasa extracelulares	La FES es más adecuada que la FEL	(427, 430)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Producción de ácido dipicolínico y ácido oxálico, comparación de la cinética de la fermentación y la distribución de carbón	En FES el carbón fue utilizado en su mayoría para la producción de biomasa, FEL se dirigió a la síntesis de los ácidos y de otros compuestos	(431)
<i>Taiwanofungus camphoratus</i>	Estudio de los extractos de una especie nativa y dos tipos de cepas cultivadas, por FES y FEL, evaluando sus efectos antiinflamatorios y su rol en la protección contra enfermedades neurodegenerativas	Extractos metanólicos de las especies nativas, son más potentes inhibidores, seguidos por el producto de la fermentación en estado sólido y finalmente en estado líquido	(432)
<i>Antrodia camphorata</i>	Evaluación de actividad antioxidante, contenido fenólico y de polisacáridos entre micelio, caldo agotado y fructificaciones	Mayor actividad y presencia de los bioactivos en los productos de la FEL	(371)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Actividad antimicrobiana y antineoplásica de extractos de micelio y fructificaciones frescas y deshidratadas	Micelio más efectivo contra <i>Bacillus</i> y las fructificaciones contra <i>Candida</i>	(76)
<i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus dryinus</i> , <i>ostreatus</i> y <i>tuber regium</i>	Habilidad para producir enzimas lignocelulosicas por FES y FEL en diferentes residuos de plantas	FES favorable para la producción de lacasas y MnP, mientras que FEL es mejor para la producción de enzimas hidrolíticas	(50)
<i>Monascus purpureus</i>	Concentración de esteroides, obtención de biomasa y estatinas	Mayor contenido de los esteroides y de estatinas en FEL y de biomasa en FES	(143)
<i>Tuber melanosporum</i> , <i>T. sinense</i> y <i>T. indicum</i>	Perfil de los esteroides presentes en el micelio y en su fructificación	Contenido de ergosterol mayor en el micelio que en la fructificación, pero tanto el tipo como el contenido de fitoesteroides en el micelio fue inferior al de los cuerpos fructíferos	(152)

Continuación tabla 8-2: Comparación de los procesos de FES y FEL para la obtención de productos de interés comercial y/o farmacéutico en hongos.

ESPECIE	OBJETIVO DEL ESTUDIO	OBSERVACIÓN	REF.
Micelios cultivados: <i>Tuber melanosporum</i> , <i>T. sinense</i> , <i>T. indicum</i> y <i>T. aestivum</i> . Fructificaciones: <i>T. aestivum</i> , <i>T. indicum</i> , <i>T. himalayense</i> y <i>T. borchii</i> var. <i>Sphaerospermum</i> .	Perfil lipídico	Mayor contenido lipídico en micelios. El micelio contiene más ácidos grasos saturados de C14 a C17 y la fructificación más de C18 a C22. Perfiles de los micelios muy parecido entre especies mientras que para las fructificaciones hay diferencias importantes.	(433)
<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Antrodia salmonea</i>	Contenido de lovastatina, ácido γ -aminobutírico (GABA) y ergotionina en micelios y fructificaciones	El contenido de los metabolitos varía entre los géneros, no se puede generalizar entre micelio y fructificaciones	(434)
<i>Cordyceps militaris</i>	Actividad antiinflamatoria y antiangiogénica en micelio y cuerpo fructífero	Efectiva actividad independiente del extracto ensayado	(435)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Contenidos de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y actividad antioxidante en micelio y fructificación	Demostraron que el micelio obtenido por FEL puede ser al igual que la fructificación una fuente valiosa de compuestos antioxidantes	(436)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Comparar los extractos de polisacáridos presentes en micelio y en fructificaciones	Ambos tienen una masa molecular relativamente alta: α -glucano en micelio, en fructificación mezcla de α y β glucanos. Ambos ejercen un efecto directo antiproliferativo sobre las células de cáncer	(75)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Contenido de nitrógeno, proteína, glicógeno, lípidos, RNA, cenizas aminoácidos y glucosa	El contenido de los primeros seis es similar, micelio altos niveles de ácido aspártico, cisteína, fenilalanina y leucina; fructificación tiene más valina e isoleucina. El micelio tiene más ácidos grasos saturados que la fructificación.	(437)
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>ostreatus</i> y <i>pulmonarius</i>	Estudio de la producción de enzimas con diferentes FC y FN	Altos niveles de actividad de peroxidasa en <i>ostreatus</i> y <i>pulmonarius</i> por FES en aserrín de vid, en FEL esta actividad es muy baja o nula	(77)

8.1.2. Técnicas de inoculación empleadas para la obtención de fructificaciones

En el transcurso de los últimos años se han implementado diferentes formas de fungicultura, en las que el objetivo principal es la obtención de cuerpos fructíferos en una cantidad tal que permita su comercialización frescos o deshidratados. La forma de producción más generalizada para tal fin es sobre sustratos sólidos, proceso que comprende distintas etapas que van desde la elección de la cepa adecuada, selección y acondicionamiento del sustrato, inoculación, incubación y posterior cosecha (8). El inóculo utilizado comúnmente para el cultivo de hongos comestibles, conocido popularmente como “semilla”, se obtiene con la reproducción masiva del micelio en granos de diferentes gramíneas (SMG), que son utilizados como vectores para la dispersión del mismo en el sustrato final de cultivo y, que en el caso de *Pleurotus* spp., se prepara comercialmente sobre granos de sorgo, mijo, trigo u otros materiales de fácil acceso (438). Sin embargo, se ha reportado que la preparación de estos granos de semilla toma largos periodos de tiempo, conllevando a altos riesgos de contaminación. El éxito de la producción de hongos depende en gran parte de la calidad de la semilla, que a su vez corresponde a uno de los insumos más costosos del proceso del cultivo tradicional (55), el cual a su vez se puede asimilar a una fermentación en estado sólido.

El hecho de que hoy en día, con la finalidad de la obtención de biomasa micelial y compuestos bioactivos, de manera más eficiente y en menor tiempo mediante FEL (4), se emplee la biotecnología permitió explorar el empleo de la biomasa obtenida biotecnológicamente como inóculo en FES.

El inóculo líquido (IL) se ha planteado como una opción para reducir los costos y el tiempo de duración del ciclo de producción, así como aumentar el control del proceso, las condiciones asépticas, la automatización cuando se realiza el cultivo en una planta de producción y la uniformidad en la distribución del inóculo en el sustrato. Es una técnica más sencilla si se compara con la SMG y que puede ser usada tanto para la proliferación micelial más rápida en la producción de semilla, como para la inoculación directa del sustrato (439, 440).

Con respecto al empleo de IL para el cultivo de *Pleurotus*, Abdullah et. al en el 2013 en un estudio cuyo objetivo fue producir biomasa micelial de la especie *P. pulmonarius* a gran escala en biorreactor usando un medio compuesto de azúcar café (2%), salvado de arroz (0,4%), malta (4%) y levadura (0,4%), bajo condiciones controladas, evaluaron la eficiencia del IL así obtenido, para la producción de fructificaciones comparados con SMG, encontraron que la colonización fue más rápida empleando IL (7,7 mm/día) que con la SMG (5,2 mm/día), con un tiempo total para la colonización de toda la bolsa de 30 y 40 días respectivamente. De igual forma, el promedio total de peso fresco y

por ende la eficiencia biológica utilizando IL exhibieron aumentos del 50,1% y el 29,8% para cada caso (440).

En este capítulo se evaluó el efecto del empleo del producto de la FEL (micelio y caldo agotado), como inóculo para obtener fructificaciones de las tres especies del género *Pleurotus*, así como, estudiar la incidencia que tiene el tipo de fermentación sobre la composición de la biomasa generada y por ende en su potencial valor como nutriceútico.

8.2. METODOLOGÍA

8.2.1. Obtención del inóculo líquido

Los productos biotecnológicos de las tres especies se obtuvieron como se describió en el numeral 1.2.1. empleando como FC salvado de trigo a un pH inicial de 5,6.

8.2.2. Fermentación en estado sólido

Para la producción de las fructificaciones se utilizó como sustrato una mezcla compuesta por 66% de aserrín, 33% de salvado y 1% de CaCO_3 , previamente hidratada por inmersión en agua hasta alcanzar una humedad aproximada del 45%, empacada en bolsas de polietileno transparentes (700 g de sustrato /bolsa) que posteriormente se esterilizaron en autoclave.

La inoculación se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar colocando 70 ml del producto de la FEL (micelio y medio de cultivo) en cada bolsa. Se realizaron dos ensayos uno con inóculo fresco y otro con el mantenido en refrigeración durante 7 días, con la finalidad de evaluar el efecto que produce el uso de temperaturas bajas, durante un lapso de tiempo determinado, como una forma de preservación.

La incubación se realizó en condiciones de oscuridad, monitoreando los sustratos diariamente y descartando los que se encontraban contaminados. En el momento en que se observó la colonización total, se pasó al área de fructificación, retirando las bolsas que cubrían el sustrato. Los hongos se cosecharon en su estado adulto, cuando el píleo estuvo totalmente extendido. Los parámetros a evaluar fueron la eficiencia biológica (EB) en base húmeda, la tasa de producción (TP) calculada dividiendo la EB entre el ciclo de cultivo, considerándose éste desde el primer día de incubación del hongo en el sustrato hasta el último día de cosecha, el tiempo de colonización (TC) y la proporción de contaminación (PC). Los datos experimentales de la EB, TP y TC fueron sujetos a un análisis multivariante con el programa Statgraphics 5.1, con base en los resultados de los triplicados realizados para cada caso.

8.2.3. Obtención y análisis de la composición de los extractos

Las fructificaciones frescas obtenidas de la FES y el sustrato agotado, fueron extraídos y la determinación de su composición determinada siguiendo la metodología descrita en los numerales 2.2.3 y 2.2.4 respectivamente. Estos resultados se compararon con los previamente encontrados para los micelios de las tres especies, obtenidos con salvado de trigo, que fueron analizados y discutidos en el capítulo 2.

El fraccionamiento por grupos de polaridad de los extractos tanto del micelio como de las fructificaciones de *P. djamor*, se realizó mediante CCC y CC Flash en columnas con Sílica Gel Macherey-Nagel ® (0.063 y 0.200 mm de diámetro de partícula para CCC y 0,04-0,063 mm para CC Flash) con modos de elución en gradiente y empacadas en suspensión con el solvente menos polar dependiendo del sistema de elución seleccionado. Las CCD fueron realizadas en cromatofolios Al de Sílica gel 60F₂₅₄ Merck® (0.040 y 0.060 mm de diámetro de partícula). Para identificar los esteroides se utilizó una solución de ZnCl₂ al 30% en metanol que fue asperjada sobre las placas produciendo coloraciones azules y verdes como resultado positivo. El comportamiento cromatográfico de este tipo de compuestos, se comparó, durante todos los chequeos realizados, con un patrón de ergosterol.

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Producto de la FEL como inóculo líquido para FES

La aplicabilidad de un determinado proceso para la obtención de fructificaciones empleando procesos fermentativos, está determinada tanto por la eficiencia biológica como por la eficacia de la técnica de cultivo y de aquellas variables propias que permiten optimizarlo, dentro de las que se cuentan la EB, TP, TC y PC. Las especies pertenecientes al género *Pleurotus* se caracterizan por ser los hongos que emplean el mayor número de sustratos para su cultivo, debido al gran espectro enzimático que poseen y que les permite degradar los componentes de casi cualquier material que pretenda ser empleado para su obtención. Como consecuencia de esta facilidad de cultivo el número de investigaciones relacionadas con el estudio de las diferentes variables implicadas en el proceso, ha aumentado en forma exponencial.

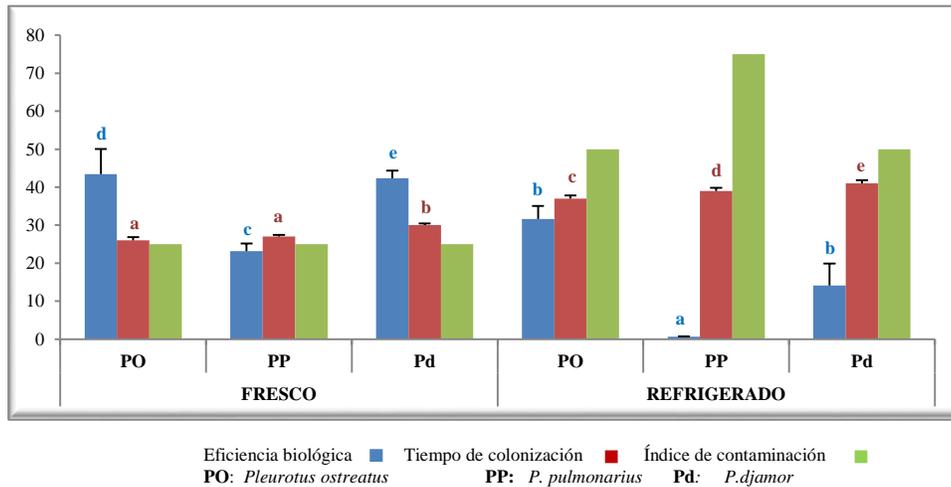
En esta fase final se planteó el estudio de la incidencia que sobre la obtención de fructificaciones de *Pleurotus*, presenta el utilizar como IL el producto biotecnológico de FEL, en busca de una herramienta que mejore la eficiencia del proceso. En la figura 8-1 se encuentran las fotos de los cuerpos fructíferos para las tres especies cultivadas con esta metodología y en la figura 8-2 se aprecian comparativamente los diferentes parámetros calculados usando el inóculo fresco y

refrigerado. Su análisis permitió concluir que con el empleo de IL se obtuvieron valores de EB entre el 0,69% y el 43,47% dependiendo de la especie cultivada, con evidentes reducciones al usar los inóculos refrigerados. Independiente del método de conservación del inóculo, el *P. ostreatus* presentó una mayor EB, seguido por el *P. djamor* y finalmente la especie *P. pulmonarius*. En investigaciones sobre este campo se encuentran reportados rangos amplios para esta variable (25-250%) dado que la EB es afectada por diferentes condiciones dentro de las que se enumeran el estado de madurez en el que se cosechan los cuerpos fructíferos, el sustrato, la especie y la proporción de inóculo empleada (8).

Figura 8-1: Fructificaciones de *Pleurotus djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* obtenidas empleando inóculo líquido.



Figura 8-2: Parámetros evaluados para el cultivo de los *Pleurotus* empleando el producto de la FEL fresco y refrigerado, como inóculo para FES.



Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a e basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

La tabla 8-3 recopila los resultados, en términos de EB, de las investigaciones en las que se ha utilizado IL para el cultivo de *Pleurotus*. Como se puede apreciar la mayoría de los reportes lo han empleado para la producción de semilla, por el método de invasión del micelio sobre un grano de cereal, un proceso asimilable a FES lo que permite, en cierta medida, la comparación con los resultados obtenidos en este aparte. En los dos reportes relacionados con el empleo de IL para *Pleurotus*, los autores utilizaron, en contraste con el presente trabajo, únicamente la biomasa suspendida en una solución salina, desechando el medio de cultivo, el cual contiene compuestos de gran importancia tanto química como farmacológica, como se ha demostrado a lo largo de este estudio lo que podría aumentar, al emplear el producto biotecnológico total, el carácter nutriceútico de las fructificaciones obtenidas bien sea por incorporación o por degradación de dichos compuestos. Si bien en nuestro estudio la inoculación con el producto de la FEL en fresco, arrojó resultados de EB que están dentro de los reportes de literatura, estos datos permiten una comparación relativa más no absoluta debido a que el sustrato empleado no es equivalente en composición a los utilizados por los autores antes citados. Aunado a esto hay un ahorro en el tiempo total del cultivo debido a que se elimina el periodo de colonización de los granos de cereal que generalmente fluctúa entre 15 y 30 días (441, 442), permitiendo ver cómo el empleo del producto de la FEL como inóculo, reduce esta etapa a 9 días y abre una puerta para futuras investigaciones con miras a la optimización del proceso, introduciendo modificaciones en otras variables que afectan las FEL como son tamaño de partícula,

humedad inicial, el pH y el pre tratamiento del sustrato), humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad, tamaño y proporción del inóculo, entre otros.

Tabla 8-3: Reportes en literatura de la eficiencia biológica para el cultivo de *Pleurotus* empleando inóculo líquido.

ESPECIE	INÓCULO	OBJETIVO	EFICIENCIA BIOLÓGICA	SUSTRATO	REF.
<i>Ostreatoroseus</i>	Producto de FEL ^a y FES	Obtención de semilla	NR	Residuos de algodón	(442)
<i>Ostreatus</i>	Biomasa obtenida por FEL suspendida en solución salina y producto de FES	Obtención de fructificaciones	66 - 82% IS ^b 50 - 67% IL	Paja de plátano, salvado de arroz	(439)
<i>spp.</i>	Producto de FEL ^a y FES	Obtención de semilla	IS 3,74% ^c IL 3,43%	NR	(443)
<i>Ostreatus</i>	Producto de FEL ^a	Obtención de semilla	NR	Paja de trigo	(441)
<i>Spp</i>	Producto de FEL ^a y FES	Obtención de semilla	IS 33,2% IL 23,59%	Paja de trigo	(444)
<i>Florida Eger</i>	Producto de FEL ^a	Obtención de semilla	25 - 250% ^d	Salvado de trigo y bagazo y enmiendas de los efluentes de destilerías	(445)
<i>Pulmonarius (Fries) Quelet</i>	Producto de FEL ^a	Obtención de semilla	36 - 120% ^d	Salvado de trigo y bagazo y enmiendas de los efluentes de destilerías	(445)
<i>Sajor-caju (Fries)</i>	Producto de FEL ^a	Obtención de semilla	25 - 140% ^d	Salvado de trigo y bagazo y enmiendas de los efluentes de destilerías	(445)
<i>Pulmonarius (Fr.) Quéil</i>	Biomasa obtenida por FEL en bioreactor suspendida en agua	Obtención de fructificaciones	65,48%	Aserrín, salvado de arroz y CaCO ₃	(440)

^a Corresponde con la mezcla de biomasa y medio agotado

^c Datos obtenidos con la 1^{ra} cosecha sólido

^b Rango dependiente del % de inóculo empleado

^d Rango dependiente del % de efluente y del sustrato IS: Inóculo sólido
IL: Inóculo líquido

En cuanto al tiempo de colonización, que debe ser el menor posible tanto para evitar la presencia de contaminación como para favorecer económicamente el proceso, varía entre 26 y 37 días para *P. ostreatus*, 27 y 39 días para *P. pulmonarius* y 30 y 41 días para *P. djamor*, empleando inóculo fresco y refrigerado respectivamente, lo que pone de manifiesto que cuando se emplea inóculo fresco el tiempo de colonización se reduce en porcentajes de 29,7%, 30,7% y 26,7% respectivamente. La colonización es más rápida para *ostreatus*, seguida por *pulmonarius* y finalmente *djamor* (Figura 8-2), tendencia no concordante con lo reportado por Salmones et al en el 2005, quienes compararon la productividad de las tres cepas en dos sustratos, estableciendo un comportamiento en términos del tiempo de colonización de *P. djamor* > *P. ostreatus* > *P. pulmonarius*, con la diferencia de que ellos emplearon la técnica convencional de inoculación tanto para obtención de la semilla como para la

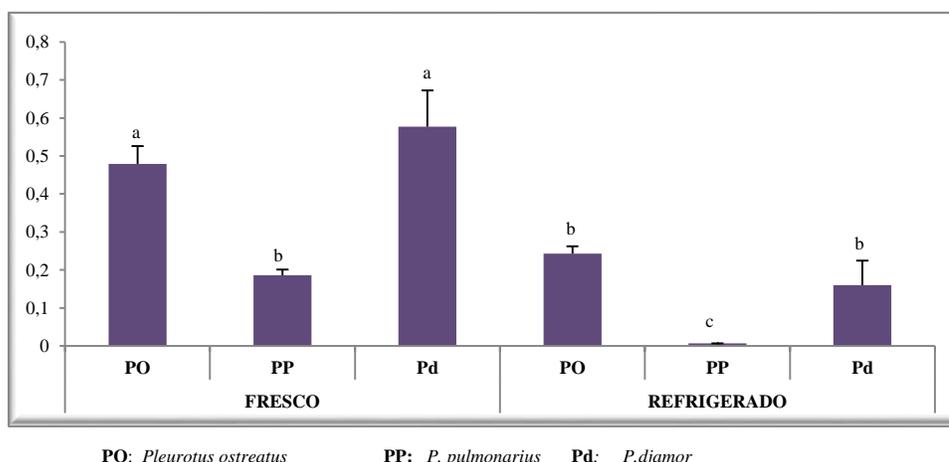
de las fructificaciones. Con respecto al IL fresco, el *P. djamor* al igual que en el reporte de Salmones, toma el mayor tiempo de colonización, sin embargo para el caso del *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellos. De igual forma como ocurre con la EB hacer una correlación absoluta de los datos obtenidos con los reportes de literatura, no es viable tanto por la fluctuación en los resultados reportados en literatura, como por lo novedoso de la técnica empleada en esta investigación. Sin embargo, los valores encontrados son aceptables y, al igual que en el caso anterior, se pueden aplicar estrategias como el aumento de la proporción de inóculo y de la humedad del sustrato (8), con el objetivo de reducir los tiempos de colonización.

Uno de los problemas más críticos en el cultivo comercial de *Pleurotus* es la presencia de mohos antagonistas, los cuales avanzan rápidamente durante la colonización del sustrato, produciendo metabolitos que limitan o anulan el desarrollo del hongo objetivo. Tal es el caso de las especies del género *Trichoderma* que tienen la capacidad de producir sustancias antifúngicas y enzimas micolíticas que favorecen la rápida invasión del sustrato y evitan el crecimiento de otros microorganismos (438). En la literatura se sabe que las cepas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* tienen mayor resistencia a los contaminantes, entre tanto la *P. djamor* presenta los porcentajes más bajos de resistencia a la presencia de los mohos antagonistas (446).

En este aspecto, el presente trabajo puso de manifiesto que el mecanismo de preservación del inóculo afecta la proporción de contaminación de los sustratos, generando valores del 25% para las tres especies con el inóculo fresco en contraste con el 50% para *P. ostreatus* y *P. djamor* y el 75% para *P. pulmonarius* empleando el inóculo refrigerado (Figura 8-2), lo que se refleja en reducciones del 50% para las primeras especies mencionadas y del 66% para *pulmonarius* con el inóculo fresco. Estos resultados no concuerdan con los reportes de Salmones y Mata, sin embargo, las diferencias se pueden atribuir bien al tipo de sustratos empleados, que para el caso de los investigadores mencionados está compuesto por pulpa de café, o a la técnica de inoculación. Con el objetivo de tener un punto de comparación en cuanto al tipo de inóculo empleado se realizó la inoculación paralelamente con semilla de *P. ostreatus* en granos de trigo y cebada y el inoculo líquido obtenido de la FEL, sin embargo durante el periodo de incubación se observó que las bolsas con el uso de SMG se contaminaron. Este comportamiento es lo esperado debido a que al emplear este tipo de inóculo la colonización es más lenta comparado con un IL, aumentando las posibilidades de que otros microorganismos estén presentes. Aunado a esto, como es bien sabido, en los granos de los cereales utilizados para hacer las semillas, las esporas fúngicas albergadas en ellos, de otros organismos ajenos al objetivo, no son destruidas durante la esterilización por la estructura compacta de los mismos, facilitando su crecimiento y posterior competición con el micelio en el sustrato para la fructificación (440). La TP calculada como la relación entre EB y el tiempo transcurrido desde la

inoculación hasta la última cosecha, fue de 0,479 y 0,243 para *ostreatus*, 0,577 y 0,162 para *djamor* y 0,186 y 0,007 para *pulmonarius*, utilizando inóculo fresco y refrigerado respectivamente (Figura 8-3). Como se observa en estos resultados hay una reducción de la TP para las tres especies al emplear el inóculo refrigerado, la que fluctúa entre 49,27% y 96,24%. Por reportes de literatura se han establecido para *P. djamor* valores entre 0,34% a 1,68%, de 0,48% a 1,38% para *P. ostreatus* y de 0,31% a 1,3% para *P. pulmonarius* utilizando paja de cebada como sustrato (447), por lo que podemos concluir que los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con los reportes de literatura, sugiriendo que la metodología propuesta es promisoriosa.

Figura 8-3: Tasa de producción calculada para el cultivo de los *Pleurotus* empleando el producto de la FEL fresco y refrigerado como inóculo para FES.



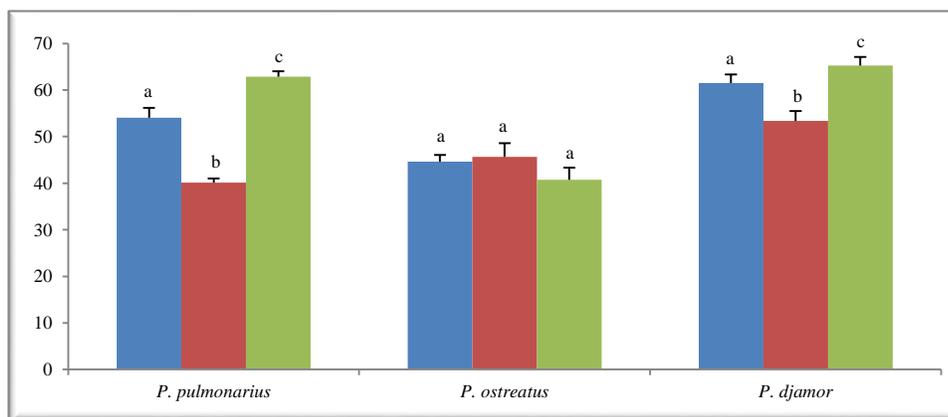
Todo lo anteriormente expuesto lleva a inferir que el empleo del producto de la FEL como inóculo líquido se puede posicionar como una técnica con gran potencial para obtener fructificaciones mediante FES, con EB, TP, tiempo de colonización y contaminación dentro del rango de los reportados en literatura. Así mismo, cuando se requiere obtener una mayor EB y TP y reducir el TC, así como un menor índice de contaminación, se hace necesario el uso del inóculo fresco.

8.3.2. FEL vs FES: relación entre el tipo de fermentación y la composición del producto final

Luego de determinar que el empleo del producto de la FEL como IL es una alternativa viable para la obtención de fructificaciones, se continuó con el estudio de la variación en la composición de la biomasa obtenida por los dos tipos de fermentación. Los compuestos triterpenoidales representan, independiente de la especie, la mayor proporción relativa dentro de los constituyentes de los extractos, tanto de los micelios como de las fructificaciones. En el Anexo 8A se encuentran los cromatogramas para todos los casos, en los que se manifiestan claras diferencias consecuencia del

tipo de proceso empleado para el cultivo. De manera genérica, los micelios de las tres especies presentan una composición más compleja sobresaliendo la cantidad de picos entre 30 y 40 min, t_R típicos de la elusión de los triterpenoides. Las figuras 8-4 y 8-5 representan gráficamente la influencia en el contenido total de esteroides por 100 g de los extractos y las estructuras determinadas en los mismos. Con respecto al total de los esteroides, este es mayor para los micelios en el caso de *P. pulmonarius* y *P. djamor*, seguido por las fructificaciones obtenidas con IL fresco y finalmente con IL refrigerado. En el caso del *P. ostreatus* no hay diferencias estadísticamente significativas en el contenido de los esteroides presentes en la biomasa obtenida por FEL o por FES, ni con el procedimiento de preservación del inóculo.

Figura 8-4: Contenido total de esteroides por 100g de los extractos en AcOEt de los micelios y las fructificaciones de *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*.

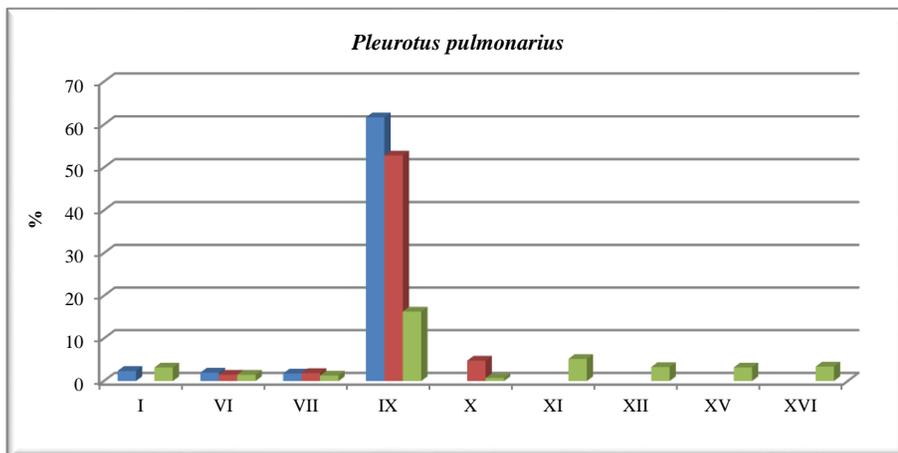
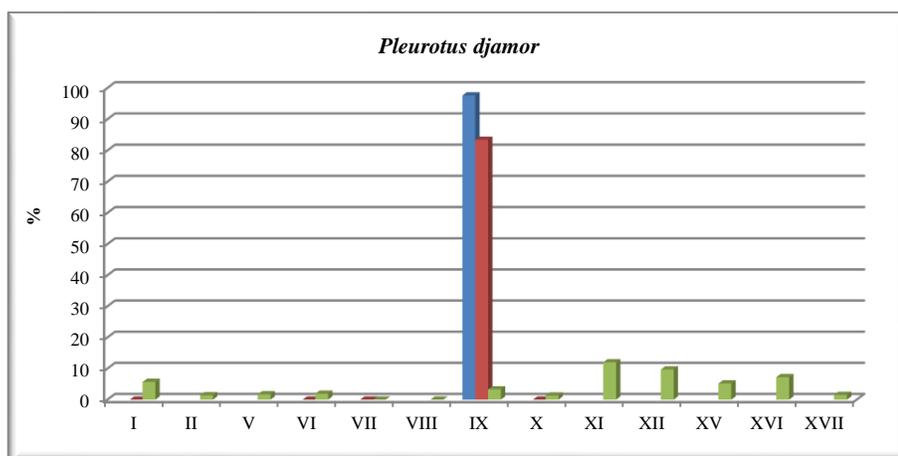
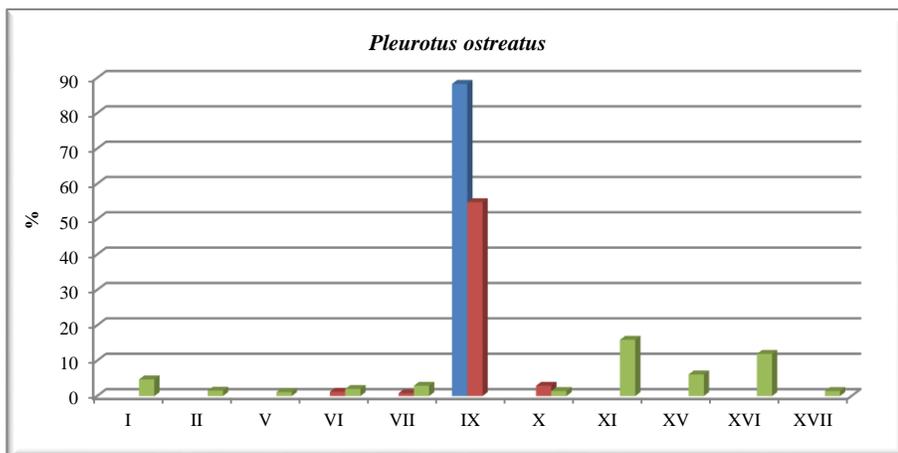


Mielios ■ Fructificaciones obtenidas con inóculo líquido fresco ■ Fructificaciones obtenidas con inóculo líquido refrigerado ■

Los resultados son dados después de comparaciones múltiples, los valores de las medias obtenidas de tres repeticiones, están seguidos por una letra de la a a la c basados en diferencias estadísticas. Si dos medias están acompañadas por la misma letra, no hay diferencias significativas entre sí, caso contrario ocurre con aquellas que tienen letras diferentes.

Relacionado con el número de estructuras determinadas en los micelios y en las fructificaciones, se encontraron claras diferencias, destacando una mayor cantidad en el primer tipo de biomasa, como se describió y se discutió a fondo en el capítulo 2. Con respecto a la composición de las fructificaciones obtenidas por FES para las tres especies de *Pleurotus*, independiente de la forma de preservación del IL, el esteroide mayoritario es el ergosta-5,7,22-trien-3-ol (ergosterol), presente en mayor proporción con el empleo del IL fresco (61,7% - 97,6%) comparado con el refrigerado (52,8% - 83,4%), conservándose la tendencia *P. djamor* > *P. ostreatus* > *P. pulmonarius*.

Figura 8-5: Influencia del tipo de fermentación en la composición porcentual de los triterpenoides del extracto del micelio y las fructificaciones para las tres especies de *Pleurotus*.



Micelios ■ Fructificaciones obtenidas con inóculo líquido fresco ■ Fructificaciones obtenidas con inóculo líquido refrigerado ■

I. Estigmast-5-en-3-ol
VI. Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol
IX. Ergosta-5,7,22-trien-3-ol
XII. Estigmast-6-hidroxi-4-en-3-ona
XVII. Ergost-4-en-3-ona

II. Ergost-5-en-3-ol
VII. Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno
X. Ergosta-7,22-dien-3-ol
XV. Estigmast-4-en-3-ona

V. Estigmastanol
VIII. Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno
XI. Estigmast-3-ona
XVI. Ergostan-3-ona

Los componentes triterpenoidales restantes, determinados en las fructificaciones, se encuentran en proporciones inferiores al 4% e incluso en cantidades no cuantificables y corresponden al: estigmast-5-en-3-ol (**I**), ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (**VI**), ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno (**VII**) y ergosta-7,22-dien-3-ol (**X**), algunos de ellos conocidos precursores biosintéticos del ergosterol (448). Los resultados muestran que el efecto del tipo de fermentación sobre la producción de los compuestos triterpenoidales, es más marcado sobre el número de estructuras de estos metabolitos, que sobre la cantidad total de los esteroides. Este comportamiento puede ser explicado si se considera a la FES como una simulación del hábitat natural del organismo y a la FEL como una “violación” a él, especialmente para hongos (449), sometiéndolos a altas condiciones de estrés que desencadenan en la estimulación de la maquinaria biosintética, conllevando a la producción, en este caso particular, de un número mayor de estructuras de los metabolitos secundarios triterpenoidales. La simulación de una FES al hábitat natural de los hongos, ha sido motivo de investigación en otros macromicetos como la *Antrodia camphorata* (*Taiwanofungus camphoratus*), en la que se estudió el efecto antiinflamatorio en células de la microglia y su posible papel en la protección contra enfermedades neurodegenerativas, tanto de una especie nativa como cultivada por FES y FEL, encontrando que el extracto metanólico de la nativa dio los mejores resultados seguido por el de FES y por último el de FEL. La fructificación obtenida por FES y la nativa tienen comportamientos muy similares y los autores mencionan que en estudios previos se ha demostrado la similitud de los perfiles por CLAE de los extractos metanólicos de esa especie, en cuanto a la composición de los triterpenos que son además los componentes mayoritarios (432).

Otros reportes en literatura del papel de la clase de fermentación empleada para hongos, como el de Elisashvili et. al en 2008, quienes realizaron un estudio comparativo con *Lentinus edodes* y *Pleurotus sp.*, en la habilidad para producir enzimas lignocelulósicas por FES y FEL en diferentes residuos de plantas, encontraron que la FES es favorable para la producción de lacasas y MnP, mientras que la FEL es mejor para la producción de enzimas hidrolíticas (50). Así mismo, Liu et. al en el 2012 hicieron un estudio completo con los 5'-nucleótidos responsables del sabor de las especies pertenecientes al género *Tuber*, en el que determinaron que es aproximadamente 1,0 a 14,3 veces mayor su contenido y el EUC (concentración equivalente en umamis) entre 2,6 y 8,4 veces mayor, en el micelio que en la fructificación. Mencionan que este comportamiento ya se ha visto en *Grifola frondosa*, *Ganoderma tsugae* y *Cordyceps militaris* (450).

Considerando las calidades nutricionales de las especies pertenecientes al género *Pleurotus*, que han incentivado la investigación desde el punto de vista del análisis proximal, Puentes en el 2002, realizaron un estudio en donde se compara el contenido proteico, de lípidos, ácidos grasos, polisacáridos y la capacidad antioxidante, de las fructificaciones y del micelio cultivado por FEL

revelando la similitud entre la composición química para los dos casos (54), resultados que coinciden con lo encontrado en este estudio particularmente para *P. ostreatus*, si se considera la cantidad de los esteroides, pero no el caso particular del número de estructuras identificadas.

Las variaciones en la biosíntesis de los metabolitos en hongos con el tipo de fermentación empleado para su obtención, también han sido estudiadas desde el punto de vista genético pero empleando como modelos a micromicetos. Tal es el caso del reporte de Barrios-Gonzalez et. al. en el 2008 en el que los autores encontraron que los genes involucrados en la biosíntesis de la Lovastatina en *Aspergillus terreus*, se expresan diferencialmente dependiendo del tipo de proceso empleado, desencadenando en una mayor producción de la estatina por FES (20 mg/g) que por FEL (0,65mg/ml). Con la realización de estudios complementarios los investigadores encontraron que el estrés osmótico no es el único responsable de la alta expresión genética en FES (451). Este tipo de fenómenos podrían ser los responsables de las diferencias observadas con la biosíntesis de los triterpenoides para los *Pleurotus* objeto de estudio, hipótesis que abre la puerta a posteriores investigaciones en busca de una explicación de este comportamiento.

Con respecto a reportes relacionados específicamente con la variación de los componentes triterpenoidales al emplear FEL y FES, en literatura se encuentra un estudio en el que se analiza el perfil de los esteroides presentes en el micelio y en las fructificaciones de *Tuber*, identificando 11 y 13 esteroides respectivamente, con un mayor contenido de ergosterol en el micelio que en la fructificación (1,8 a 3,5 dependiendo de la especie) (152). Estos resultados contrastan con lo encontrado en nuestra investigación, donde el contenido de ergosterol es mayor para las fructificaciones y el número de estructuras identificadas es mayor para la FEL. Desde este punto de vista y pensando en el potencial valor nutricional de la biomasa, este sería mayor en los micelios teniendo en cuenta que las variaciones estructurales observadas en su composición, podrían aumentar del mismo modo el número de bioacciones presentadas por los mismos.

En la tabla 8-4 se observa el efecto del tipo de fermentación sobre los componentes minoritarios determinados en los micelios y en las fructificaciones. De su análisis se puede concluir que los ésteres son primordialmente biosintetizados en los micelios y los ácidos en las fructificaciones, específicamente este último grupo de componentes en las especies *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* obtenidas con IL refrigerado y fresco respectivamente. No se determinaron en las fructificaciones estructuras diferentes a las ya encontradas en los productos biotecnológicos que se han estudiado a lo largo de esta investigación. Estos resultados contrastan con estudios similares como el reportado por Hadar et. al en el 2011 para varias especies del género *Tuber*, quienes mencionan que los micelios

tienen un mayor contenido de ácidos grasos que las fructificaciones, sin embargo los autores comparan con especies nativas en sus ambientes naturales (433). Con respecto al género *Pleurotus* el único estudio relacionado con este grupo de compuestos menciona que no hay diferencias evidentes entre la composición lipídica del micelio y de las fructificaciones (437), resultados igualmente contrastantes con lo encontrado en esta investigación. Relacionado con el valor que estos componentes le pueden proporcionar al producto final, desde el punto de vista de su carácter nutriceútico, podrían en cierta forma aumentar el potencial de las fructificaciones, en las que además de un alto contenido de ergosterol posee dentro de sus constituyentes el ácido linoleico, conocido por ser esencial en la dieta.

Tabla 8-4: Influencia del tipo de fermentación en la composición porcentual de los componentes minoritarios presentes en el extracto del micelio y las fructificaciones obtenidas con inóculo líquido fresco y refrigerado para las tres especies de *Pleurotus*.

ESPECIE	BIOMASA	DOP	LIME	LIET	PAET	ESET	OLME	OLET	PAL	EST	LIN
<i>Pleurotus djamonor</i>	Fructificación obtenida con inóculo fresco			2,4							
	Fructificación obtenida con inóculo refrigerado	2,3									
	Micelio	13,2		5,1	9,8	0,8		8,7			
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Fructificación obtenida con inóculo fresco		3,0	4,1			0,9		6,2	1,0	8,5
	Fructificación obtenida con inóculo refrigerado	3,7		2,4							
	Micelio	3,2		11	9,5	1,2		9,5	2,2		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Inóculo fresco		4,2	3,9							
	Inóculo refrigerado			8,1	0,9				9,6		20,6
	Micelio	5,1		5,4	17,1			12,8			

DOP: Ftalato de octilo
ESET: Estereato de etilo
EST: Ácido esteárico

LIME: Linoleato de metilo
OLME: Oleato de metilo
LIN: Ácido linoleico

LIET: Linoleato de etilo
OLET: Oleato de etilo

PAET: Palmitato de etilo
PAL: Ácido palmítico

Una de las ventajas que presenta la FES comparada con la FEL, es la generación como subproducto del sustrato agotado que si bien en algunas ocasiones es desechado, en otras empleado como alimento para animales, abono o para realizar procesos de compostaje (98). En busca de evaluar el potencial de este material, se determinó la composición de cada uno de los remanentes del cultivo realizando el mismo procedimiento de extracción aplicado a las fructificaciones. En la tabla 8-5 (CG en el anexo 8B) están listados los constituyentes de cada extracto, así como sus porcentajes relativos, a partir de los que se puede concluir que el sustrato agotado es una buena fuente de componentes

triterpenoidales proporcionados por el hongo cultivado, que representan cantidades cercanas al 50% del total de los constituyentes determinados, particularmente representados por el ergosterol (**IX**), proveniente posiblemente del micelio que aun en el momento de terminar la cosecha, se encuentra asociado al sustrato. La presencia de estos componentes le da un valor agregado al sustrato remanente del cultivo. La realización de estudios posteriores de digestibilidad que involucren la medición del grado de depolimerización de los carbohidratos estructurales que componen la madera, principal constituyente del sustrato empleado, plantearían la posibilidad de emplear este material como alimento para rumiantes, como se ha demostrado en estudios previos (452, 453).

Tabla 8-5: Composición por áreas relativas de los sustratos agotados empleados para las FES de los *Pleurotus* utilizando inóculo líquido.

COMPUESTO	<i>Pleurotus djamor</i>		<i>Pleurotus pulmonarius</i>		<i>Pleurotus ostreatus</i>	
	Inóculo refrigerado	Inóculo fresco	Inóculo refrigerado	Inóculo fresco	Inóculo refrigerado	Inóculo fresco
PAL	0,9					
LIME	0,8	1,9		0,9	1,7	
LIET	1,3	2,2	2,5	1,2	2,4	
DOP	1,3	3,6	1,5	1,6	3,6	3,1
I	6,7	7,2	9,8	7,7	6,6	7,1
II	1,9		2,6	1,8		
V	3,5		4,1	4,0	4,1	
VI	2,0		2,1	1,7	3,2	4,2
VII	2,5	5,6	3,8	2,3	6,1	4,9
IX	21,2	14,1	15,3	16,4	7,1	13,6
X	2,3					
XI		16,5	12,8	9,8	18,1	15,1
XVI	3,9	7,1	6,3	4,8	8,6	6,8
Ergostanol	3,1	4,5	3,4	2,7		

PAL: ácido palmítico

DOP: Ftalato de octilo

I. Estigmast-5-en-3-ol

VI. Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

X. Ergosta-7,22-dien-3-ol

LIME: linoleato de metilo

II. Ergost-5-en-3-ol

VII. Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno

XI. Estigmast-3-ona

LIET: Linoleato de etilo

V. Estigmastanol

IX. Ergosta-5,7,22-trien-3-ol

XVI. Ergostan-3-ona

Con base en los resultados descritos, la biomasa obtenida desde FEL o FES empleando salvado de trigo como FC, es un potencial nutriceútico consecuencia del alto contenido de compuestos triterpenoidales que hacen parte de su composición y que, como se ha mencionado en varias ocasiones, conforman un grupo de metabolitos secundarios con acción como antihiperlipidemicos, antiinflamatorios, antioxidantes, inhibidores del crecimiento de bacterias y hongos (152), antiateroscleróticos, anticarcinogénicos, e incluso se ha comprobado que el consumo de esteroides,

produce un efecto hipocolesterolémico por competición con el colesterol mediante la absorción desde el intestino (144, 165, 171).

8.3.3. Fraccionamiento de los extractos en AcOEt del micelio y las fructificaciones de *Pleurotus djamor*

Con el objetivo de evaluar las variaciones en la composición de la biomasa con el tipo de proceso empleado para su obtención, se realizó un fraccionamiento de los extractos en AcOEt, empleando la técnica de CC flash, tanto de los micelios (Figura 8-6) como de las fructificaciones (Figura 8-7) de *P. djamor*. La selección de esta especie se hizo con base en que en ella se determinó la mayor variedad de estructuras triterpenoidales. Este procedimiento permitió separar por grupos de polaridad consiguiendo diferenciar ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, los triterpenoides mayoritarios y los minoritarios (Figura 8-8 y 8-9). Posterior a esto se realizaron diferentes cromatografías en columna y CCD preparativas, sin embargo no se lograron separar las mezclas de los componentes triterpenoidales debido a la similitud estructural entre sus constituyentes. Es necesario para trabajos posteriores contemplar el uso de técnicas diferentes que permitan la separación como es el caso de HPLC preparativa.

Figura 8-6: CG del extracto en AcOEt del micelio de *P. djamor* cultivado con salvado de trigo.

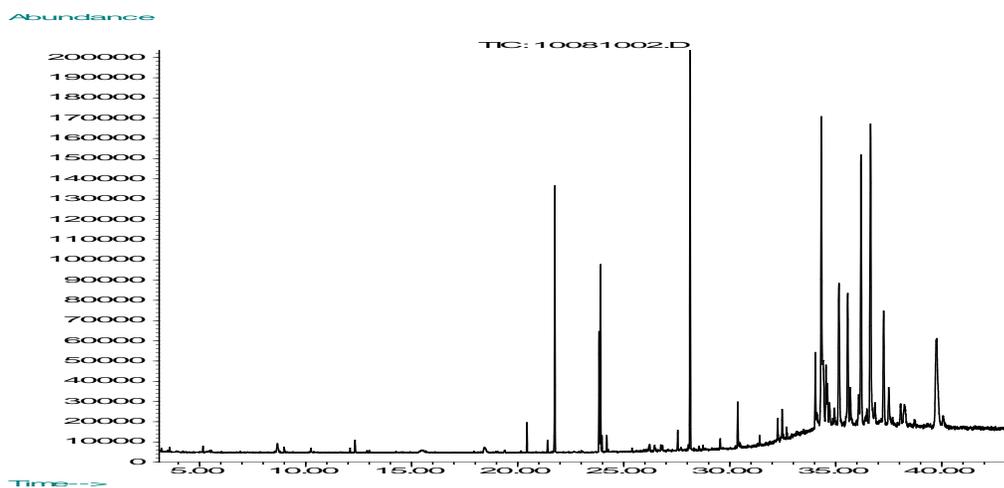


Figura 8-7: CG del extracto en AcOEt de la fructificaciones de *P. djamor* cultivado con salvado de trigo.

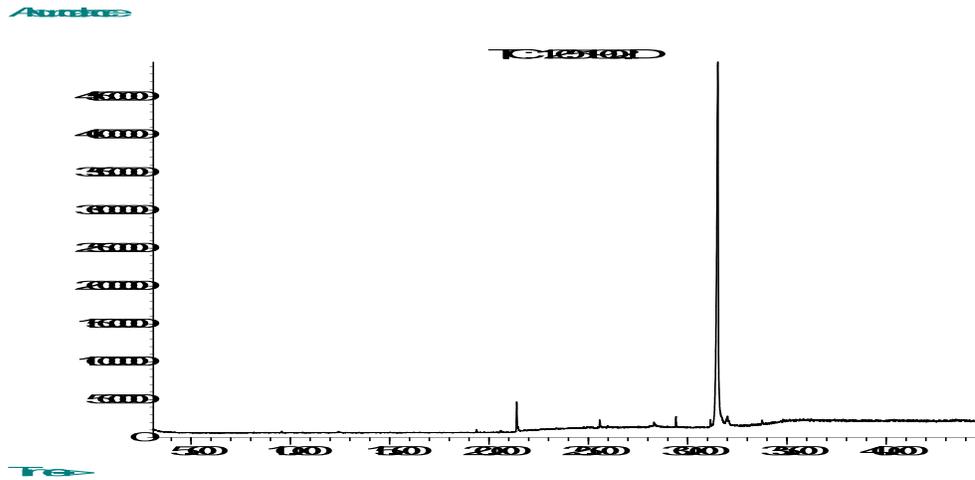


Figura 8-8: CG de las fracciones separadas por cromatografía en columna del extracto en AcOEt del micelio de *P. djamor* cultivado con salvado de trigo.

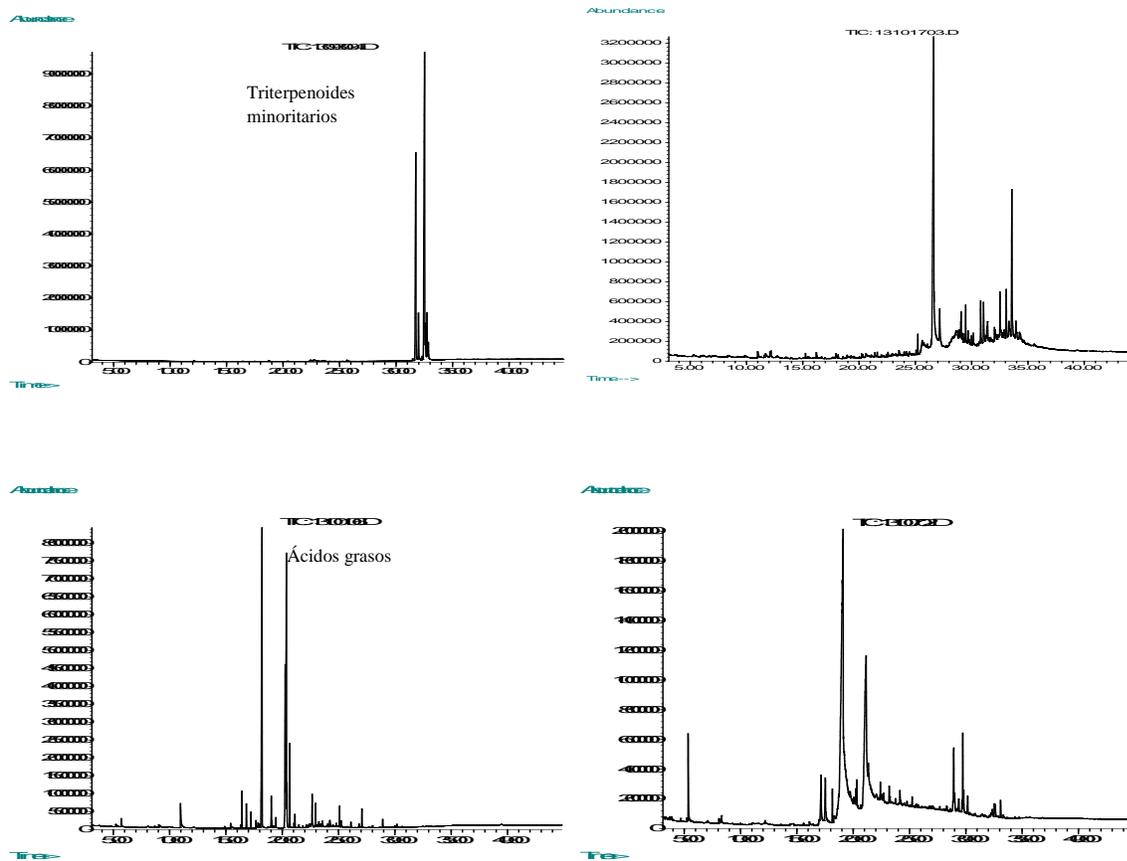
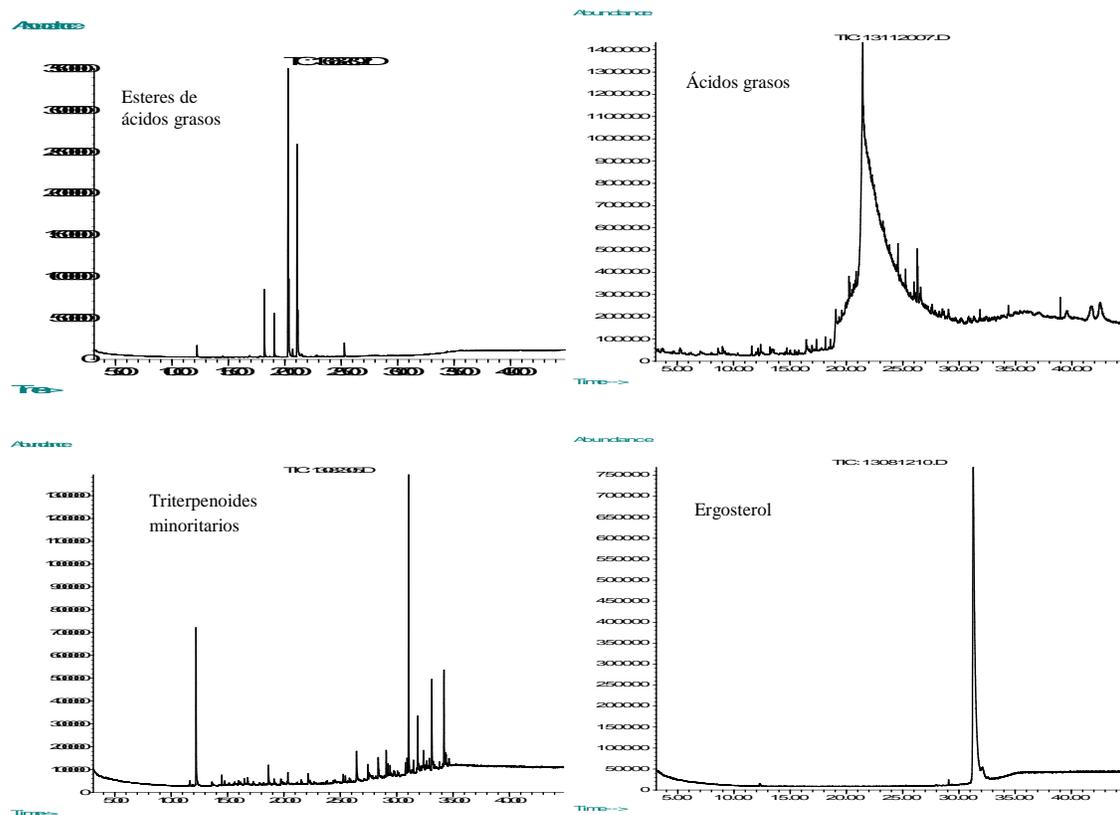


Figura 8-9: CG de las fracciones separadas por cromatografía en columna del extracto en AcOEt de la fructificaciones de *P. djamor*.



8.4. CONCLUSIONES

- Los resultados arrojados con respecto a la eficiencia del proceso permiten establecer que esta metodología puede ser empleada en el cultivo del género *Pleurotus* reduciendo el tiempo total del cultivo.
- La manera de preservación del inóculo afecta la eficiencia de la FES y por ende se debe preferir el empleo del producto biotecnológico en fresco sobre el refrigerado.
- En lo que respecta al estudio comparativo de los constituyentes del micelio y de las fructificaciones, se identificaron 14 triterpenoides en los micelios y 5 en las fructificaciones siendo en este último caso el ergosterol el componente mayoritario en proporciones superiores al 52%.
- De manera genérica y para las especies de *Pleurotus* estudiadas el proceso biotecnológico empleado para la producción de biomasa, afecta principalmente el número de estructuras de los componentes triterpenoidales y no su contenido total.
- Los resultados permiten direccionar el empleo de la clase de fermentación: si lo que se busca es obtener un producto con mayor variabilidad estructural de triterpenoides, y por ende de mayor

número de acciones biológicas, se debe optar por el empleo de la FEL mientras que si lo que se desea es una biomasa con alto contenido de ergosterol, provitamina D2, el proceso elegido deber ser la FES.

- Estos resultados son pioneros en lo referente a la incidencia de la clase de fermentación empleada en la producción de compuestos de carácter triterpenoidal teniendo en cuenta que, hasta el presente, sólo se ha investigado en las especies de *Pleurotus* su efecto frente a la producción de enzimas y de polisacáridos.

Conclusiones generales y perspectivas

Conclusiones generales

- Se determinó que el empleo de fuentes de carbono no convencionales en FEL permiten, al igual que sucede con otros basidiomicetes como *Ganoderma lucidum*, una buena producción de biomasa y bioactivos en especies de *Pleurotus*, llevando a inferir que las mismas podrían emplearse para otros hongos comestibles, trayendo como consecuencia la disminución de los costos del proceso biotecnológico. Las cantidades de biomasa obtenidas son, en la mayoría de los casos, superiores a las reportadas en literatura, hecho que posiciona a estas fuentes de carbono como una excelente alternativa para la producción biotecnológica de *Pleurotus*.

- En lo referente a la incidencia del uso de las harinas y el salvado de trigo como fuentes de carbono sobre el potencial nutriceúutico de las especies de *Pleurotus* estudiadas, dado tanto por su composición de bioactivos (ácidos, esteroides, compuestos triterpenoidales y EPS) en los productos biotecnológicos como por la producción de biomasa, los resultados encontrados pusieron en evidencia el efecto que ellas presentan, el cual se ve reflejado claramente en el cambio no sólo en las cantidades de bioactivos biosintetizados, sino en la variación en sus estructuras, lo que repercute directamente en el valor nutriceúutico de los hongos cultivados biotecnológicamente, proporcionando además diferentes maneras para su posterior utilización, puesto que dicho efecto es dependiente de la especie, del tipo de componente estudiado y de la fuente de carbono.

- Las modificaciones en algunas variables del proceso como son el pH inicial de la fermentación y el empleo de elicitación mediante los LEDs, inciden directamente sobre la composición de los productos biotecnológicos, siendo dependiente de la especie cultivada, la fuente de carbono, el tipo de metabolito que se desee obtener y la longitud de onda del diodo empleado como elicitor, siendo una generalidad que empleando un pH inicial de 5,6 y salvado de trigo como fuente de carbono se favorece la producción de triterpenoides. La elicitación incide de manera más apreciable en el valor nutriceúutico de los caldos de cultivo agotados debido a que favorece la

excreción de triterpenoides. Este resultado proporciona, gracias a los metabolitos excretados por el hongo, un valor agregado a los caldos agotados, generalmente considerados como un subproducto de los procesos de FEL sin utilidad alguna.

- El comportamiento diferencial para cada una de las especies según la longitud de onda del mismo, pone de manifiesto la posible existencia de fotorreceptores específicos y diferentes para cada especie.

- Los resultados antes expuestos permiten direccionar el empleo tanto de una FC no convencional específica, como de la elicitación con un LED determinado y un pH inicial óptimo, dependiendo del empleo final que se le dará al producto biotecnológico como nutriceútico, ya que no es lo mismo si se desea emplear el micelio únicamente, el caldo de cultivo agotado por separado o la combinación de los dos.

- Con relación a la incidencia de las fuentes de carbono y las condiciones de cultivo en la producción de estatinas, si bien no fue posible determinar con total certeza si los hongos las producen o no, el estudio de esta clase de metabolitos en los productos biotecnológicos no sólo permitió desarrollar una técnica analítica eficaz y rápida para la detección de una mezcla de estatinas, aplicable a una matriz compleja como es el producto biotecnológico obtenido de una FEL, de la cual se adolecía en la actualidad, sino que permitió determinar que los *Pleurotus* poseen dentro de sus metabolitos secundarios compuestos que por su comportamiento cromatográfico permiten inferir que comparten características estructurales con las estatinas empleadas como estándares, que podrían corresponder a estatinas diferentes, a precursores de las mismas o a estructuras hasta ahora no reportadas.

- El uso del producto de la FEL de las tres especies de *Pleurotus* como inóculo líquido para la obtención de fructificaciones mediante FES, resultó ser un proceso eficiente con una buena reducción en el tiempo total del proceso lo que proporcionaría un mayor rendimiento económico para los fungicultores.

- Adicionalmente, si lo que se busca es obtener un producto con mayor variabilidad estructural de triterpenoides, y por ende de mayor número de potenciales acciones biológicas, lo que conlleva a un mayor valor nutriceútico, se debe optar por el empleo de la FEL mientras que si lo que se desea es una biomasa con alto contenido de ergosterol, provitamina D2, el proceso elegido deber ser la FES.

Perspectivas

Si bien los resultados arrojados por esta investigación permiten ver como el empleo de fuentes de carbono no convencionales en la obtención biotecnológica mediante FEL de algunas especies de *Pleurotus*, conlleva a la obtención de productos con un gran potencial nutriceútico, así como a la disminución de los costos del proceso, parámetro fundamental en biotecnología, también ponen de presente que el manejo del pH inicial de la fermentación y la elicitación de la misma modifican el carácter funcional del producto abriendo nuevas perspectivas para su posterior utilización tanto como coadyuvantes en la farmacoterapia de algunas enfermedades o en la producción de nutriceúticos y alimentos funcionales, sin dejar de lado el aporte que dan al cultivo tradicional con la implementación del empleo del inóculo líquido, con una ventaja lógica desde el punto de vista de ganancia para los fungicultores al disminuir el tiempo total de producción y las pérdidas por contaminación, no son pocos los interrogantes que los mismos dejan y que sólo pueden ser resueltas profundizando en posteriores estudios como son:

- Determinación de la proporción que representan los β -1,3-1,6-glucanos dentro de los exopolisacáridos presentes en los medios de cultivo agotados, debido a que es bien conocido que son ellos los principales aportantes de las bioacciones de este grupo de compuestos. Este cálculo se puede realizar espectrofotométricamente con el empleo de la modificación del método de rojo congo previamente establecida en estudios realizados en el laboratorio de Química de Hongos Macromicetos (454);
- Realización de las cinéticas de crecimiento de las tres especies de *Pleurotus* en las fuentes de carbono usadas, así como efectuar el seguimiento de la producción de los bioactivos a lo largo del tiempo de fermentación en busca de establecer, con base en estos dos parámetros, si el tiempo empleado en el proceso es el ideal tanto para favorecer la biosíntesis de los metabolitos primarios y secundarios de interés, como para la producción óptima de biomasa. Así mismo, encontrar el tiempo que permita evitar la autólisis, si ésta se llegara a dar;
- Establecimiento de los posibles cambios en la morfología de los cultivos y en la producción de biomasa y bioactivos con el empleo de los diferentes LEDs, así como con los pH iniciales del cultivo, en busca de una explicación a las diferencias en la composición observada bajo dichas condiciones;

- Búsqueda de las condiciones óptimas en HPLC preparativa que permitan separar y poder caracterizar inequívocamente las estructuras de los metabolitos biosintetizados por los hongos, mediante la aplicación de las técnicas espectroscópicas necesarias;
- Esclarecimiento de la relación biosintética entre la producción de estatinas y de triterpenoides en hongos del género *Pleurotus*, con la hipótesis de que conociendo el efecto hipocolesterolémico de las estatinas y su modo de acción por la inhibición competitiva en la biosíntesis del colesterol, es factible que en estos organismos de igual forma se evidencie una reducción en la producción de triterpenoides en general. Esta investigación en la actualidad se está adelantando con cepas de *Pleurotus* certificadas como productoras de estatinas;
- Continuación del estudio, iniciado en la Universidad del Bío-Bío, enfocado en la producción biotecnológica de estatinas por cepas mutantes de *Aspergillus terreus* obtenidas con irradiación UV, con el objetivo de evaluar el efecto que dichas condiciones tienen sobre la producción de los metabolitos y explorar su factibilidad de extrapolación a macrohongos;
- Profundización en el estudio de los componentes detectados por CLAE-UV y DAD, en los extractos de los micelios de los *Pleurotus* cultivados con las diferentes fuentes de carbono y que presentan características estructurales similares a las estatinas. Este tema se está abordando desde dos perspectivas: a) síntesis de precursores de las estatinas y/o derivados de ellas previamente reportados en literatura para realizar co-inyecciones con los extractos de los micelios; b) uso de técnicas analíticas como LC-MS o LC-QTOF/MS que permitan confirmar o descartar que los picos detectados correspondan a estructuras anteriormente reportadas en literatura estructuralmente relacionadas con los estándares usados, fase del estudio que se está adelantando con la colaboración del profesor Félix Javier Hernández Hernández del Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas de la Universitat Jaume I de Castellón España;
- Evaluación, con la colaboración de fungicultores, de la viabilidad del empleo del producto biotecnológico como inóculo líquido en el cultivo tradicional de *Pleurotus* a escala industrial y aprovechando los residuos agrícolas generados en una región determinada.

Bibliografía

1. Sepúlveda Arango LJ. Estudio de la actividad antifúngica de los extractos de tres especies de hongos del género *Pleurotus* y de seis estatinas comerciales contra el hongo patógeno *Candida albicans*. Medellín - Colombia, Magíster en Biología, Universidad de Antioquia; 2013.
2. Manoni A, Mgonja JR. Submerged liquid fermentation of some tanzanian basidiomycetes for the production of mycelial biomass, exopolysaccharides and mycelium protein using wastes peels media. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 2009; 4 (6): 1-14.
3. Fang Q-H, Zhong J-J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—Ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J*. 2002; 10 61-65.
4. Zapata P, Rojas D, Atehortúa L. Production of biomass, polysaccharide, and ganoderic acids using non-conventional carbon sources under submerged culture of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr) P. Karst. (Higher basidiomycetes). *Int J Med Mushr*. 2012; 14 (2): 197-203.
5. Zapata P, Rojas D, Fernández C, Ramírez D, Restrepo G, Orjuela V, Arroyave M, Gómez T, Atehortúa L. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista EIA Escuela de Ingeniería de Antioquia*. 2007; 7 137-144.
6. Saldarriaga Y, Pineda F. Manual de micología aplicada. Medellín - Colombia 2001.
7. Grandjean J, Huls R. Structure de la pleurotine: une benzoquinone extraite de *Pleurotus griseus*. *Tetrahedron Lett*. 1974; 22 1893-1895.
8. Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Third ed. Berkeley Toronto 1993.
9. Vega A, Mata G, Salmones D, Caballero R. Cultivo de cepas nativas de *Pleurotus djamor* en Panamá, en paja de arroz y pulpa de café. *Rev Mex Micol*. 2006; 23 93-97.
10. Benkortbi O, Hanini S, Bentahar F. Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*. *Biochem Eng J*. 2007; 36 (1): 14-18.
11. Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 58 582-594.

12. Gerasimenya V, Efremenkova O, Kamzolkina O, Bogush T, Zenkova V. Antimicrobial and antitoxic action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. extracts. *Int J Med Mushr.* 2004; 4 106-109.
13. Wisbeck E, Robert AP, Furlan SA. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Revista Saúde e Ambiente.* 2002; 3 (2): 7-10.
14. Parameswari V, Chinnaswamy P. An in vitro study of the inhibitory effect of *Pleurotus florida* a higher fungi on human pathogens. *Journal of Pharmacy Research.* 2011; 4 (6): 1948-1949.
15. Tambekar DH, Sonar TP, Khodke MV, Khante BS. The novel antibacterial from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor-cajú*. *Int J Pharmacol.* 2006; 2 (5): 584-587.
16. Gogavekar SS, Rokade SA, Ranveer RC, Ghosh JS, Kalyani DC, Sahoo AK. Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of *Pleurotus sajor-caju*. *J Food Sci Technol.* 2012; DOI 10.1007/s13197-012-0656-5
17. Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6 1287-1297.
18. Wasonga C, Okoth S, Mukuria J, Omwandho C. Mushroom polysaccharide extracts delay progression of carcinogenesis in mice. *J Exp Ther Oncol.* 2008; 7 147-152.
19. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *J Funct Foods.* 2012 4687-709.
20. Hu SH, Liang ZC, Chia YC, Lien JL, Chen KS, Lee MY, Wang JC. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *J Agric Food Chem.* 2006; 54 2103-2110.
21. Lakshmi B, Tilak JC, Adhikari S, Devasagayam TPA, Janardhanan KK. Evaluation of antioxidant activity of selected indian mushrooms. *Pharm Biol.* 2004; 42 (3): 179-185.
22. Ramkumar L, Ramanathan T, Thirunavukkarasu P, Arivuselvan N. Antioxidant and radical scavenging activity of nine mushrooms extract. *Int J Pharmacol.* 2010; 6 (6): 950-953.
23. Lee Y-L, Huang G-W, Liang Z-C, Mau J-L. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT-Food Science and Technology.* 2007 40 823-833.
24. Vasudewa NS, Abeytunga DT, Ratnasooriya WD. Activity-directed fractionation of *Pleurotus ostreatus* in the search for analgesics. *Pharm Biol.* 2008; 46 (5): 295-301.
25. Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44 1989-1996.
26. Kim S-W, Kim H-G, Lee B-E, Hwang H-H, Baek D-H, Ko S-Y. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clin Nutr.* 2006; 25 166-170.

27. Miles PG, Chang ST. Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Singapore, New Jersey 1998.
28. Aguilera C, Barberá JM, Díaz LE, Duarte A, Gálvez J, Gil Á, Gómez S, González-Gross M, Granado F, Guarner F, Marcos A, Martínez o, Nova E, Olmedilla B, Pujol-Amat P, Ramos E, Romeo J, Tobal F, Vidal D, Wärnberg J, Zaruelo A. Alimentos nutraceuticos, suplementos dietéticos y plantas medicinales. In: Alimentación DGdSPy, editor. Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Madrid - España: Inutcam. Instituto de Nutrición y Transtornos alimentarios; 2007.
29. Wasser SP, Akavia E. Regulatory issues of mushrooms as functional foods and dietary supplements: safety and efficacy. In: Cheung PCK, editor. Mushrooms as functional foods. United States of America: John Wiley & Sons Inc; 2008. p. 199-215.
30. Paterson R. Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 2006; 67 1985-2001.
31. Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. J Pharm Biomed Anal. 2011; 55 758-774
32. Gern Miranda RM, Wisbeck E, Rampinelli JR, Ninow JL, Furlan SA. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. Bioresour Technol. 2008; 99 76-82.
33. C.K P, Cheung PD. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. Nutrition Research. 1996; 16 (11/12): 1953-1957.
34. Wang J-C, Hu S-H, Liang Z-C, Yeh C-J. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 67 759-766.
35. Lakhanpal TN, Rana M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. Plant Genetic Resources. 2005; 3 (2): 288-303.
36. Zapata P. Evaluación y desarrollo de un medio de cultivo para la producción de biomasa micelial del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* bajo cultivo sumergido. Medellín - Colombia, Tesis de Magister en Biología, Universidad de Antioquia; 2006.
37. Suárez C, Nieto R I. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. Rev Iberoam Micol. 2013; 30 (1, 3): 1-8.
38. Fazenda ML, Seviour R, McNeil B, Harvey LM. Submerged culture fermentation of "higher fungi": the macrofungi. Adv Appl Microbiol. 2008; 63 33-103.
39. Lee WY, Park Y, Ahna JK, Kab KH, Park SY. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. Enzyme Microb Technol. 2007; 40 249-254.

40. Guardia ML, Venturella G, Venturella F. On the chemical composition and nutritional value of *Pleurotus* taxa growing on Umbelliferous plants (*Apiaceae*). J Agric Food Chem. 2005; 53 5997-6002.
41. Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. Food Chem. 2004; 84 201-206.
42. Rangunathan R, Swaminathan K. Nutritional status of *Pleurotus spp.* grown on various agro-wastes. Food Chem. 2003; 80 371-375.
43. Gregori A, Svagelj M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus spp.* Food Technol Biotechnol. 2007; 45: (3): 238-249.
44. Mandeel QA, Al-Laith AA, Mohamed SA. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes. World J Microbiol Biotechnol. 2005; 21 601-607.
45. Tisdale TE, Miyasaka SC, Hemmes DE. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. World J Microbiol Biotechnol. 2006; 22 201-206.
46. Wu J-Z, Cheung PCK, Wong K-H, Huang N-L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer—Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. Food Chem. 2003; 81 389-393.
47. Wu J-Z, Cheung P, Wong K-H, Huang N-L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of Carbon-to-Nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. Food Chem. 2004; 85 101-105.
48. Márquez-Rocha F, Guillén G, Sánchez J, Vázquez-Duhalt R. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. Biotechnol Tech. 1999; 13 29-32.
49. Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Asatiani M, Kvesitadze G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. Enzyme Microb Technol. 2006; 38 998-1004.
50. Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Kharziani T, Kvesitadze G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. Bioresour Technol. 2008; 99 (3): 457-462.
51. Rupak M, Bishnu P C, Arun K G. Biochemical changes during fermentation of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* in whey. Process Biochem. 2002; 38 723-725.
52. Pedneault K, Angers P, Avis TJ, Gosselin A, Tweddell RJ. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. '*citrino-pileatus*' grown at different temperatures. Mycol Res. 2007; 111 1228-1234.

-
53. Calderón J. Determinación de la mejor etapa de aplicación de la fertilización nitrogenada en el sustrato caña de maíz (*Zea mays L.*) para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm (Cepa ECS-152). Guatemala, Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala; 2009.
54. Aguila S. Comparación nutricional y determinación de metabolitos secundarios de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) obtenidos en forma silvestre y domesticado Chillan Chile, Ingeniero de alimentos, Universidad del Bio-Bio; 2002.
55. Sainos E, Díaz-Godínez G, Loera O, Montiel-González A, Sánchez C. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72 812-815.
56. Vogel F, Salmones D. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus spp.* cultivadas en una planta comercial. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17 138-141.
57. Vamanu E. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules.* 2012; 17 3653-3671.
58. Philippoussis A, Zervakis G, Diamantopoulou P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus spp.* *World J Microbiol Biotechnol.* 2001; 17 191-200.
59. Papaspyridia L-M, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochem Eng J.* 2010; 50 131-138.
60. Torres M, Ríos A. Potencial de la microbiota nativa comestible y medicinal en el municipio de Quibdó Colombia. *Revista Institucional Universidad Tecnológica Del Chocó.* 2003; 6 (18): 10 - 13.
61. Jaramillo D, Yepes L, Hincapié G, Velásquez A, Vélez A. Desarrollo de productos a partir de la orellana (*Pleurotus ostreatus*). *Revista de Investigaciones Aplicadas.* 2011; 10 32-41.
62. Salgado MT, Serna L, Castro K. Eficiencia biológica de *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó.* 2005; 23 41-44.
63. Montoya S, Restrepo GM. Evaluación de la síntesis de proteína a partir del crecimiento vegetativo de *Pleurotus sp.* sobre residuos de algarrobo y uva pasa. *Revista Universidad de Caldas.* 2006 Enero - Diciembre; 23-31.
64. Rios M, Hoyos J, Mosquera S. Evaluación de los parametros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 2010; 8 (2): 86-96.

65. Forero CL, Hoyos OL, Bazante WE. Evaluación de residuos de ají (*Capsicum spp.*) como sustrato en la producción de setas comestibles (*Pleurotus ostreatus*). Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial. 2008; 6 (1): 42-53.
66. Bonilla-Lavado H, Vásquez-Acosta N, Rubiano-Rodríguez J. Evaluación de residuos orgánicos (coco y aserrín) como sustratos para la producción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq: fr.) en Buenaventura. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó. 2006; 24
67. López-Rodríguez C, Hernández-Corredor R, Suárez-Franco C, Borrero M. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Universitas Scientiarum. 2008; 13 (2): 128-137.
68. Garzon JP, Cuervo JL. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2008; 6 (10): 126-140.
69. Vargas PS, Hoyos JL, Mosquera SA. Uso de hojarasca de roble y bagazo de caña en la producción de *Pleurotus ostreatus*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2012; 10 (1): 136 - 145.
70. Cortés M, García A, Suárez H. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina V. Vitae. 2007; 14 (1): 16-24.
71. Gil LM, Manjarres-Pinzon K, Piñeros-Castro Y, Rodriguez-Sandoval E. Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2012; 10 (1): 173 - 181.
72. Cortés M, Ruiz M, Henriquez L. Influencia del empaque y envasado sobre las propiedades fisicoquímicas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba. 2011; 16 (2): 2593-2604.
73. Manjarrés K, Castro A, Sandoval ER. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. Revista Lasallista de Investigación. 2010; 7 (2): 9-15.
74. Smiderle FR, Olsen LM, Ruthes AC, Czelusniak PA, Santana-Filho AP, Sasaki GL, Gorin PA, Iacomini M. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. Carbohydr Polym. 2012; 87 368– 376.
75. Lavi I, Levinson D, Peri I, Tekoah Y, Hadar Y, Schwartz B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 85 1977-1990.
76. Wolff E, Wisbeck E, Silveira M, Gern R, Pinho M, Furlan S. Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 151 402-412.

-
77. Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, Vukojević J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 38 65-73.
78. Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, Duran A. Biomass estimation in solid state fermentation *Appl Microbiol Biotechnol.* 1991; 35 200-205.
79. Matcham SE, Jordan BR, Wood DA. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1985; 21 108-112.
80. Dubey AK, Suresh C, Kumar SU, Karanth NG. An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998 50 299-302.
81. AOAC. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18th ed. Washington, DC., USA 2006.
82. Rout D, Mondal S, Chakraborty I, Islam SS. The structure of a polysaccharide from Fraction-II of an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res.* 2006; 341 995-1002.
83. Stanley HO. Effect of substrates of spawn production on mycelial growth of Oyster mushroom species. *Agriculture and Biology Journal of North America.* 2010; 1 (5): 817-820.
84. Soto-Velazco C, López C, Balls EV, Alvarez I. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. In: Sánchez JE, Huerta G, Montiel E, editors. *Mushroom Biology and Mushroom Products.* Cuernavaca: Universidad Autonoma del Estado de México; 2002.
85. Isikhuemhen OS, Mikiashvilli NA. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009; 36 1353-1362.
86. Ya-Jie T, Ling-Li Z, Dong-Sheng L, Zhi-Yuan M, Hong-Mei L. Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and *Tuber* polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochem.* 2008; 43 576-586.
87. Rizki M, Tamai Y. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World J Microbiol Biotechnol.* 2011; 27 1695-1702.
88. Shih I-L, Tsai K-L, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem Eng J.* 2007; 33 193-201.
89. Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, Vukojevic J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species *Enzyme Microb Technol.* 2006; 38 65-73.

90. Kurt S, Buyukalaca S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresour Technol.* 2010; 101 3164-3169.
91. Kwon JS, Lee JS, Shin WC, Lee KE, Hong EK. Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2009; 14 756-762.
92. Kim SS, Lee JS, Cho JY, Kim YE, Hong EK. Effects of C/N ratio and trace elements on mycelial growth and exo-polysaccharide production of *Tricholoma matsutake*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2010; 15 293-298.
93. Bespalova LA, Makarov OE, Antonyuk LP, Ignatov VV. Lipogenesis in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* cultivated on different media. *Appl Biochem Microbiol.* 2002; 38 (4): 349-354.
94. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. *Food chemistry.* 4th ed: Springer; 2009.
95. Bernal I. *Análisis de alimentos.* Bogotá- Colombia 1998.
96. Kirk RS, Sawyer R, Egan H. *Composición y análisis de alimentos de Pearson.* Mexico 1996.
97. Barikmo I, Ouattara F, Oshaug A. Protein, carbohydrate and fibre in cereals from Mali—how to fit there sults in a food composition table and database. *J Food Comp Anal.* 2004; 17 291-300.
98. Couto SR, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng.* 2006; 76 291-302.
99. Zhong J-J, Tang Y-J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2004; 87 25-59.
100. Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry.* 2004; 65 261-291.
101. Moradali M-F, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude G-A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol.* 2007; 7 701-724.
102. Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol.* 1999; 19 65-96.
103. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002; 60 (3): 258-274.
104. Jikai L. Biologically active substances from mushrooms in Yunnan, China. *Heterocycles.* 2002; 57 (1): 157-167.
105. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich W-D. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM.* 2005; 2 (3): 285-299.

106. Yasukawa K, Kaminaga T, Kitanaka S, T T, Nunoura Y, Natori S, Takido M. 3 β -p-hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from *Poria cocos*, and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry*. 1998; 48 (8): 1357-1360.
107. Leon F, Valencia M, Rivera A, Nieto I, Quintana J, Estevez F, Bermejo J. Novel cytostatic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma australe*. *Helv Chim Acta*. 2003; 86 (9): 3088-3095.
108. Vocak K, Budesinský M, Harmatha J, Pís J. New ergostane type ecdysteroids from fungi. Ecdysteroids constituents of mushroom *Paxillus atromentosus*. *Tetrahedron*. 1998; 54 1657-1666.
109. Zhong J-J, Xiao J-H. Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009; 113 79-150.
110. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature reviews*. 2005; 3 937-949.
111. Zaidman B-Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 67 453-468.
112. Volkman JK. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org Geochem*. 2005; 36 139-159.
113. Silva M, Bittner M, Hoeneisen MB, J, Campos V, Gonzales F, Cespedes C, Marambio O. Química de los triterpenos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. 1992.
114. Zhou XW, Su KQ, Zhang YM. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 93 941-963.
115. Horng-Huey K, Chi-Feng H, Jih-Pyang W, Chun-Nan L. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*. 2008; 69 (1): 234-239.
116. Nieto R IJ, Chegwin A C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *J Chil Chem Soc*. 2008; 53 (2): 1515-1517.
117. Nieto R IJ, Chegwin A C, Osorio Z HJ. Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24 72-74.
118. Nieto R IJ, Chegwin A C. Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. *Rev Colombiana Biotecnol*. 2010; 12 (1): 169-178.
119. Nieto R IJ, Chegwin A C. The effect of different substrates on triterpenoids and fatty acids in fungi of the genus *Pleurotus*. *J Chil Chem Soc*. 2013; 58 (1): 1580-1583.
120. Chegwin C. Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si dicho hongo las presenta. Bogota, Magister en Ciencias - Química, Universidad Nacional de Colombia; 2007.

121. Shu C-H. Fungal fermentation for medicinal products. In: Technology ES, editor. Bioprocessing for value-added products from renewable resources. New technologies and applications. First ed. The Netherlands 2007. p. 447-451.
122. Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv.* 2004; 22 189-259.
123. Felse PA, Panda T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed. *Biochem Eng J.* 2000; 4 115-120.
124. Tang Y-J, Zhong J-J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Technol.* 2003; 32 478-484.
125. Fang Q-H, Zhong J-J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 2002; 37 769-774.
126. Olfati JA, Peyvast G. Lawn clippings for cultivation of oyster mushroom. *International Journal of Vegetable Science.* 2008; 14 (2): 98-104.
127. Wasser SP. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 89 1323-1332.
128. Chiochio VM, Matković L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. *J Arg Chem Soc.* 2011; 98 10-15.
129. Wilson K, Mcleod BJ. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: effect on protein, carbohydrate, sterol and fatty acid content and on viability. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1976; 42 397-410.
130. Bihalova B, Hozak P, Blahova M, Sillingera V. Effect of nitrogen limitation and sporulation on sterol and lipid formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* 1992; 37 (6): 442-449
131. Mauricio JC, C.Millan, Ortega JM. Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World J Microbiol Biotechnol.* 1998; 14 405-410.
132. He X, Guo X, Liu N, Zhang B. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 75: 55-60.
133. Tang Y-J, Zhang W, Zhong J-J. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Bioresour Technol.* 2009; 100 1852-1859.
134. Xu P, Ding Z-Y, Qian Z, Zhao C-X, Zhang K-C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme Microb Technol.* 2008; 42 325-331.

135. Fang Q-H, Tang Y-J, Zhong J-J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 2002; 37 1375-1379.
136. Niemenmaa O, Galkin S, Hatakka A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2008; 62 125-134.
137. Li L, Sattler I, Deng Z, Groth I, Walther G, Menzel K-D, Peschel G, Grabley S, Lin W. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Phytochemistry.* 2008; 69 511–517.
138. Song T-Y, Yen G-C. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Agric Food Chem.* 2002; 50 3322-3327.
139. Chen Y-K, Kuo Y-H, Chiang B-H, Lo J-M, Sheen AL-Y. Cytotoxic activities of 9,11-dehydroergosterol peroxide and ergosterol peroxide from the fermentation mycelia of *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium containing leguminous plants on Hep 3B cells. *J Agric Food Chem.* 2009; 57 5713-5719.
140. Jasinghe VJ, Perera CO. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chem.* 2005; 92 541-546.
141. Charcosset J-Y, Chauvet E. Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the aquatic Hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67 (5): 2051-2055.
142. Zou X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochem.* 2006; 41 970-974.
143. Kumari HPM. *Monascus purpureus* in relation to statin and sterol production and mutational analysis. Mysore Doctor of Philosophy in Biotechnology, University of Mysore; 2009.
144. Phillips KM, Ruggio DM, Horst RL, Minor B, Simon RR, Feeney MJ, Byrdwell WC, Haytowitz DB. Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 7841-7853.
145. Ching-Jen L, Chien-Chi C, Been-Huang C. The elicited two-stage submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* for enhancing triterpenoids production and antitumor activity. *Biochem Eng J.* 2012; 64 48-54.
146. Riháková Z, Plocková M, Filip V, Smidrkal J. Antifungal activity of lauric acid derivatives against *Aspergillus niger*. *Eur Food Res Technol.* 2001; 213 488-490.
147. Wasser SP, Wells AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushr.* 1999; 1 31-62.

148. Carballeira NM. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Prog Lipid Res.* 2008; 47 (1): 50-61.
149. Syed Mubbasher S, Imran H, Syed Dilnawaz A. Estimation of sterols in edible fats and oils. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2003; 2 (3): 178-181.
150. Papaspyridi L-M, Aligiannis N, Topakas E, Christakopoulos P, Skaltsounis A-L, Fokialakis N. Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for the effective production of bioactive metabolites. *Molecules.* 2012; 17 2714-2724.
151. Casas JL, Sánchez JA, Fernández JM, Acién FG, Molina E, Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb Technol.* 2003 May; 33 270-277.
152. Tang Y, Li H-M, Tang Y-J. Comparison of sterol composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chem.* 2012; 132 1207-1213.
153. Manzoni M, Rollini M, Bergomi S, Cavazzoni V. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnol Tech.* 1998 Jul; 12 (7): 529-532.
154. Nieto-Ramirez IJ, Chegwin-Angarita C, Atehortúa L, Sepúlveda LJ. Las estatinas: química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. *Vitae.* 2013; 20 (1): 49-63.
155. Gani A, Wani SM, Masoodi FA, Hameed G. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: A review. *J Food Process Technol* 2012 3(3): 1-10.
156. Esche R, Barnsteiner A, Scholz B, Engel K-H. Simultaneous analysis of free phytosterols / phytostanols and intact phytosteryl / phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *J Agric Food Chem.* 2012; 60 (21): 5330-5339.
157. Frank T, Scholz B, Peter S, Engel K-H. Metabolite profiling of barley: Influence of the malting process. *Food Chem.* 2011; 124 948-957.
158. Jiang Y, Wang T. Phytosterols in cereal by-products. *J Am Oil Chem Soc.* 2005; 82 (6): 439-444.
159. Nurmi T, Lampi A-M, Nyström L, Hemery Y, Rouau X, Piironen V. Distribution and composition of phytosterols and steryl ferulates in wheat grain and bran fractions. *J Cereal Sci.* 2012; 56 (2): 379-388.
160. Rozenberg R, Ruibal-Mendieta NL, Petitjean G, Cani P, Delacroix DL, Delzenne NM, Meurens M, Quetin-Leclercq J, Habib-Jiwan J-L. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *J Cereal Sci.* 2003; 38 189-197.

161. Nout MJR, Laarhoven TMGB-V, Jongh Pd, Koster PGd. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1987; 26 456-461.
162. Nogovitsina YM, Grishko VV, Ivshina IB. Biocatalytic synthesis of pharmacology perspective Stigmast-4-en-3-one using *Rhodococci* Cells. *Russ J Bioorg Chem.* 2011; 37 (5): 626-633.
163. Coutinho M, Coelho B, Araujo F, Odorico M, Costa-Lotufu L, Pessoa C, Bastos J, Tallarico P. Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. *Chem Biodivers.* 2010; 7 2941-2950.
164. Nieto R IJ, Cucaita V EdP. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata*. *Rev Col Quim.* 2007; 36 (3): 277-284.
165. Kim YJ, Park J, Min BS, Shim SH. Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Appl Bi.* 2011; 54 (2): 287-294.
166. Kanagasabapathy G, Malek SNA, Kuppusamy UR, Vikineswary S. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 2618-2626.
167. Guzmán M, Zúñiga N, Santafé GG, Torres O, Angulo A. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 2009; 7 (2): 63-69.
168. Coy B ED, Nieto R IJ. Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. *Chem Nat Compd.* 2009; 45 (2): 193-196.
169. Nieto I, Ávila I. Determinación de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del cuerpo fructífero de *Suillus luteus*. *Rev Col Quim.* 2008; 37 (3): 297-304.
170. Zha-Jun Z, Ying W, Sheng-Ping Y, Jian-Min Y. Steroids from the fungus *Pleurotus ostreatus* *Acta Botanica Sinica.* 2003; 45 (6): 753-756.
171. Tewtrakul S, Tansakul P, Daengrot C, Ponglimanont C, Karalai C. Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. *Phytomedicine.* 2010; 17 851-855.
172. Georges P, Sylvestre M, Ruegger H, Bourgeois P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids.* 2006; 71 647-652.
173. Chobot V, Opletal L, Jahodar L, Patel AV, Dacke CG, Blunden G. Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus, *Pleurotus ostreatus* (Oyster fungus). *Phytochemistry.* 1997; 45 (8): 1669-1671.
174. Mora M. Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylllophoral* colombiano. Bogotá Colombia, Magister en Ciencias Química, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

175. Joulaina D, Tabacchib R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 2: treemoss. *Flavour and Fragrance Journal*. 2009; 24 (3): 105-116.
176. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacool Toxicol*. 2005 Aug; 45: 89-118.
177. Almuti K, Rimawi R, Spevack D, Ostfeld RJ. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *Int J Cardiol*. 2006 Jul; 109 7-15.
178. Barrios-González J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010 Oct; 85 869-883.
179. Panda BP, Javed S, Ali M. Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2009; 14 123-127.
180. Panda BP, Javed S, Ali M. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food Bioprocess Tech*. 2010; 3 373-378.
181. Gupta K, Mishra PK, Srivastava P. Enhanced continuous production of Lovastatin using pellets and siran supported growth of *Aspergillus terreus* in an airlift reactor. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2009; 14 207-212.
182. Sayyad SA, Panda BP, Javed S, Ali M. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 73 1054-1058.
183. Dhale MA, Divakar S, Kumar SU, Vijayalakshmi G. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Oct; 73 1197-1202.
184. Bizukojc M, Ledakowicz S. A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2007; 130 422-435.
185. Rodríguez E, Casas JL, Vilches MA, Sánchez JA, García JL, Chisti Y. Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Biochem Eng J*. 2006; 29 1-5.
186. Xu B-J, Wang Q-J, Jia X-Q, Sung C-K. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Bioprocess Biosystems Eng*. 2005; 10 78-84.
187. Moore RN, Bigam G, Chan JK, Hogg AM, Nakashima TT, Vederas JC. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevastatin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen atoms by ^{13}C NMR and mass spectrometry. *J Am Chem Soc*. 1985; 107 3694-3701.

188. Alarcón J, Águila S. Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: effects of the C:N ratio. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 2006; 61c 95-98.
189. Alarcón J, Águila S, Arancibia-Avila P, Fuentes O, Zamorano-Ponce E, Hernández M. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal Of Biosciences*. 2003; 58c 62-64
190. Gunde-Cimerman N, Cimerman A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Exp Mycol*. 1995 March; 19 (1): 1-6.
191. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Cimerman A. *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 113 333-338.
192. Gunde-Cimerman N, Friedrich J, Cimerman A, Benicki N. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1993 May; 111 203-206.
193. Schneider I, Kressel G, Meyer A, Krings U, Berger RG, Hahn A. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *J Funct Foods*. 2011; 3 (1): 17-24.
194. Martín J, Buchberger W, Alonso E, Himmelsbach M, Aparicio I. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta*. 2011 Apr; 85 607-615.
195. Jekkel A, Konya A, Ilkoy E, Boros S, Horvath G, Suto J. Microbial Conversion of Mevinolin. *J Antibiot*. 1997; 50 (9): 750.
196. Chegwin-Angarita C, Nieto-Ramírez IJ, Atehortúa L, Sepúlveda L. Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. *Rev Colombiana Biotecnol*. 2012 Diciembre; 14 (2): 157-178.
197. Kim HJ, Lee I-S, Kang SS. Cholesterol biosynthesis inhibitors of microbial origin. *Stud Nat Prod Chem*. 2006; 33 751-784.
198. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot*. 1976; 29 (12): 1346-1348.
199. Komagata D, Yamashita H, Endo A. Microbial conversion of compactin (ML-236B) to ML-236A *J Antibiot*. 1986; 39 (11): 1574-1577.
200. Komagata D, Shimada H, Murakawa S, Endo A. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin L to monacolin J by a monooxygenase of *Monascus ruber*. *J Antibiot*. 1989; 42 (3): 407-412.
201. Li Y-G, Zhang F, Wang Z-T, Hu Z-B. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2004 Jun; 35 1101-1112.

202. Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett.* 1999 Feb; 21 253-257.
203. Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. Constituents of red yeast rice, a traditional chinese food and medicine. *J Agric Food Chem.* 2000; 48 5220-5225.
204. Chakravarti R, Sahai V. Compactin—a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 64 618-624.
205. Serizawa N, Nakagawa K, Tsujita Y, Terahara A, Kuwano H. 3-hydroxy-ML-236B (3-hydroxycompactin), microbial transformation product of ML-236B (compactin). *J Antibiot.* 1983; 36 (5): 608-610.
206. Chairote E-o, Chairote G, Niamsup H, Lumyong S. The presence and the content of Monacolins in Red Yeast rice prepared from Thai glutinous rice. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008 24 3039-3047.
207. Endo A. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J Med Chem.* 1985; 28 (4): 401-405.
208. Peng Y, Demain AL. Bioconversion of compactin to pravastatin by *Actinomadura sp.* ATCC 55678. *J Mol Catal B: Enzym.* 2000; 10 151-156.
209. Venkateswaran V, Vijayalakshmi G. Finger millet (*Eleusine coracana*) – an economically viable source for antihypercholesterolemic metabolites production by *Monascus purpureus*. *J Food Sci Technol.* 2010; 47 (4): 426-431.
210. Endo A, Keiji H. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. *J Antibiot.* 1985 Jul; 38 (3): 321-328.
211. Novak N, Gerdin S, Berovic M. Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. *Biotechnol Lett.* 1997; 19 (10): 947-948.
212. Szakács G, Morovján G, Tengerdy RP. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett.* 1998 April; 20 (4): 411-415.
213. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Feb; 58 555-564.
214. Serizawa N, Nakagawa K, Hamano K, Tsujita Y, Terahara A, Kuwano H. Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530B). *J Antibiot.* 1983; 36 (5): 604-607.
215. Joshua H, Schwartz MS, Wilson KE. L-669, 262, a potent HMG-CoA reductase inhibitor. *J Antibiot.* 1991; 44 (3): 366-370.

216. Marcin C, White R, Hirsch C, Ferris F, Sykes R, Houck D, Greasham R, Chartrain M. Bioconversion of the sodium salt of Simvastatin (MK-733) to 6-desmethyl-6- α -hydroxymethyl Simvastatin. *J Ind Microbiol.* 1991; 8 157-164.
217. Sorensen JL, Vederas JC. Monacolin N, a compound resulting from derailment of type I iterative polyketide synthase function en route to lovastatin. *Chem Commun.* 2003; 1492-1493.
218. Murakawa S, Sakai K, Endo A. Isolation of 3 α -hydroxy-3,5-dihydro ML-236C (sodium salt) from *Paecilomyces viridis* L-68. *J Antibiot.* 1994; 47 (1): 108-109.
219. Nakamura T, Komagata D, Murakawa S, Sakai K, Endo A. Isolation and biosynthesis of 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacolin L. *J Antibiot.* 1990; 42 (12): 1597-1600.
220. Serizawa N, Nakahara K, Matsuoka T. Formation of dihydroxy derivative of ML-236B from ML-236B (compactin) by lipid peroxidation *J Antibiot.* 1990; 43 (8): 1031-1033.
221. Zhuge B, Fang HY, Yu H, Rao ZM, Shen W, Song J, Zhuge J. Bioconversion of lovastatin to a novel statin by *Amycolatopsis sp.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Mar; 79 209-216.
222. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *American Health Journal.* 2002 December; 144 (6): S27-S32.
223. Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Feb; 44 379-387.
224. Erturk S, Onal A, Cetin SM. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B.* 2003 Apr; 793 193-205.
225. Gunde-Cimerman N, Plemenita A, Cimerman A. A hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor synthesized by yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Jul; 132 39-43.
226. Ye LY, Firby PS, Moore MJ. Determination of lovastatin in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. *Ther Drug Monit.* 2000 Aug; 22 737-741.
227. Chang Y-N, Huang J-C, Lee C-C, Shih I-L, Tzeng Y-M. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme Microb Technol.* 2002 Jan; 30 889-894.
228. López JLC, Pérez JAS, Sevilla JMF, Fernández FGA, Grima EM, Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb Technol.* 2003 May; 33 270-277.
229. Rajh SJ, Kreft S, Strukelj B, Vrečer F. Comparison of CE and HPLC methods for determining Lovastatin and Its oxidation products after exposure to an oxidative atmosphere. *Croat Chem Acta.* 2003 May; 76 (3): 263-268.

230. Miao X-S, Metcalfe CD. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003 Apr; 998 133-141.
231. Meyyanathan S, Ramasarma G, Suresh B. Análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento. *Ars Pharm*. 2004; 45 (2): 121-129.
232. Chen F, Hu X. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *Int J Food Microbiol*. 2005 Mar; 103 331- 337.
233. Lai L-ST, Tsai T-H, Wang TC, Cheng T-Y. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Enzyme Microb Technol*. 2005 Dec; 36 737-748.
234. Kocijan A, Grahek R, Bastarda A, Kralj LZ. Fast analysis of pravastatin in production media. *J Chromatogr B*. 2005 Jun; 822 311-315.
235. Barrett B, Huclová J, Borek-Dohalský V, Nemeč B, Jelínek I. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 May; 32 (3): 517-526.
236. Valera HR, Gomes J, Lakshmi, Gururaj R, Suryanarayan S, Kumarc D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme Microb Technol*. 2005 Oct; 37 521-526.
237. Bauer S, Mwinyi J, Stoeckle A, Gerloff T, Roots I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*. 2005 Apr; 818 257-262.
238. Yang D-J, Hwang LS. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in *Pu-Erh* tea. *J Chromatogr A*. 2006 Jun; 1119 277-284.
239. Porcel ER, López JLC, Ferro MAV, Pérez JAS, Sánchez JLG, Chisti Y. Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Biochem Eng J*. 2006; 29 1-5.
240. Lee C-L, Hung H-K, Wang J-J, Pan T-M. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under *Dioscorea* medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J Agric Food Chem*. 2007 Jul; 55 6493-6502.
241. Shaligram NS, Singh SK, Singhal RS, Szakacs G, Pandey A. Compactin production in solid-state fermentation using orthogonal array method by *P. brevicompactum*. *Biochem Eng J*. 2008; 41 295-300.

242. Nigovi B, Vegar I. Capillary electrophoresis determination of pravastatin and separation of its degradation products. *Croat Chem Acta*. 2008 Mar; 81 (4): 615-622.
243. Shen-Tu J, Xu X, Liu J, Hu X, Chen J, Wu L, Huang M, Zhou H. Determination of pitavastatin in human plasma by LC–MS–MS. *Chromatographia*. 2009; 69 (9/10): 1041-1047.
244. Chairote E-O, Lumyong S, Chairote G. Study on cholesterol lowering compounds in red yeast rice prepared from thai glutinous rice. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2010; 3 (2): 217-228.
245. Piecha M, Sarakha M, Trebse P, Kocar D. Stability studies of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using HPLC and LC–MS. *Environ Chem Lett*. 2010; 8 (2): 185-191.
246. Miranda de Andrade LR, Ikeda M, Velho do Amaral LI, Ishizuka J. Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminium stress. *Plant Physiol Biochem*. 2011; 49 55-60.
247. Martos PA, Thompson W, Diaz GJ. Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin J*. 2010 August 3(3): 205-223.
248. Bizukojc M, Pawlowska B, Ledakowicz S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2007; 127 258-268.
249. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, Lin J, Mills JB, Xu JJ, Smolarek TA. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Disposition*. 2005; 33 (4): 537-546.
250. Novakova L, Satinsky D, Solich P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *TRAC- Trends in Analytical Chemistry*. 2008; 27 (4): 352-368.
251. Álvarez-Lueje A, Pastine J, Squella JA, Nuñez-Vergara LJ. Assessment of the hydrolytic degradation of lovastatin by HPLC. *J Chil Chem Soc*. 2005; 50 (4): 639-646.
252. Quattrochi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Introducción a la HPLC - Aplicación y Práctica. Argentina 1992.
253. Piecha M. Stability and degradation studies of cholesterol-lowering statin drugs Nova Gorica, University of Nova Gorica; 2009.
254. Requena Alvarez CJ. Evaluación de la estabilidad de pravastatina. Santiago de Chile, Químico Farmacéutico, Universidad de Chile; 2006.
255. Lin Y-L, Wang T-H, Lee M-H, Su N-W. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008; 77 965-973.

256. Jia Z, Zhang X, Zhao Y, Cao X. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010; 160 2014-2025.
257. Sorrentino F, Roy I, Keshavarz T. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010; 88 65-73.
258. Pecyna M, Bizukojc M. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. *J Biotechnol*. 2011 January; 151 (1): 77-86.
259. Lai L-ST, Pan C-C, Tzeng B-K. Medium optimization for Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *J Chin Inst Chem Eng.* 2002; 33 (5): 517-527.
260. Pansuriya RC, Singhal RS. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. *Braz J Microbiol*. 2010 Jul; 41 164-172.
261. Porcel EMR, López JLC, Pérez JAS, Chisti Y. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in a two-staged feeding operation. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008; 83 1236-1243.
262. El-Shami AR, Hamed ER. Production of lovastatin by *Pleurotus ostreatus*. *Egyptian Journal of Biotechnology*. 2007 February; 25 102-110.
263. Atalla MM, Hamed ER, El-Shami AR. Optimization of a culture medium for increased mevinolin production by *Aspergillus terreus* strain. *Malays J Microbiol*. 2008; 4 (2): 6- 10.
264. Kumar MS, Jana SK, Senthil V, Shashanka V, Kumar SV, Sadhukhan AK. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochem*. 2000; 36 363-368.
265. Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67 2596-2602.
266. Lai L-ST, Pan C-C, Tzeng B-K. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochem*. 2003; 38 1317-1326.
267. López JC, Pérez JS, Sevilla JF, Fernández FA, Grima EM, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *J Chem Technol Biotechnol*. 2004; 79 1119-1126.
268. Casas J, Rodríguez E, Vilches M, Sánchez J, Fernández J, Chisti Y. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004; 31 48-50.
269. López JLC, Pérez JAS, Sevilla JMF, Porcela EMR, Chisti Y. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2005; 116 61-77.

270. Miyake T, Uchitomi K, Zhang M, Kono I, Nozaki N, Sammoto H, Inagaki K. Effects of the principal nutrients on Lovastatin production by *Monascus pilosus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70 (5): 1154-1159.
271. Gomaa MO, Bialy AHE. Pellet morphology, broth rheology and statin production in submerged fermentation of *P. citrinum*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2009; 4 (2): 75-83.
272. Osman ME, Khattab OH, Zaghlol GM, El-Hameed RMA. Optimization of some physical and chemical factors for lovastatin productivity by local strain of *Aspergillus terreus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011; 5 (6): 718-732.
273. Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot*. 1979; 32 (8): 852-854.
274. Wasser SP, Reshetnikov SV. 2002. Process for producing, methods and compositions of glucuronoxylomannan as a nutraceutical agent from higher Basidiomycetes mushroom. United States. 20020137155 Code A1.
275. Endo A, Negishi Y, Iwashita T, Mizukawa K, Hiramama M. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. *J Antibiot*. 1985; 38 (3): 444-448.
276. Seraman S, Rajendran A, Thangavelu V. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*. *Food Bioprod Process*. 2010; 88 266-276.
277. Mangunwardoyo W, Rafliyanti Y, Kusmana D. Bioprospection of lovastatin in *Aspergillus spp.* from University of Indonesi culture collection (UICC). *World Applied Sciences Journal*. 2012; 16 (2): 183-188.
278. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Cimerman A. Pleurotus fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG-CoA reductase. *FEMS Microbiology Letters*. 1993; 113 333-338.
279. Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem*. 2009; 113 9-16.
280. Wang H, Wu Y, Zhao Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2001; 36 58-70.
281. Nti-Gyabaah J, Chiew YC. Solubility of Lovastatin in ethyl acetate, propyl acetate, isopropyl acetate, butyl acetate, sec-butyl acetate, isobutyl acetate, tert-butyl acetate, and 2-butanone, between (285 and 313) K. *J Chem Eng Data*. 2008; 53 2060-2065.
282. Montti MIT. Desarrollo de nuevas metodologías para el análisis de fungicidas triazólicos en arándanos. Valencia - Concordia, Doctorado, Universidad Politécnica de Valencia; 2010.
283. Albero B, Sánchez-Brunete C, Tadeo JL. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*. 2005 66 917-924.

284. Kalaivani M, Sabitha R, Kalaiselvan V, Rajasekaran A. Health benefits and clinical impact of major nutrient, Red Yeast rice: A review. *Food Bioprocess Tech.* 2010; 3 333-339.
285. Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, Namihira T, Matsui T. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus sp.* with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009; 158 476-482.
286. Erdogrul Ö, Azirak S. A Review on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *J Sci Eng.* 2005; 8 (1): 10-15.
287. Wei P-L, Xu Z-N, Cen P-L. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation. *Journal of Zhejiang University - Science A.* 2007; 8 (9): 1521-1526.
288. Gaitán-Hernández R, Salmones D, Pérez R, Mata G. Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Xalapa, Veracruz, México 2006.
289. Holker U, Lenz J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8 301-306.
290. Gil-Ramirez A, Clavijo C, Palanisamy M, Soler-Rivas C, Ruiz-Rodriguez A, Marín FR, Reglero G, Pérez M, editors. Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 2011.
291. Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia.* 2010; 81 (7): 715-723.
292. Fan L, Pan H, Soccol AT, Pandey A, Soccol CR. Advances in mushroom research in the last decade. *Food Technol Biotechnol.* 2006; 44 (3): 303-311.
293. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm.* 2005; 2 63-80.
294. Patrick PA, Françoise FB, Sylvie R. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Cryptogamie, Mycologie.* 2006; 27 (4): 311-333.
295. Saskiawan I. Exopolysaccharide production and its bioactivities of the edible *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Biotropia.* 2009; 16 (2): 96-104.
296. El-Enshasy H, Daba A, El-Demellawy M, Ibrahim A, El Sayed S, El-Badry I. Bioprocess development for large scale production of anticancer exo-polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *J Appl Sci.* 2010; 10 (21): 2523-2529.
297. Gutierrez A, Prieto A, Martlnez AT. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydr Res.* 1996; 281 143-154.

298. Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PAJ, Iacomini M. A glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydr Polym.* 2006 66 252-257.
299. Pramanik M, Mondal S, Chakraborty I, Rout D, Islam SS. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr Res.* 2005; 340 629-636.
300. Tao Y, Zhang L, Cheung PCK. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydr Res.* 2006; 341 2261-2269.
301. Zhang B-B, Cheung PCK. Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 1210-1216.
302. Yang F-C, Ke Y-FK, Shanq-Shin. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb Technol.* 2000; 27 295.
303. Ribeiro B, Guedes de Pinho P, Andrade PB, Baptista P, Valentao P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchem J.* 2009; 93 (1): 29-35.
304. Dimou DM, Georgala A, Komaitis M, Aggelis G. Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus spp.* and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol Res.* 2002; 106 (8): 925.
305. Petrova RD, Wasser SP, Mahajna JA, Denchev CM, Nevo E. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *Int J Med Mushr.* 2005; 7 141-155.
306. Hyde KD, Bahkali AH, Moslem MA. Fungi—an unusual source for cosmetics. *Fungal Divers.* 2010; 43 1-9.
307. Rathee S, Rathee D, Rathee D, Kumar V, Rathee P. Mushrooms as therapeutic agents. *Braz J Pharmacog.* 2012; 22 (2): 459-474.
308. Liu J-K. Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity. *Drug Discov Ther.* 2007; 1 (2): 94-103.
309. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28 (3): 350-356.
310. Certik M, Adamechova Z. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology.* 2009; 21 (11-12): 250-253.
311. Daglioglu O, tasan M, Tuncel B. Determination of fatty acid composition and total trans fatty acids in cereal-based turkish foods. *Turk J Chem.* 2002; 26 705-710.

312. Zhou Z, Blanchard C, Helliwell S, Robardsa k. Fatty acids composition of three rice varieties following storage. *J Cereal Sci.* 2002; 00 1-9.
313. Moreau RA, Lampi A-M, Hicks KB. Fatty acid, phytosterol, and polyamine conjugate profiles of edible oils extracted from corn germ, corn fiber, and corn kernels. *J Am Oil Chem Soc.* 2009; 86 1209-1214.
314. Prabhasankar P, Sudha ML, Rao PH. Quality characteristics of wheat flour milled streams. *Food Res Int.* 2000; 33 381-386.
315. Yoshida H, Tanigawa T, Kuriyama I, Yoshida N, Tomiyama Y, Mizushina Y. Variation in fatty acid distribution of different acyl lipids in rice (*Oryza sativa L.*) brans. *Nutrients.* 2011; 3 505-514.
316. Norstrom K, Olssona A, Olsson M, Bergmana A. Bis(4-chlorophenyl) sulfone (BCPS) in Swedish marine and fresh water wildlife—a screening study. *Environ Int.* 2004; 30 667- 674.
317. Jörundsdottir H, Norström K, Olsson M, Pham-Tuan H, Hühnerfuss H, Bignert A, Bergman A. Temporal trend of bis(4-chlorophenyl) sulfone, methylsulfonyl-DDE and -PCBs in Baltic guillemot (*Uria aalge*). *Environ Pollut.* 2006; 141 226-237.
318. Salmeron I, Charalampopoulos PFD, Pandiella SS. Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. *Food Chem.* 2009; 117 265-271.
319. Korycinsk M, Czelna K, Jaromin A, Kozubek A. Antioxidant activity of rye bran alkylresorcinols and extracts from whole-grain cereal products. *Food Chem.* 2009; 116 1013-1018.
320. Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 2002; 79 (1-2): 131-141.
321. Piškur B, Bajc M, Robek R, Humar M, Sinjur I, Kadunc A, Oven P, Rep G, Petkovšek SAS, Kraigher H, Jurc D, Pohleven F. Influence of *Pleurotus ostreatus* inoculation on wood degradation and fungal colonization. *Bioresour Technol.* 2011; 102 10611-10617.
322. Kavishree S, Hemavathy J, Lokesh BR, Shashirekha MN, Rajarathnam S. Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chem.* 2008; 106 (2): 597-602.
323. Yilmaz N, Solmaz M, Turkecul I, Elmastas M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chem.* 2006; 99 168-174.
324. Papaspyridi L-M, Aligiannis N, Christakopoulos P, Skaltsounis A-L, Fokialakis N. Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Sci.* 2011; 1 1746 - 1752.
325. Gutierrez A, Caramelo L, Prieto A, Martinez MJ, Martinez AT. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994; 1783-1788.

326. Arwidsson Z, Johansson E, Kronhelm Tv, Allard B, Hees Pv. Remediation of metal contaminated soil by organic metabolites from fungi I—production of organic acids. *Water Air Soil Poll.* 2010; 205 215-226.
327. Agoramoorthy G, Chandrasekaran M, Venkatesalu V, Hsu MJ. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Braz J Microbiol.* 2007; 38 739-742.
328. Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: A Review. In: Mendez-Vilas A, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Spain: Formatex Research Center; 2011. p. 61-71.
329. Harada H, Yamashita U, Kurihara H, Fukushi EK, J, Kamei Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Res.* 2002; 22 (5): 2587-2590.
330. Chan Y-Y, Chang C-S, Chien L-H, Wu T-F. Apoptotic effects of a high performance liquid chromatography (HPLC) fraction of *Antrodia camphorata* mycelia are mediated by down-regulation of the expressions of four tumor-related genes in human non-small cell lung carcinoma A549 cell. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127 (3): 652.
331. Aydin HH, Celik HA, Deveci R, Karacalı S, Saydam G, Omay SB, Batur Y. Induction of apoptosis by fatty acid ethyl esters in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43 139-145.
332. Laposata M. Fatty acid ethyl esters: nonoxidative ethanol metabolites with emerging biological and clinical significance. *Lipids.* 1999; 34 S281-S285.
333. Petrova A, Alipieva K, Kostadinova E, Antonova D, Lacheva M, Gjosheva M, Popov S, Bankova V. GC-MS studies of the chemical composition of two inedible mushrooms of the genus *Agaricus*. *Chem Cent J.* 2007 1(33): 1-5.
334. Pinho PGd, Ribeiro B, Gonçalves RF, Baptista P, Valentão P, Seabra RM, Andrade PB. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2008; 56 1704-1712.
335. Misharina TA, Mukhutdinova SM, Zharikova GG, Terenina MB, Krikunova NI, Medvedeva IB. The composition of volatile components of dry cepe and oyster mushroom. *Appl Biochem Microbiol.* 2009; 45 (5): 544-549.
336. Samchai S, Seephonkai P, Kaewtong C. Two indole derivatives and phenolic compound isolated from mushroom *Phellinus linteus*. *Chin J Nat Med.* 2011; 9 (3): 173–175.
337. Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ Chem Lett.* 2012; 10 325-347.

338. Crespo R, Pedrini N, Juárez MP, Dal Bello GM. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol Res.* 2008; 163 (2): 148-151.
339. Kawabe T, Morita H. Volatile components in culture fluid of *Polyporus tuberaster*. *J Agric Food Chem.* 1993; 41 637-640.
340. Harris V, Ford CM, Jiranek V, Grbin PR. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 81 1117-1127.
341. Terpinc P, Polak T, Segatin N, Hanzlowsky A, Ulrich NP, Abramovic H. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry.* 2011; 128 (1): 62-69.
342. Lau APS, Lee AKY, Chan CK, Fang M. Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmos Environ.* 2006; 40 (2): 249-259.
343. Muszynska B, Sułkowska-Ziaja K. Analysis of indole compounds in edible Basidiomycota species after thermal processing. *Food Chem.* 2012; 132 455-459.
344. Li G, Wang X, Zheng L, Li L, Huang R, Zhang K. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. *Ann Microbiol.* 2007; 57 (4): 527-529.
345. Tang L, Ban SR, Feng XE, Lin WH, Li QS. Synthesis and activities of new 4-hydroxy benzoxazolone derivatives. *Chin Chem Lett.* 2010; 21 63-66.
346. Ng TB, Ling JML, Wang Z-T, Cai JN, Xu GJ. Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *Gen Pharmacol.* 1996; 27 (7): 1237-1240.
347. Ziegenbein FC, Hanssen H-P, König WA. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallendus*. *Phytochemistry.* 2006; 67 202-211.
348. Mohamed EM. Chemical profile, agaritine and selenium content of *Agaricus bisporus*. *Braz Arch Biol Technol.* 2012; 55 (6): 911-920.
349. Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Hasan MM. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *J Chromatogr Sci.* 2012; 50 358-367.
350. Mazurkiewicz W, Rydel K, Pogocki D, Lemieszek MK, Langner E, Wojciechrzeski. Separation of an aqueous extract *Inonotus obliquus* (Chaga) a novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2010; 67 (4): 397-406.
351. Petrović J, Glamočlija J, Stojković DS, Ćirić A, Nikolić M, Bukvički D, Guerzoni ME, Soković MD. *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *A. flavus* in tomato paste. *Food Chem Toxicol.* 2013; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.021>

352. Richoll SM, Colon I. Determination of triphenylphosphine oxide in active pharmaceutical ingredients by hollow-fiber liquid-phase microextraction followed by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2006 1127 147-153.
353. Vamanu E. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 1-9.
354. Diamantopoulou P, Papanikolaou S, Kapoti M, Komaitis M, Aggelis G, Philippoussis A. Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 167 536-551.
355. El-Dein MMN, El-Fallal AA, Toson E-SA, Hereher FE. Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: factors affecting formation and their structures. *Pak J Biol Sci*. 2004; 7 (6): 1078-1084.
356. Rufián-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chem*. 2009; 114 93-99.
357. Henry RJ, Saini HS. Characterization of cereal sugar and oligosaccharides. *Cereal Chem*. 1989; 66 (5): 362-365.
358. Hsieh C, Wang H-L, Chen C-C, Hsu T-H, Tseng M-H. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. *Biochem Eng J*. 2008; 38 198-205.
359. Mahapatra S, Banerjee D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiology Insights* 2013; 6 1-16.
360. Elisashvil V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (Review) *Int J Med Mushr*. 2012; 14 (3): 211-239
361. Chang M-Y, Tsai G-J, Houg J-Y. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microb Technol*. 2006; 38 407-414.
362. Vahos DFR. Validación y estandarización de métodos analíticos para la cuantificación de intrapolisacáridos, exopolisacáridos y ácidos ganodéricos a partir del cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*. Medellín, Master en Biología, Universidad De Antioquia; 2006.
363. Hassegawa RH, Kasuya MCM, Vanetti MCD. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electron J Biotechnol*. 2005; 8 (2): 212-217.

364. Kim HO, Lim JM, Joo JH, Kim SW, Hwang HJ, Choi JW, Yun JW. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour Technol.* 2005; 96 1175-1182.
365. Cho EJ, Oh JY, Chang HY, Yun JW. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *J Biotechnol.* 2006; 127 129-140.
366. Ohga CPPS. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chem.* 2007; 105 641-646.
367. Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb Technol.* 2004; 35 369-376.
368. Wu J, Ding Z-Y, Zhang K-C. Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 39 743-749.
369. Gao H, Gu W-Y. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochem Eng J.* 2007; 33 202-210.
370. Shu C-H, Lung M-Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.* 2004; 39 931-937.
371. Shu C-H, Lung M-Y. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Chin Inst Chem Eng.* 2008; 39 1-8.
372. Furlan S, Virmond L, Miers D, Bonatti M, Gern R. Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World J Microbiol Biotechnol.* 1997; 13 689-692.
373. Seo MJ, Kim MJ, Lee HH, Kim SR, Kang BW, Park JU, Rhu EJ, Choi YH, Jeong YK. Initial acidic pH is critical for mycelial cultures and functional exopolysaccharide production of an edible mushrooms, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* JM27. *The Journal of Microbiology.* 2010; 48 (6): 881-884.
374. Akamatsu Y, Law J. The enzymatic syntheses of fatty acid methyl esters by carboxyl group alkylation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1970; 245 (4): 709-713.
375. Sanseera D, Niwatananun W, Liawruangrath S, Baramée A, Banyong K, Pyne S, Liawruangrath B. Comparison of chemical constituents and antibacterial activities and antioxidants activities of essential oil from leaves and fruits of *Bridelia retusa* (L.) A. Juss *Journal of Scientific & Industrial Research.* 2012; 71 733-739.
376. Itoh T, Kikuchi Y, Tamura T, Matsumoto T. Two 3-oxo steroids in *Thea sinensis* seeds. *20.* 1981; 1 175-176.
377. Ulubelen A, Topcu G. Chemical and biological investigations of *Salvia* species growing in Turkey. *Stud Nat Prod Chem.* 1997; 20 (Part F): 659-719.

378. Wakana D, Kawahara N, Goda Y. Three new triterpenyl esters, codonopilates A–C, isolated from *Codonopsis pilosula*. *Journal of Natural Medicines*. 2011; 65 18-23.
379. Toledo Marante FJ, Mioso R, Bermejo JB, González G JE, Santana R JJ, Bravo de Laguna IH. Structural characterization and metabolite profiling of the facultative marine fungus *Paecilomyces variotii*. *Ann Microbiol*. 2012; 62 1601-1607.
380. Shi S, Valle-Rodríguez JO, Khoomrung S, Siewers V, Nielsen J. Functional expression and characterization of five wax ester synthases in *Saccharomyces cerevisiae* and their utility for biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels* 2012; 5 (7): 1-10.
381. Fan-Chiang Y, Chun-Bun L. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem*. 1998; 33 (5): 547-553.
382. Lee KM, Lee SY, Lee HY. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J Biosci Bioeng*. 1999; 88 (6): 646-650.
383. Ya-Jie T, Li-Wen Z, Hong-Mei L, Dong-Sheng L. Submerged culture of mushrooms in bioreactors – challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol Biotechnol*. 2007; 45 (3): 221-229.
384. Rajarathnam S, Shashirekha MNj, Bano Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. *Crit Rev Biotechnol*. 1998; 18 (2 -3): 91-236.
385. Dávila G, Vázquez-Duhalt R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 2006; 30 29-55.
386. Díaz G R. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala, Maestría en Ciencias en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional; 2009.
387. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci*. 2007; 172 861-875.
388. Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S, Fischer R. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol*. 2010; 64 585-610.
389. Chih-Yu W, Chun-Chong F, Yung-Chuan L. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J*. 2007; 37 21-25.
390. Choul-Gyun L, Bernhard P. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol Progr*. 1996; 12 249-256.
391. Shotipruk A, Kaufman PB, Wang HY. Conceptual design of LED-based hydroponic photobioreactor for high-density plant cultivation. *Biotechnol Progr*. 1999; 15 1058-1064.

392. Yen H-W, Yang Y-C. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol.* 2012; 107 539-541.
393. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue Light Emitting Diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng.* 2006; 102 (5): 442-446.
394. Katsuda T, Shiraishi H, Ishizu N, Ranjbar R, Katoh S. Effect of light Intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng.* 2008; 105 (3): 216-220.
395. Lababpour A, Shimahara K, Hada K, Kyoui Y, Katsuda T, Katoh S. Fed-batch culture under illumination with blue Light Emitting Diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng.* 2005; 100 (3): 339-342.
396. Purschwitz J, Muller S, Kastner C, Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9 566-571.
397. Ramírez DA, Muñoz SV, Atehortua L, Jr FCM. Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresour Technol.* 2010; 101 9213-9220.
398. Linden H, Ballario P, Macino G. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 1997; 22 141-150.
399. Silva F, Torres-Martínez S, Garre V. XX Congreso Nacional de Microbiología SEM. Genes white-collar de *Mucor circinelloides* y regulación de la expresión génica por la luz. España2005.
400. Yusef HM, Allam ME. The effect of light on growth and sporulation of certain fungi. *Mycopathologia.* 1967; 33 (2): 81-89.
401. Babitha S, Carvahlo JC, Soccol CR, Pandey A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24 2671-2675.
402. Kertesz-Chaloupkova K, Walser PJ, Granada JD, Aeb M, Kues U. Blue light overrides repression of asexual sporulation by mating type genes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genet Biol.* 1998; 23 95-109.
403. Terashima K, Yuki K, Muraguchi H, Akiyama M, Kamada T. The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics.* 2005; 171 101-108.

404. Schmidt-Heydt M, Rüfer C, Raupp F, Bruchmann A, Perrone G, Geisen R. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *Int J Food Microbiol.* 2011; 145 229-237.
405. Corrochano LM. Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus.* 2011; 2 (1): 25-28.
406. Zapata PA, Rojas DF, Ramírez DA, Fernández C, Atehortúa L. Effect of different light-emitting diodes on mycelial biomass production of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae). *Int J Med Mushr.* 2009; 11 (1): 93-96.
407. Cheng C-W, Chen C-K, Chang C-J, Chen L-Y. Effect of colour LEDs on mycelia growth of *Aspergillus ficuum* and phytase production in photo-fermentations. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2012; 106 81-86.
408. Miyake T, Mori A, Kii T, Okuno T, Usui Y, Sato F, Sammoto H, Watanabe A, Kariyama M. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005; 32 103-108.
409. Jiun-Yan W, Hua-Bing C, Mei-Jheng C, Shu-Chen K, Chwen-Jen S, Yung-Chuan L. Quantitative analysis of LED effects on edible mushroom *Pleurotus eryngii* in solid and submerged cultures. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013; 88 1841-1846.
410. Nakano Y, Fujii J, Kojima M. Identification of blue-light photoresponse genes in Oyster mushroom mycelia. *Biosci, Biotechnol, Biochem.* 2010; 74 (10): 2160-2165.
411. Richartz G, Maclellan AJ. Action spectra for hyphal aggregation, the first stage of fruiting, in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Photochem Photobiol.* 1987; 45 815-820.
412. Arjona D, Aragón C, Aguilera JA, Ramírez L, Pisabarro AG. Reproducible and controllable light induction of in vitro fruiting of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycol Res.* 2009; 113 (5): 552-558.
413. Ya-Jie T, Li-Wen Z. Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu²⁺. *Biotechnol Progress.* 2010; 26 (2): 417-423
414. Li-Wen Z, Ya-Jie T. Significance of protein elicitor isolated from *Tuber melanosporum* on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides during the fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess Biosystems Eng.* 2010; 33 999-1005.
415. Morocho MAR, Hernández CV. Caracterización óptica de Diodos emisores de Luz mediante su espectros de emisión y patrones de radiación. *Scientia et Technica Año XVII.* 2012; 17 (51): 66-70.

416. Collins JW, La Ragione RM, Woodward MJ, Searle LEJ. Application of prebiotics and probiotics in livestock. In: Charalampopoulos D, Rastall RA, editors. Prebiotics and probiotics science and technology New York: Springer New York; 2009. p. 1123-1192.
417. Fernandes RA, Kumar P. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-mevalonolactone via cyclic sulfate methodology. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1999; 10 4349-4356.
418. Louis ED, Factor-Litvak P, Liu X, Vonsattel J-PG, Galecki M, Jiang W, Zheng W. Elevated brain harmaline (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) in essential tremor cases vs. controls. *Neurotoxicology*. 2013; 38 131-135.
419. Sampietro DA, Jimenez CM, Belizán MM, Vattuone MA, Catalán CAN. Development and validation of a micromethod for fast quantification of 5-n-alkylresorcinols in grains and whole grain products. *Food Chem*. 2013; 141 3546-3551.
420. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, Having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*. 1976 December 72 (2):
421. Kozubek A. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem Rev*. 1999; 99 (1): 1-25.
422. Jamaluddin FM, Suhaila, Lajis N. Hypoglycaemic effect of Stigmast-4-en-3-one, from *Parkia speciosa* empty pods. *Food Chem*. 1995; 54 9-13.
423. Sujatha S, Anand S, Sangeetha KN, Shilpa K, Lakshmi J, Balakrishnan A, Lakshmi BS. Biological evaluation of (3 β)-stigmast-5-en-3-ol as potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using in vitro model. *Int J Diabetes Mellit*. 2010; 2 101-109.
424. Arnold N, Palfner G, Schmidt J, Kuhnt C, Becerra J. Chemistry of the aroma bouquet of the edible mushroom "lebre" (*Cortinarius lebre*, basidiomycota, agaricales) from Chile. *J Chil Chem Soc*. 2012; 57 (3):
425. Rojas JR. Estudio químico y de potencial antimicrobiano del estipite de Shiitake (*Lentinula edodes*) y su factilidad de empleo como ingrediente nutraceútico en la preparación de alimento aviar. Bogotá Colombia, Magister en Ciencias - Química, Universidad Nacional de Colombia; 2012.
426. Nitschke J, Modick H, Busch E, von Rekowski RW, Altenbach H-J, Mölleken H. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chem*. 2011; 127 (2): 791-796.
427. Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*. 2003; 13 81-84.
428. Ashokkumar B, Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Optimization of media for fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochem*. 2001; 37 331-338.

429. Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochem.* 2007; 42 1191-1199.
430. Fenice M, Sermann GG, Federici F, D'Annibale A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol.* 2003; 100 77-85.
431. Asaff A, Cerda-Garcia-Rojas CM, Viniestra-Gonzalez G, Torre Mdl. Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochem.* 2006; 41 1303-1310.
432. Liu D-Z, Liang H-J, Chen C-H, Su C-H, Lee T-H, Huang C-T, Hou W-C, Lin S-Y, Zhong W-B, Lin P-J, Hung L-F, Lian Y-C. Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113 45-53.
433. Tang Y, Li Y-Y, Li H-M, Wan D-J, Tang Y-J. Comparison of lipid content and fatty acid composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 4736-4742.
434. Chen S-Y, Ho K-J, Hsieh Y-J, Wang L-T, Mau J-L. Contents of lovastatin, g-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Science and Technology.* 2012; 47 274-278.
435. Won S-Y, Park E-H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96 555-561.
436. Carvajal AESS, Koehnlein EA, Soares AA, Eler GJ, Nakashima ATA, Bracht A, Peralta RM. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. *LWT Food Science and Technology.* 2012; 46 493-499.
437. Hadar Y, Cohen-Arzi E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51 (6): 1352-1354.
438. Mata G, Sánchez CO, Merlo RP. Inóculo suplementado: evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café. *Rev Mex Micol.* 2011; 34 53-61.
439. Silveira MLL, Furlan SA, Ninow JL. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2008; 28 (4): 858-862.

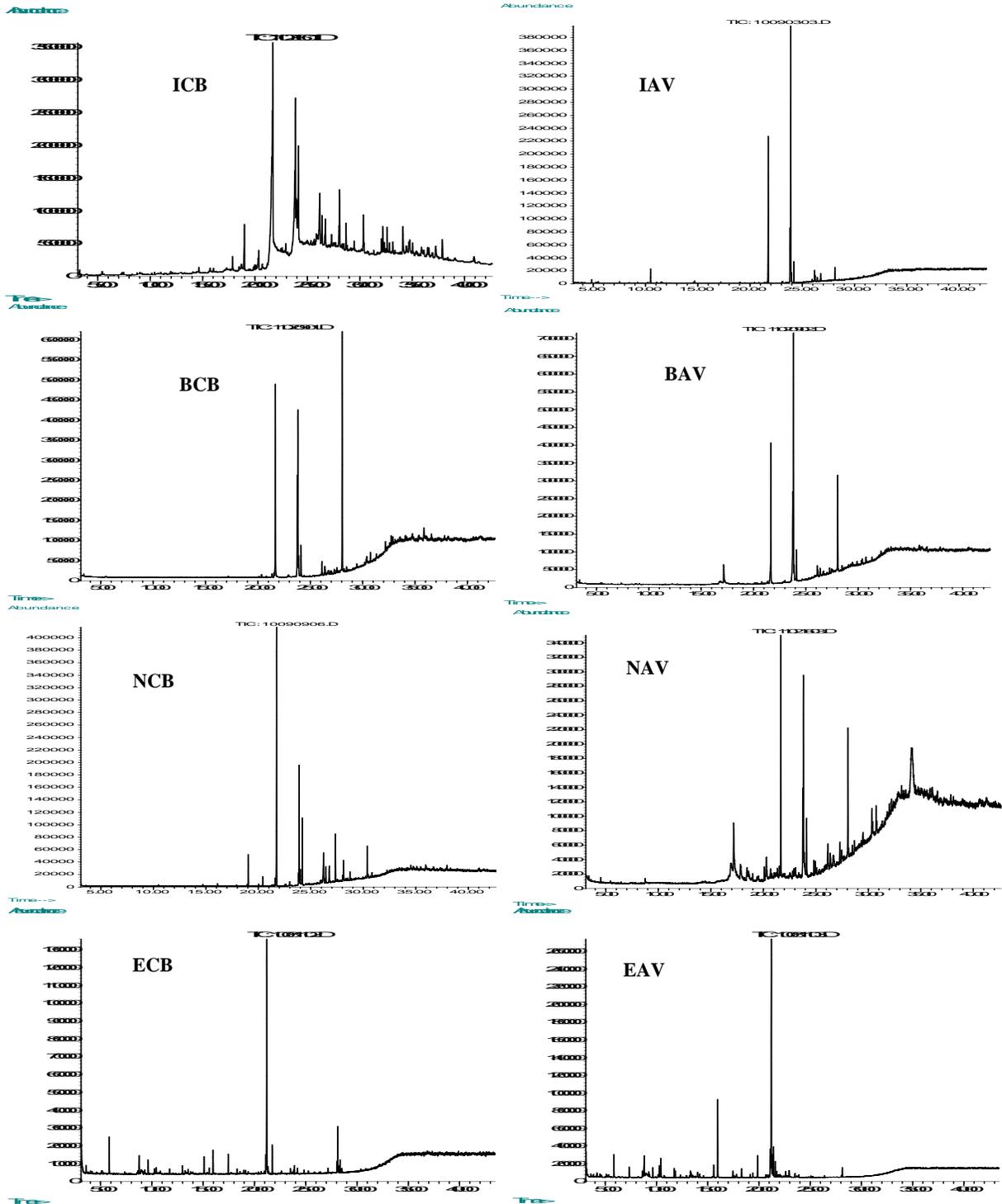
440. Abdullah N, Ismail R, Khir J NM, Annuarba MSM. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) QuéL by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae*. 2013; 161 65-69.
441. Labuschagne PM, Eicker A, Aveling TA, Meillon S, Smith MF. Influence of wheat cultivars on straw quality and *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresour Technol*. 2000; 71 71-75.
442. Rosado FR, Kemmelmeier C, Costa SMGd. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible Brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* SING. *J Basic Microbiol*. 2002; 42 (1): 37-44.
443. Toro GVd, Doroteo LA, Paramo ED, Aguilar MEG. Obtención de inóculo-grano de *Pleurotus spp.* a partir de cultivo líquido de micelio. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán2007.
444. Doroteo LA. Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus spp.* México, D.F, Maestría en Ciencias en Bioprocesos, Instituto Politecnico Nacional; 2007.
445. Pant D, Reddy UG, Adholeya A. Cultivation of oyster mushrooms on wheat straw and bagasse substrate amended with distillery effluent. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006; 22 267-275.
446. Salmenes D, Mata G. Determinación de la variabilidad de respuesta de micelios de *Pleurotus* vs. *Trichoderma* en medios de cultivo con derivados solubles de lignina y pulpa de café. *Rev Mex Micol*. 2007; 25 77-81.
447. Salmenes D, Gaitán-Hernández R, Pérez R, Guzmán G. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Rev Iberoam Micol*. 1997; 14 173-176.
448. Villares A, Mateo-Vivaracho L, García-Lafuente A, Guillamón E. Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. *Food Chem*. 2014; 147 252-256.
449. Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J*. 2009; 44 13–18.
450. Liu P, Li H-M, Tang Y-J. Comparison of free amino acids and 5'-nucleotides between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chem*. 2012; 132 1413-1419.
451. Barrios-González J, Baños JG, Covarrubias AA, Garay-Arroyo A. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 79 179-186.
452. Fazaeli H, Masoodi ART. Spent wheat straw compost of *Agaricus bisporus* mushroom as ruminant feed. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2006; 19 (6): 845-851.

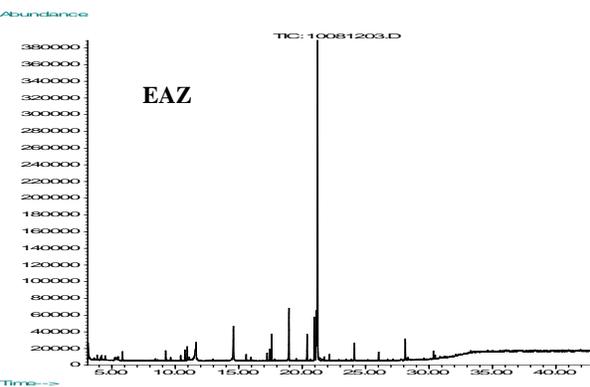
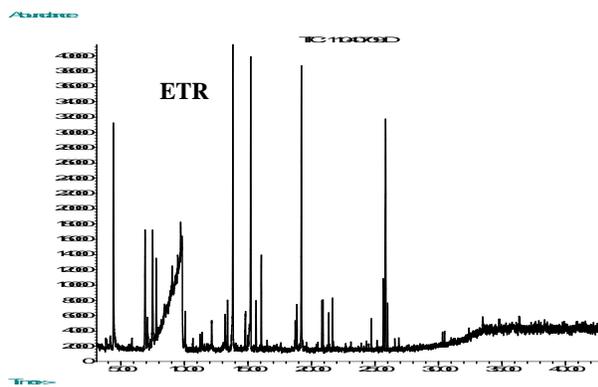
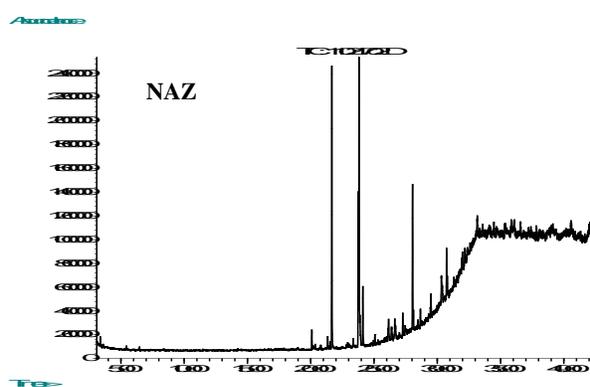
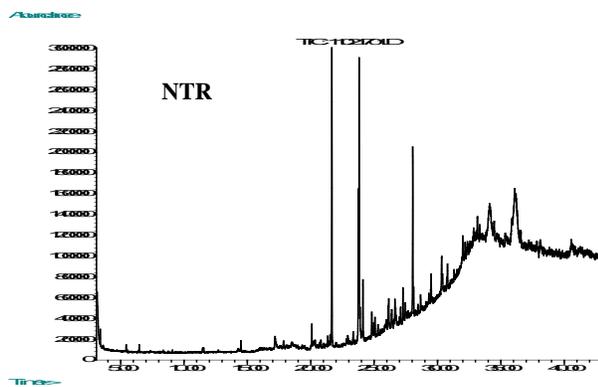
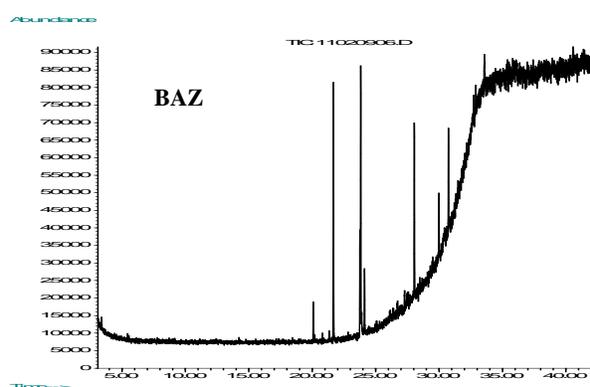
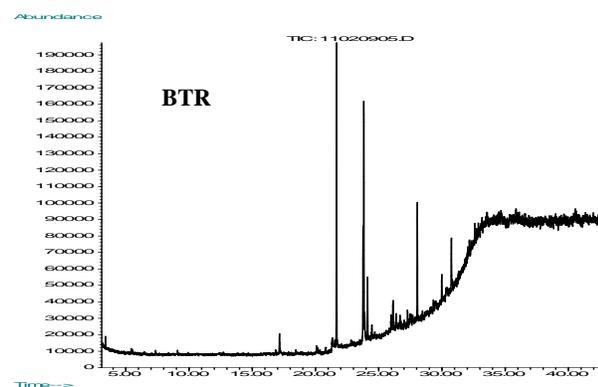
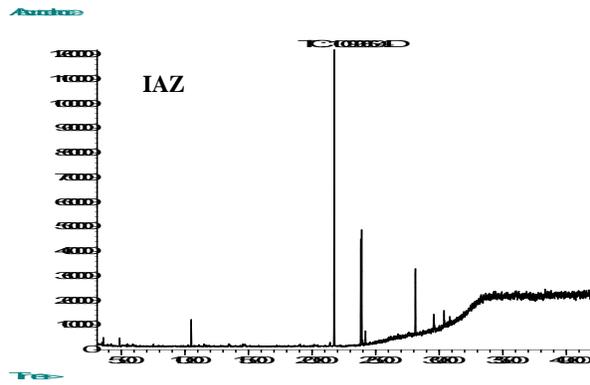
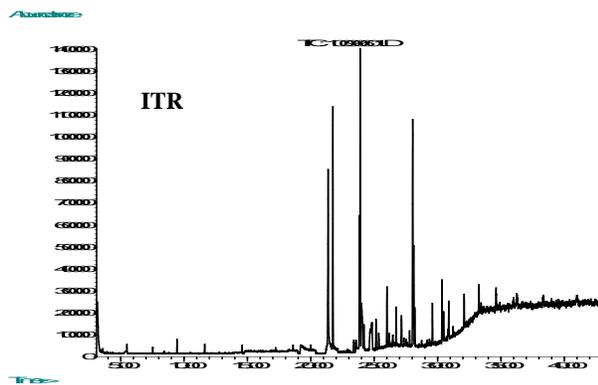
-
453. Okano K, Fukui S, Kitao R, Usagawa T. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 136 (3-4): 240-247.
454. Suarez C. Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake) para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional Bogotá - Colombia, Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia; 2012.

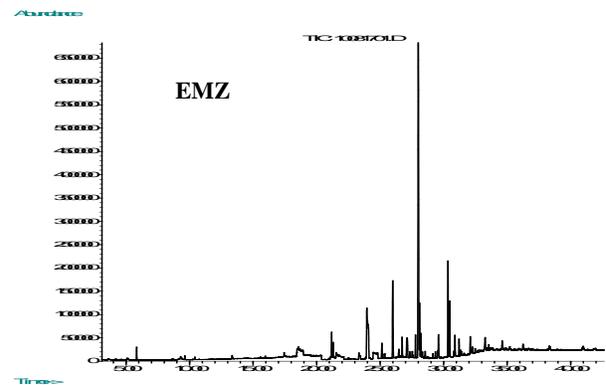
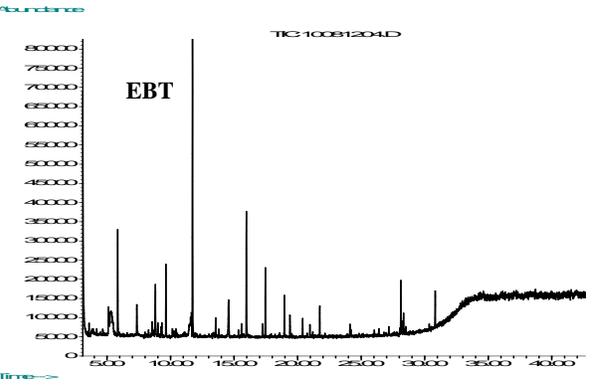
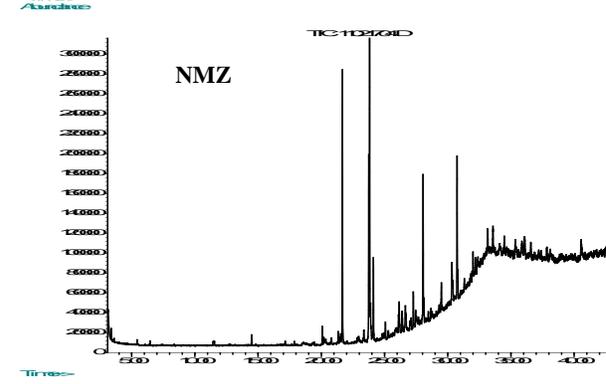
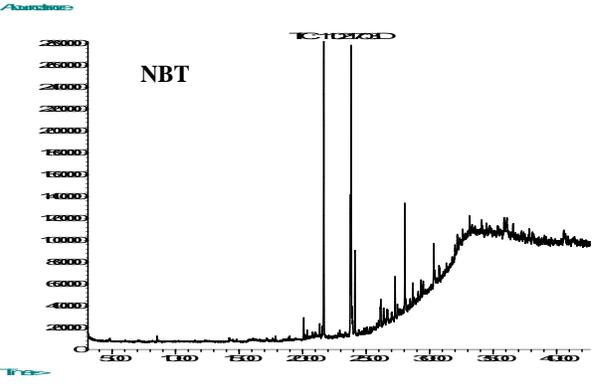
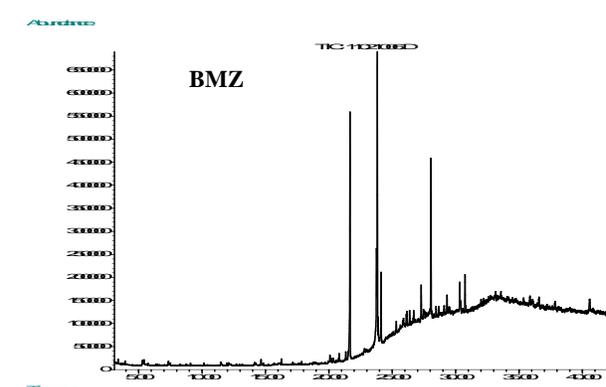
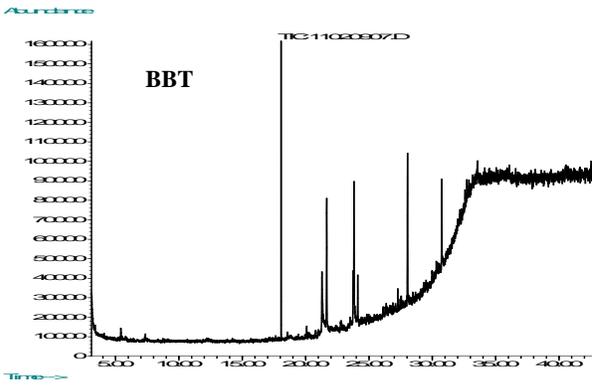
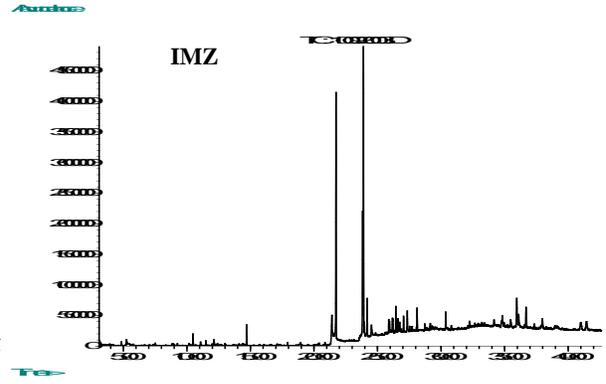
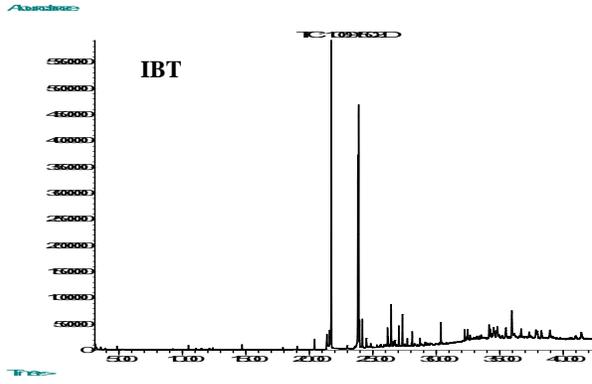
Anexos

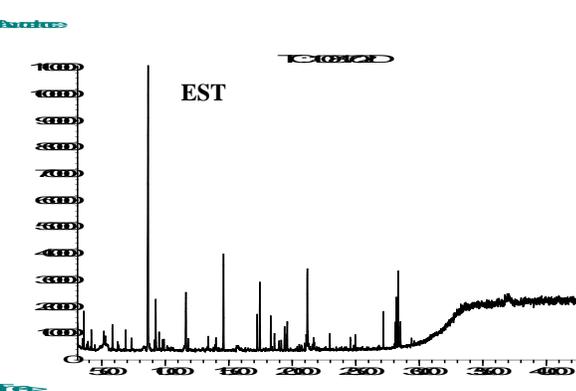
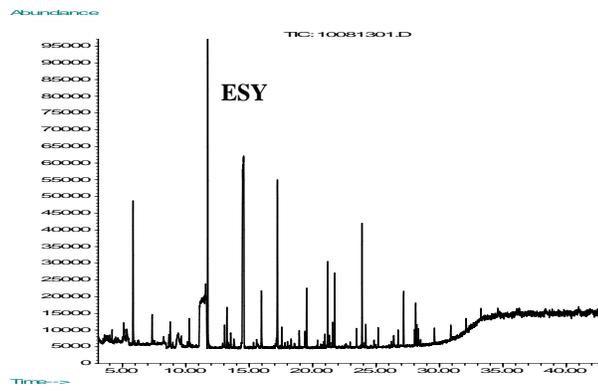
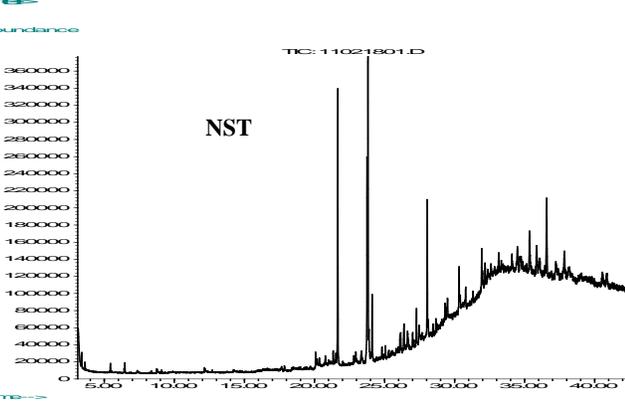
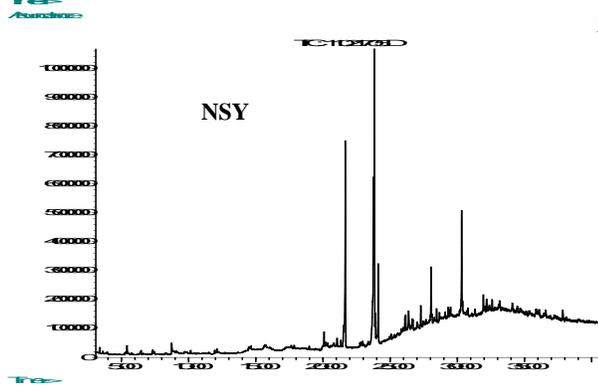
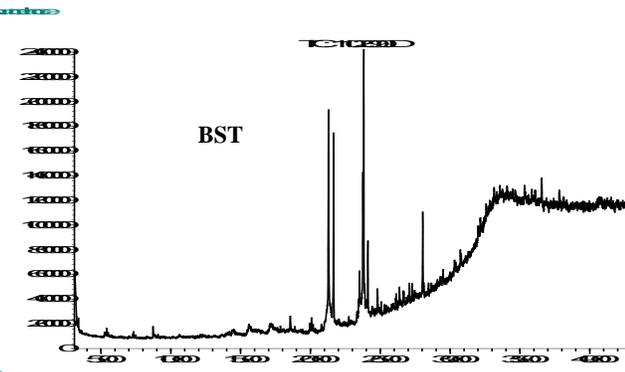
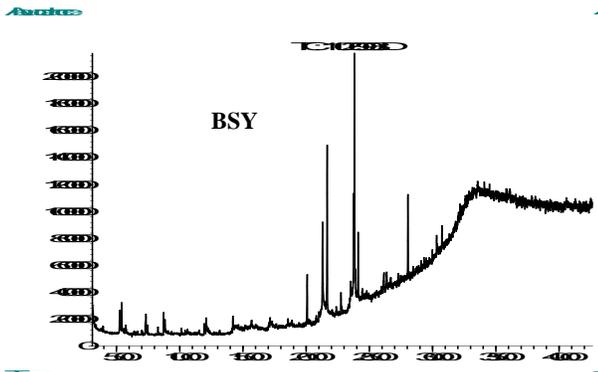
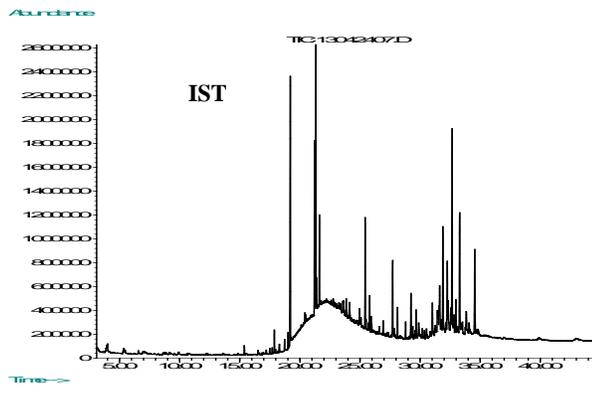
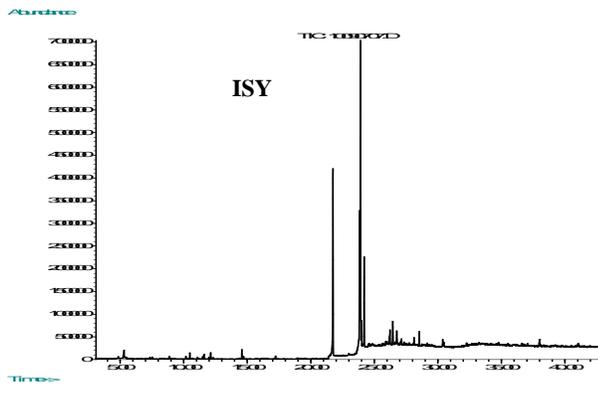
ANEXO 2A

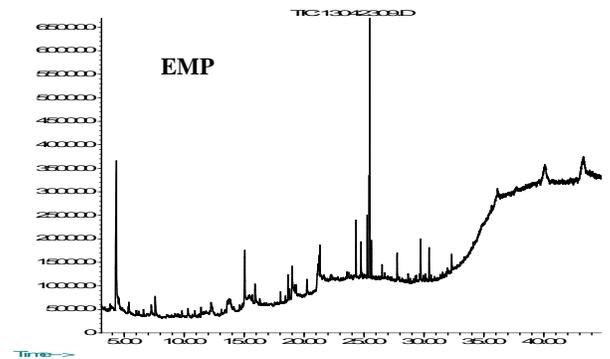
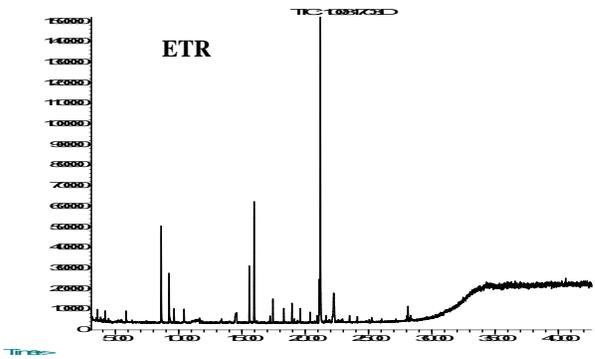
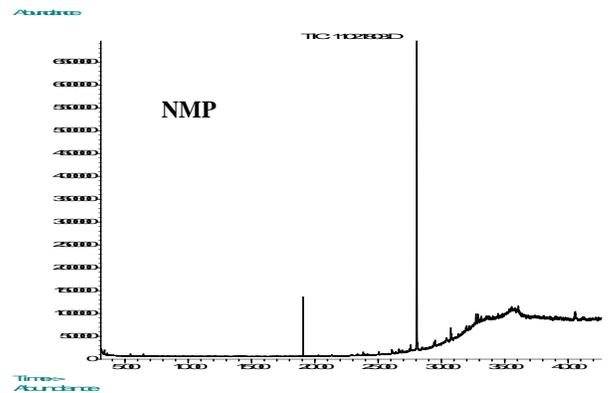
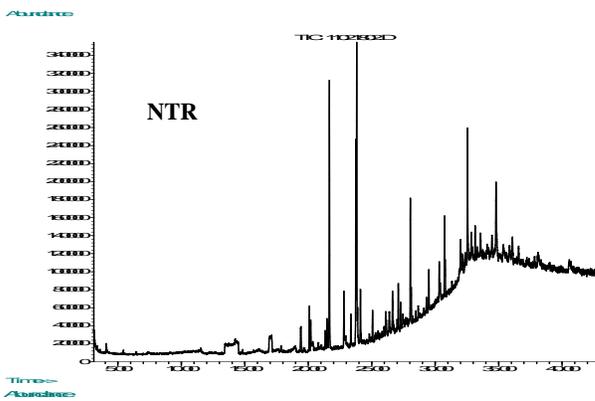
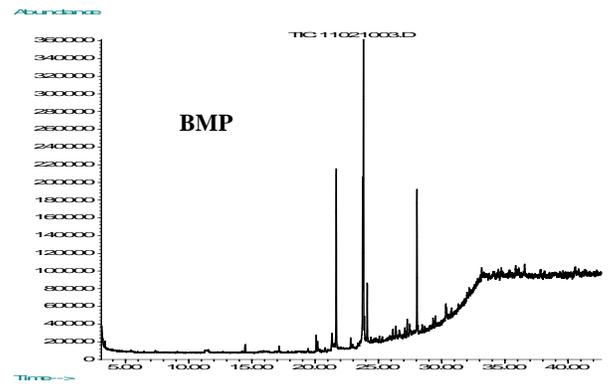
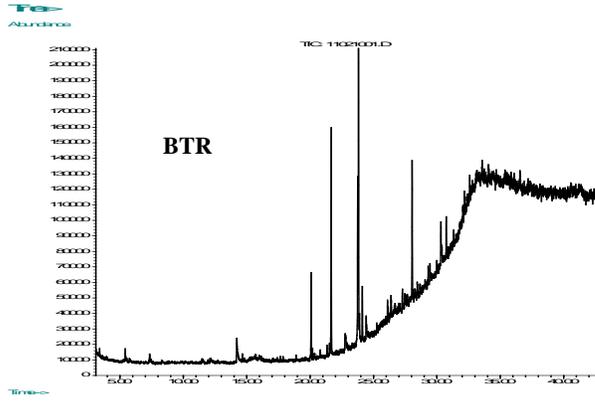
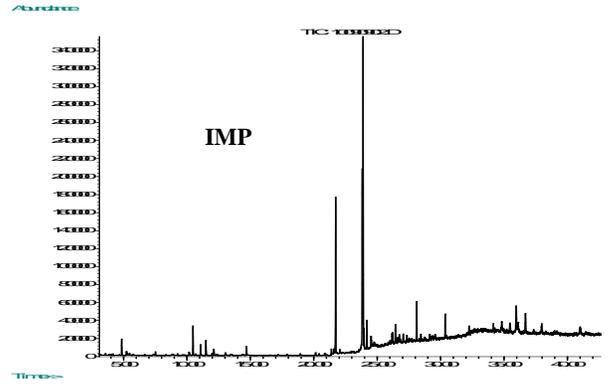
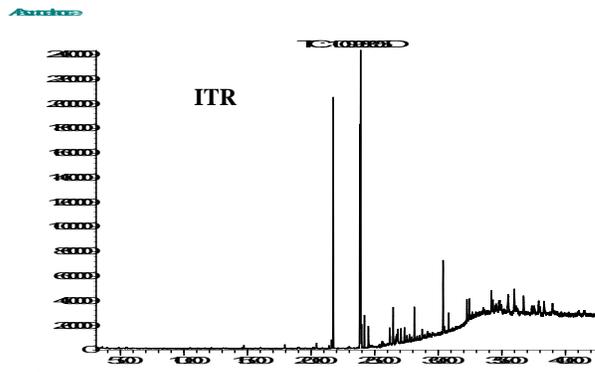
Comparación por CG de los extractos en AcOEt del micelio (**I**), del producto de la hidrólisis a pH básico (**B**) y después de la neutralización (**N**) de *Pleurotus ostreatus* cultivado por FEL con doce fuentes de carbono. **CB** harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soya; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo

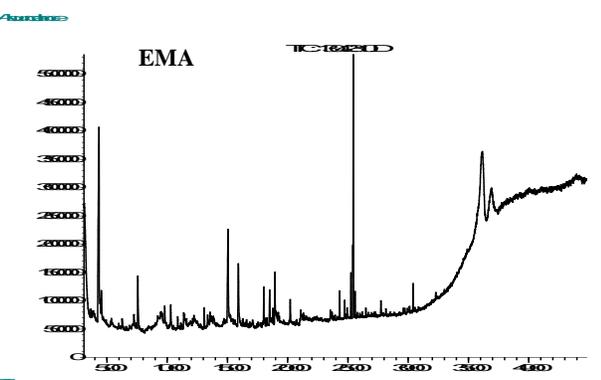
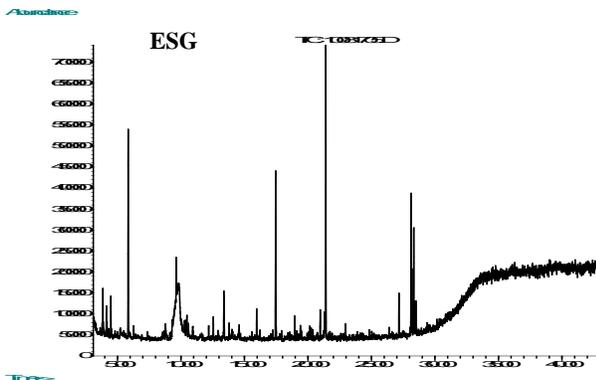
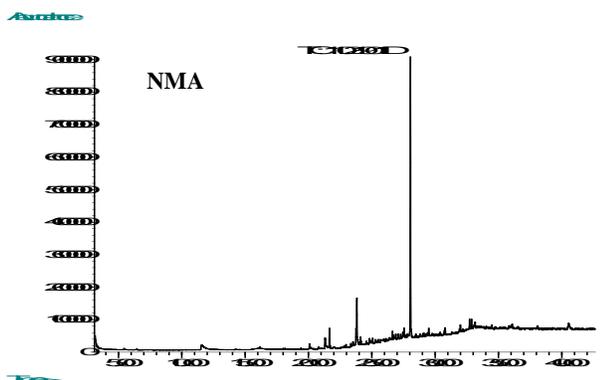
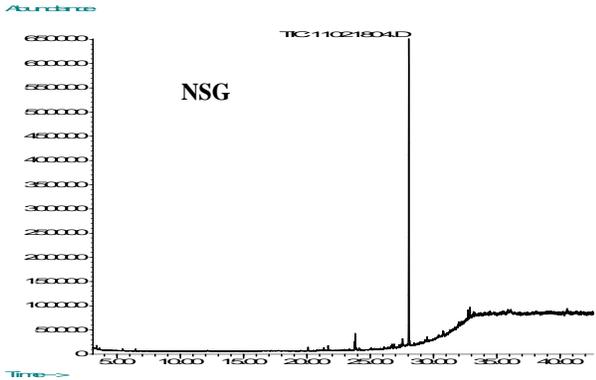
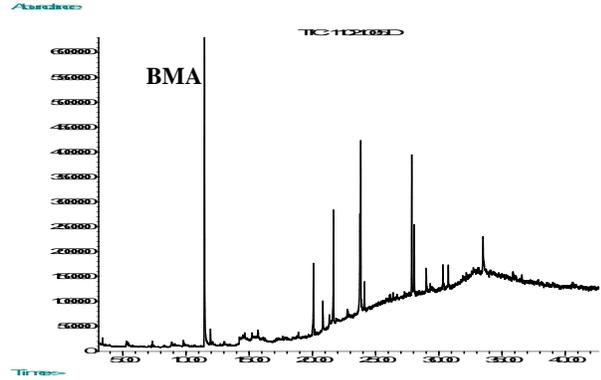
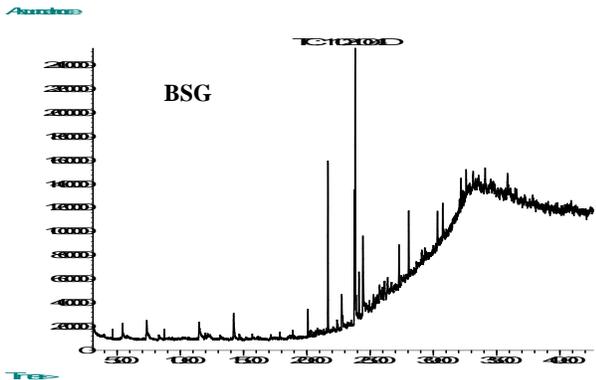
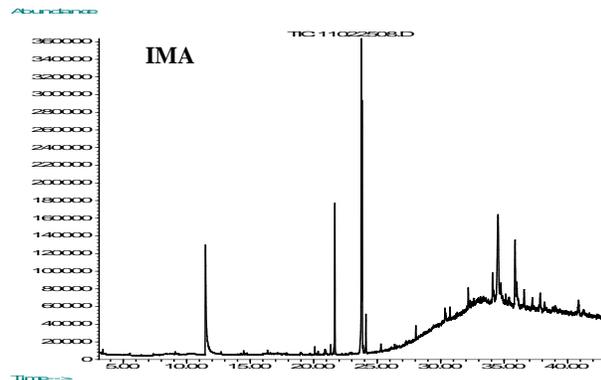
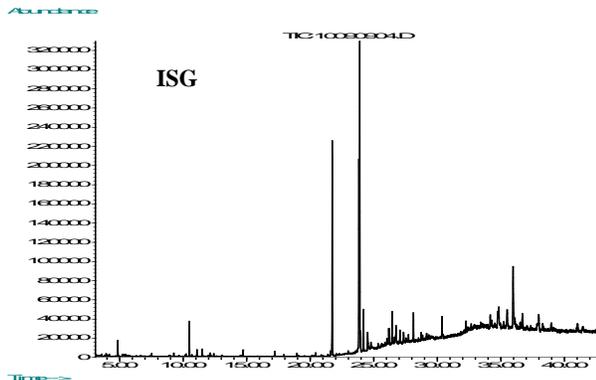






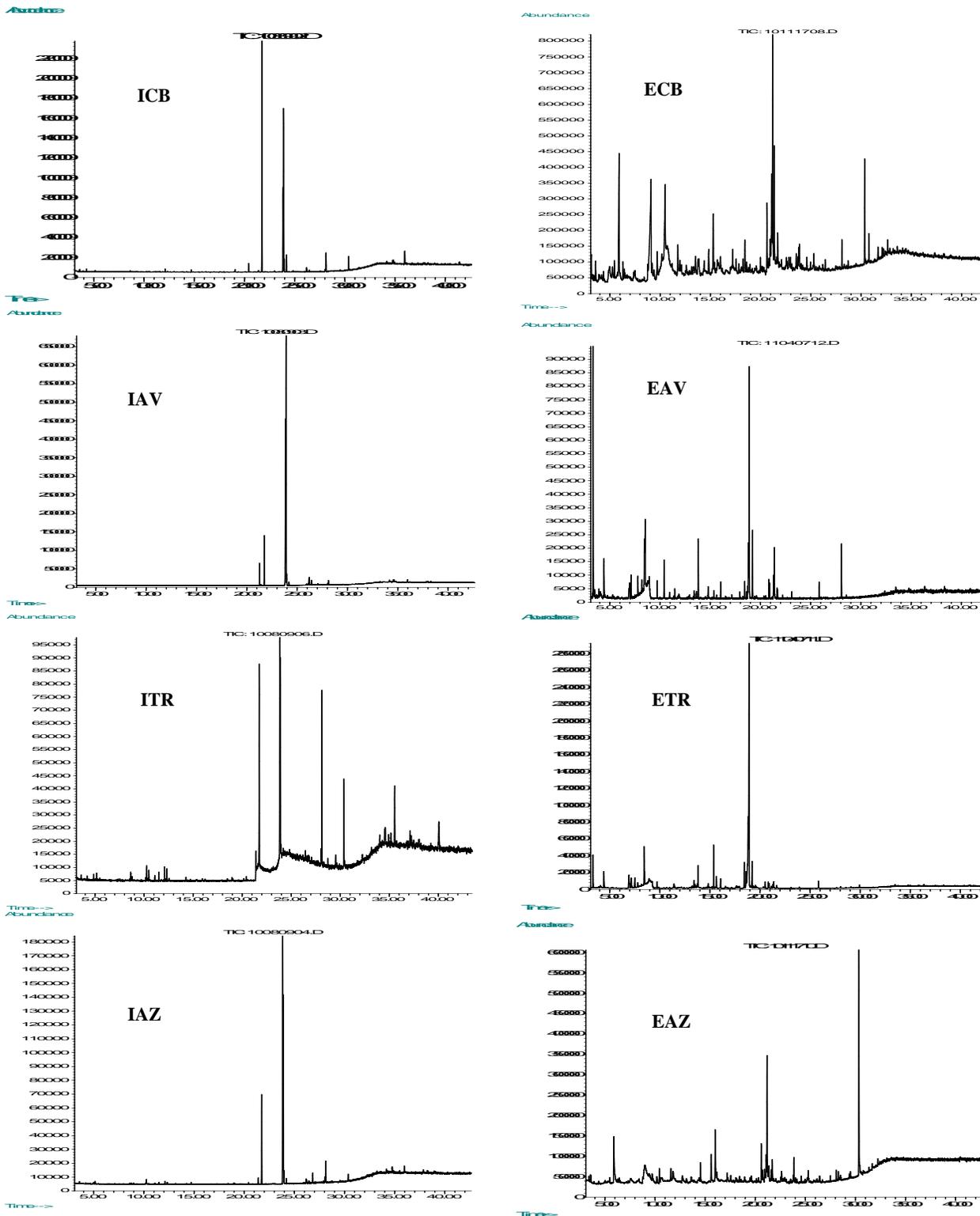


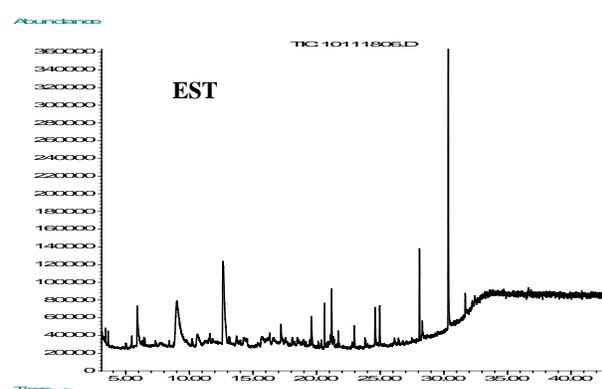
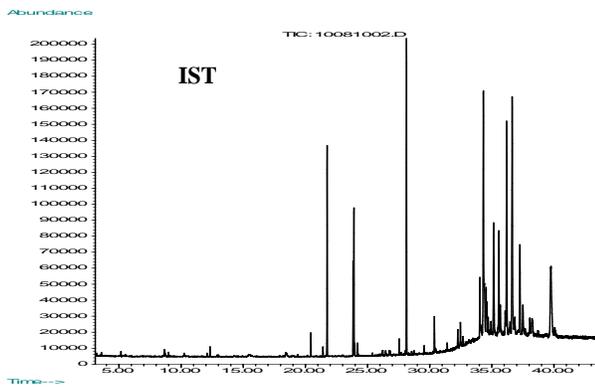
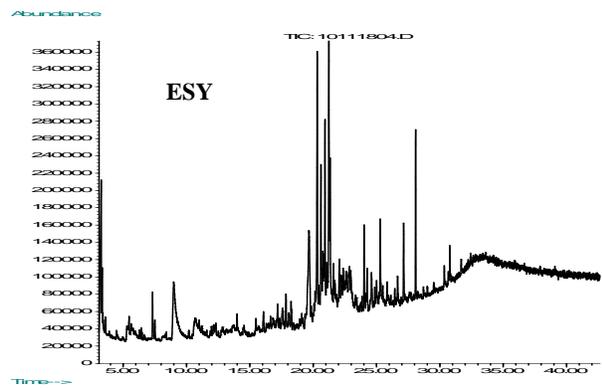
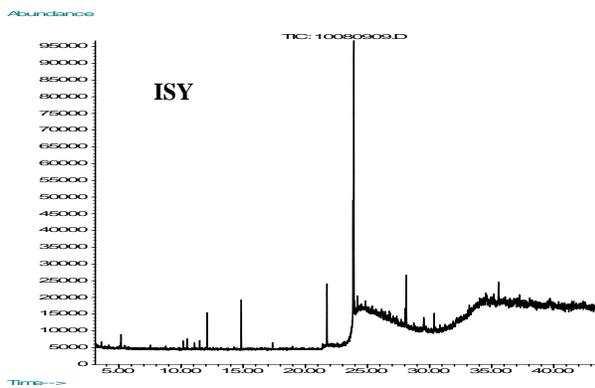
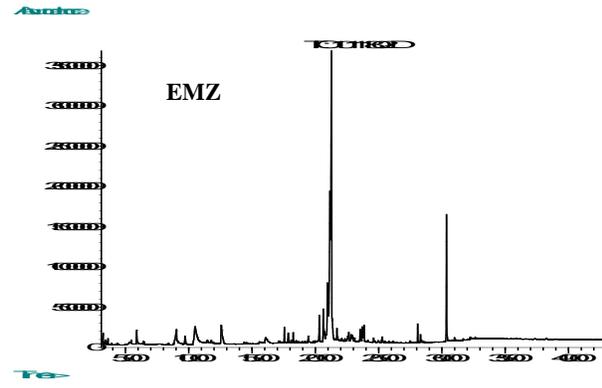
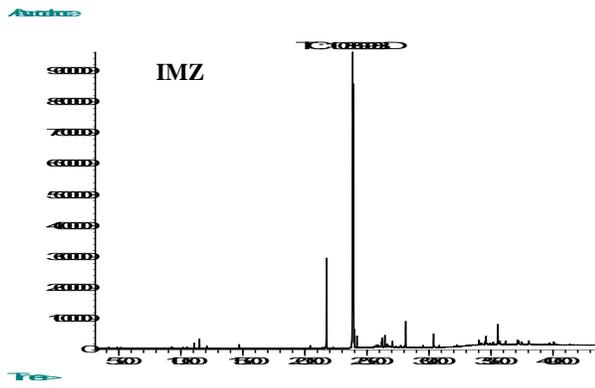
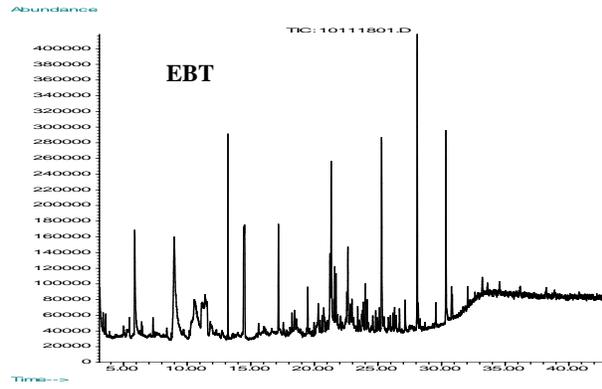
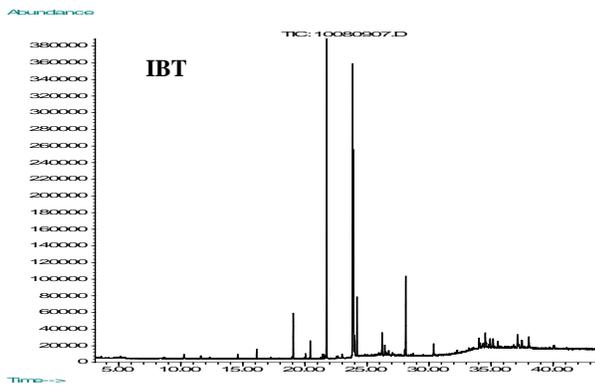


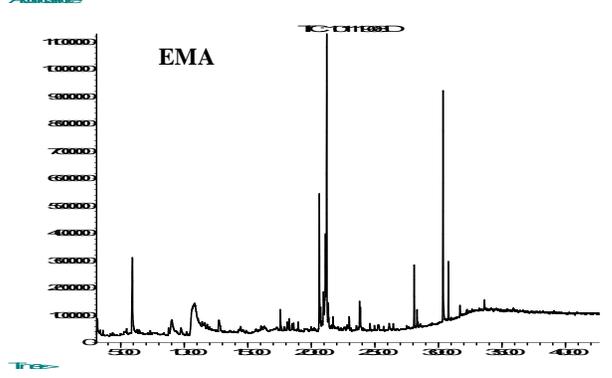
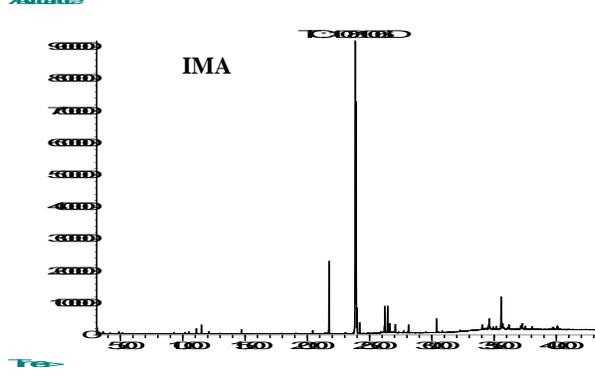
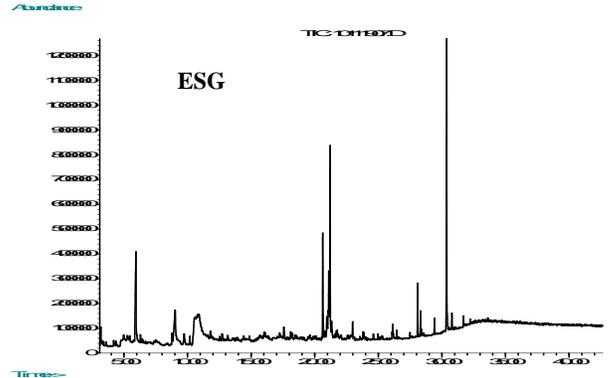
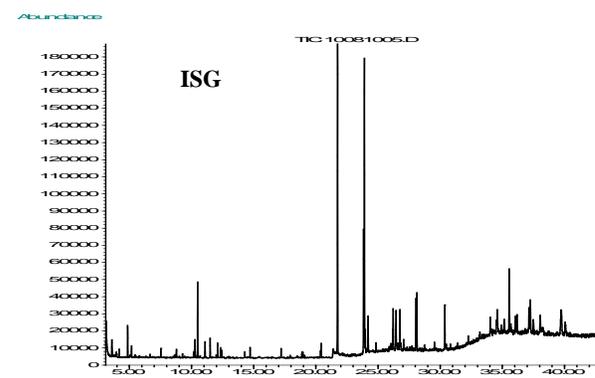
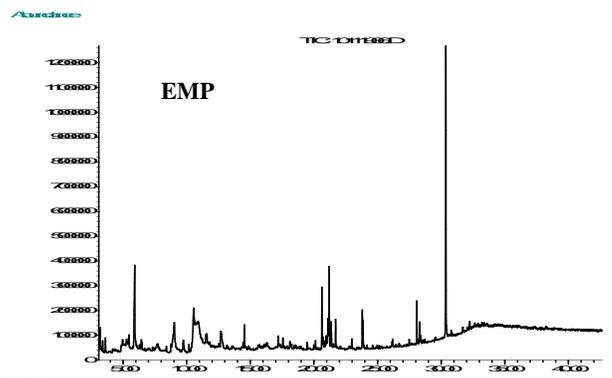
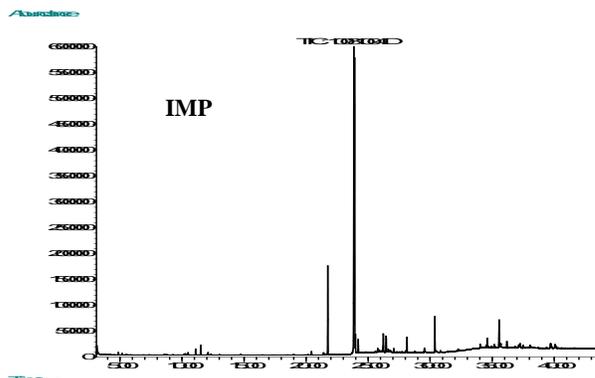
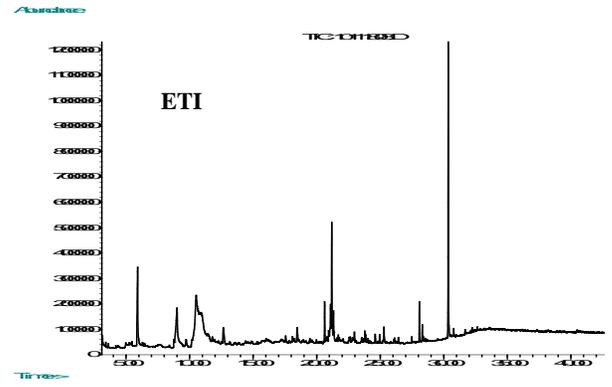
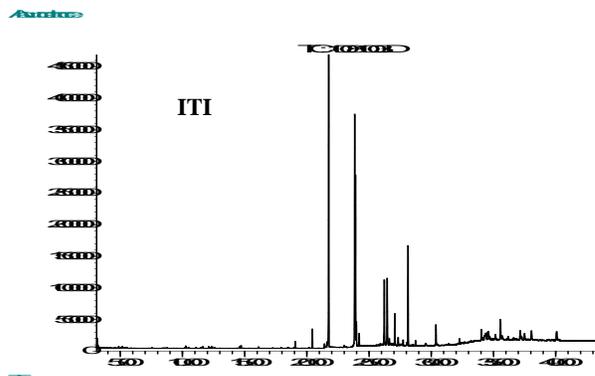


ANEXO 2B

Comparación por CG de los extractos en AcOEt de los micelios (**I**) y los medios agotados (**E**) de *Pleurotus djamor* cultivado por FEL con doce fuentes de carbono. **CB** harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soya; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo.

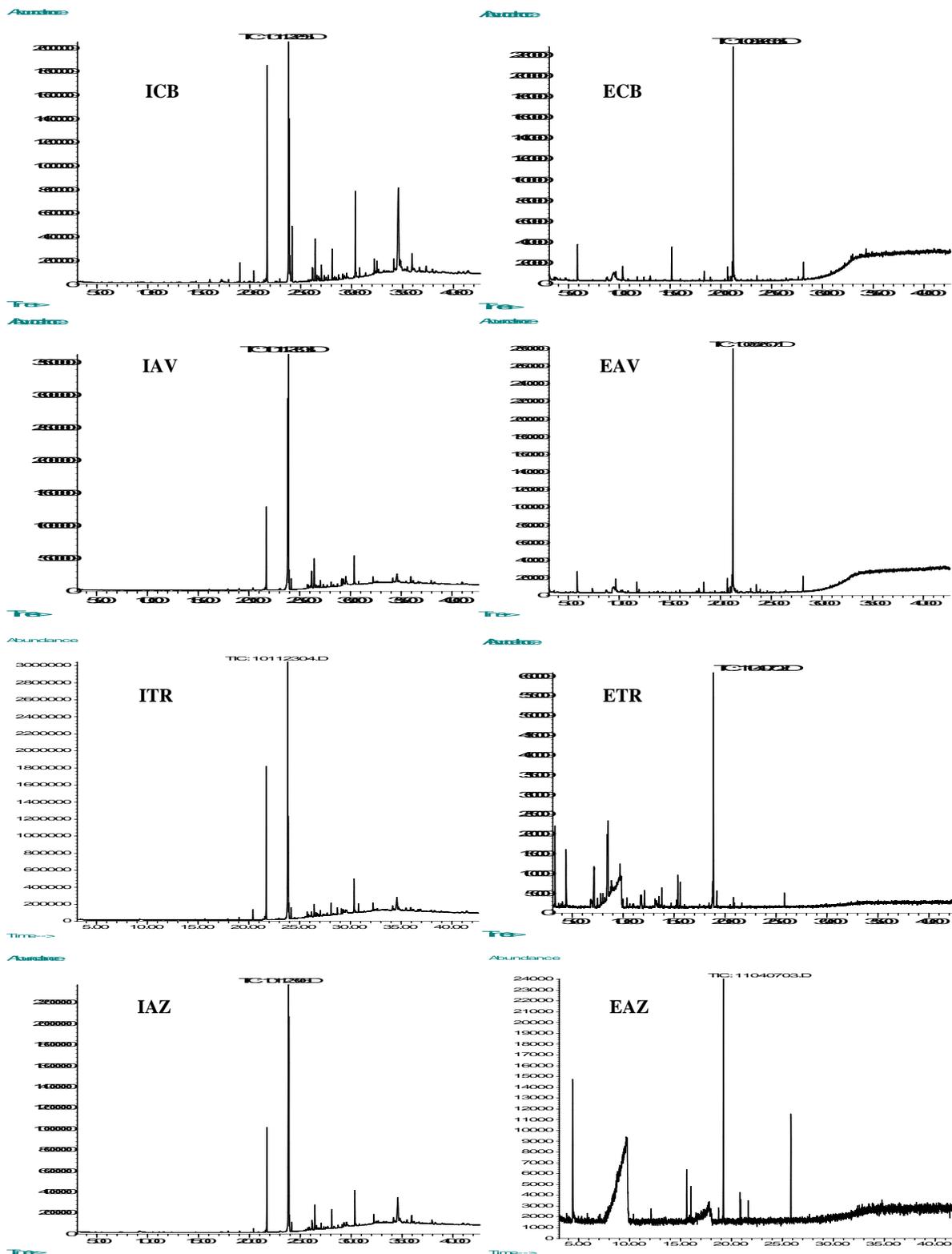


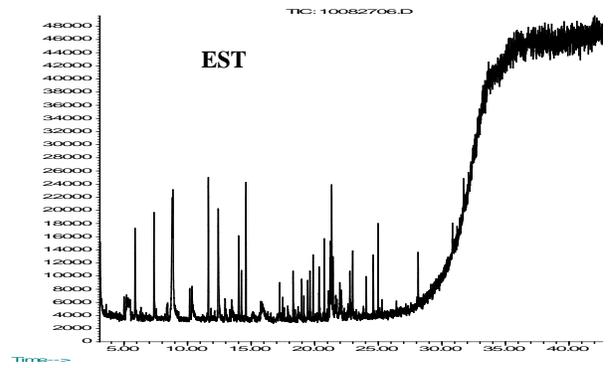
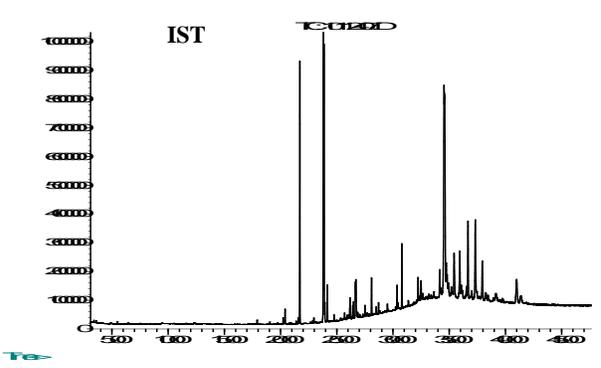
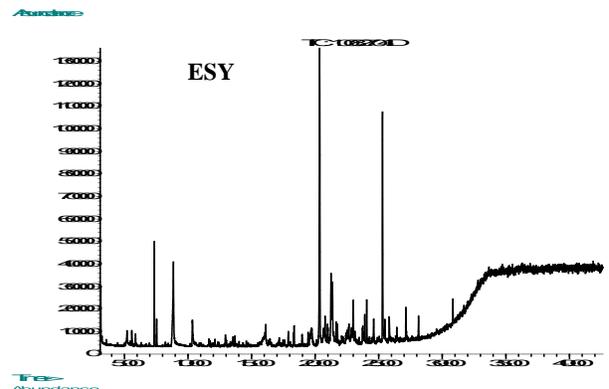
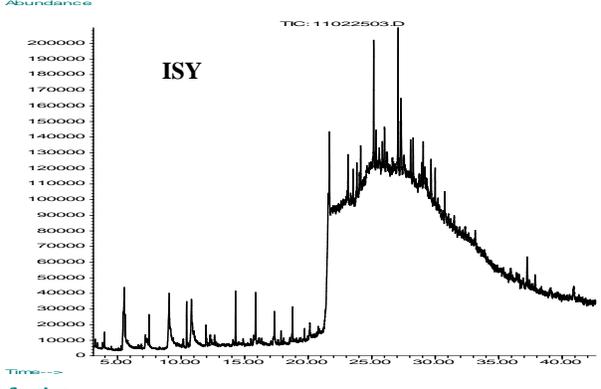
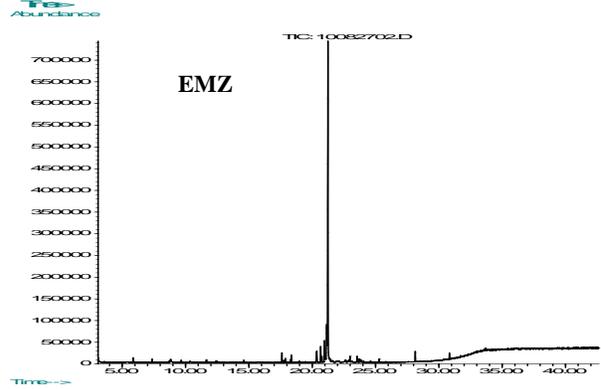
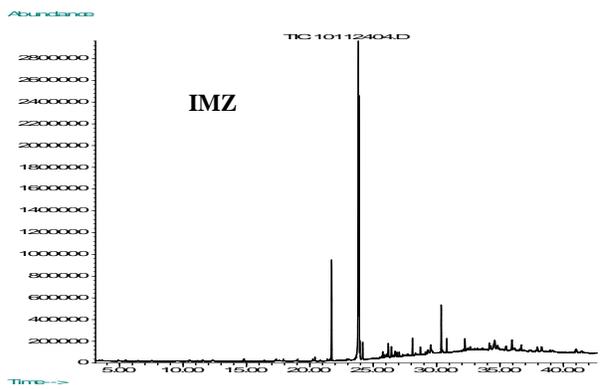
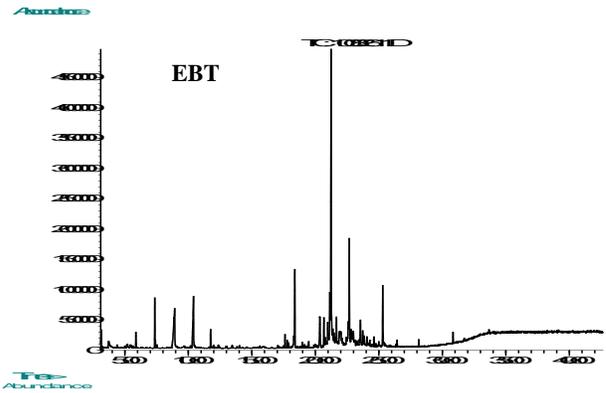
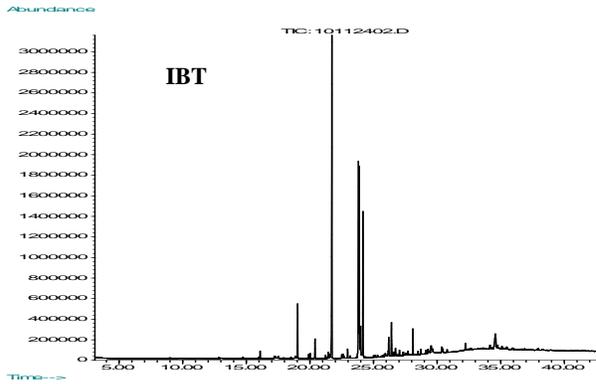


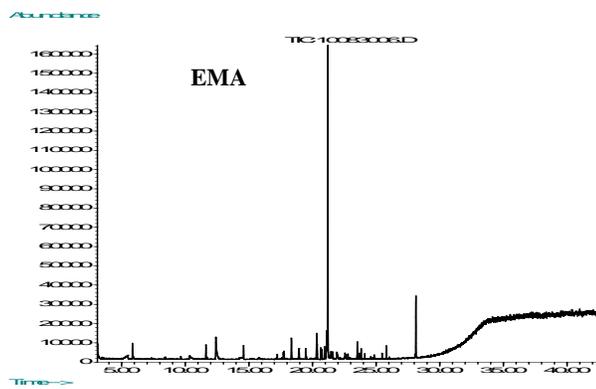
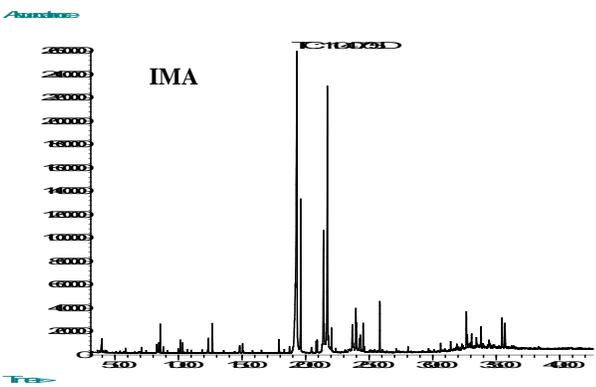
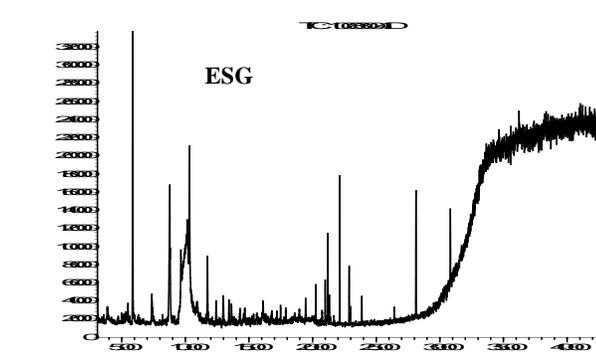
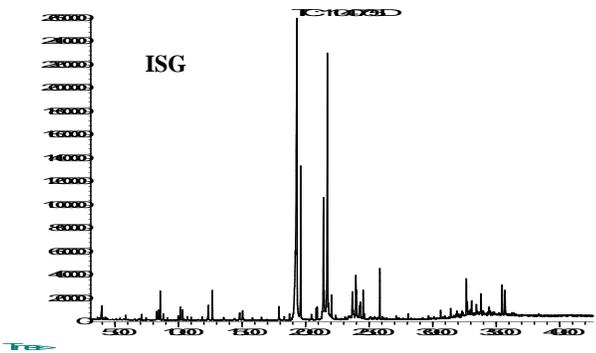
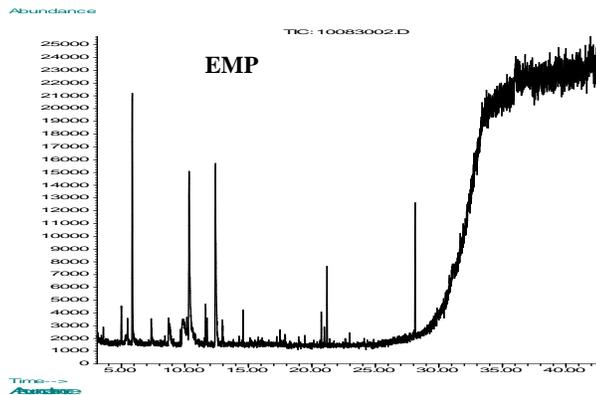
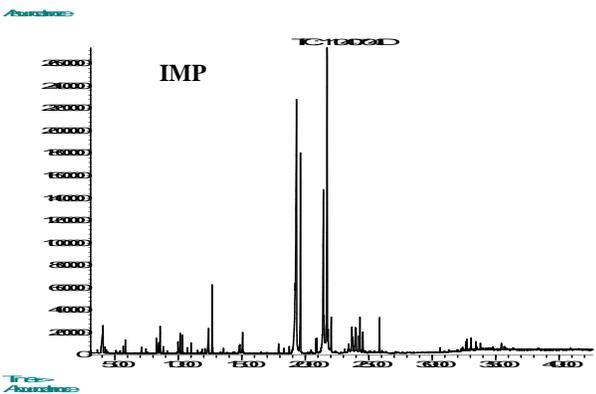
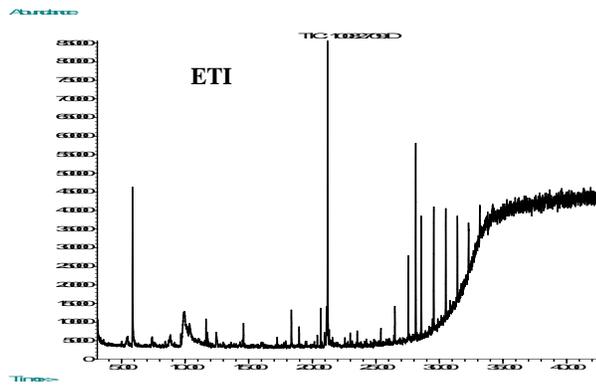
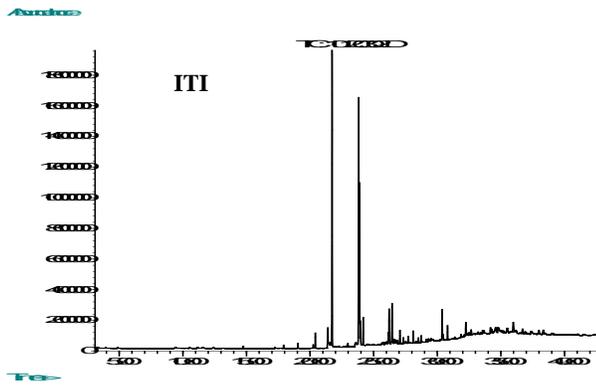


ANEXO 2C

Comparación por CG de los extractos en AcOEt de los micelios (I) y los medios agotados (E) de *Pleurotus pulmonarius* cultivado por FEL con doce fuentes de carbono. **CB** harina de cebada; **AV** harina de avena; **TR** harina de trigo; **AZ** harina de arroz; **BT** bienestarina; **MZ** harina de maíz; **SY** harina de soya; **ST** salvado de trigo; **TI** harina de trigo integral; **MP** harina de maíz pinto; **SG** harina de siete granos; **MA** harina de maíz amarillo.



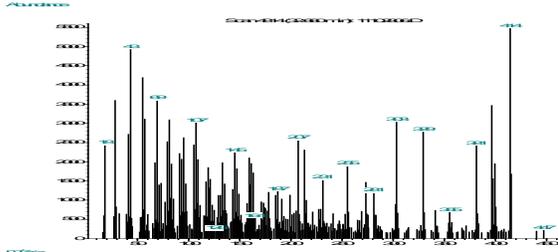




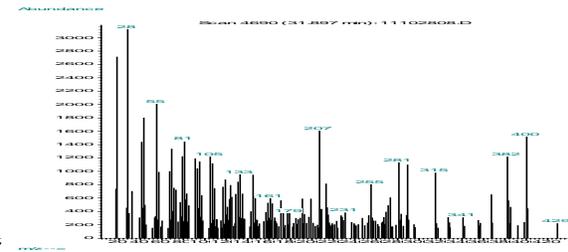
ANEXO 2D

Espectros de masas de los compuestos triterpenoidales identificados en los extractos en AcOEt de los blancos de las harinas de cereales, los micelios y los medios agotados.

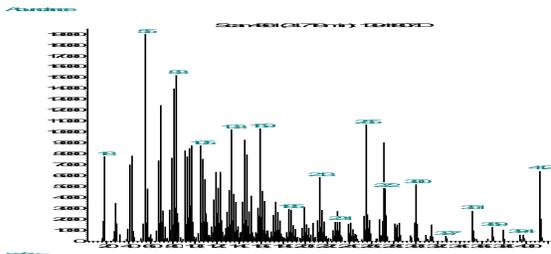
I. Estigmast-5-en-3-ol



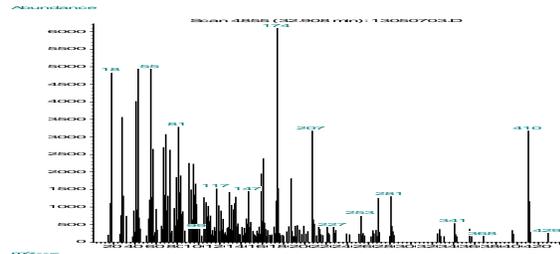
II. Ergost-5-en-3-ol



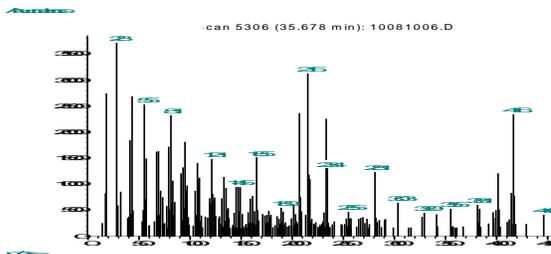
III. Estigmast-5,22-dien-3-ol



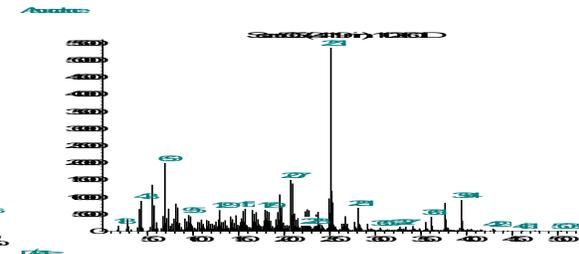
IV. Estigmast-3,5-dien-7-ona



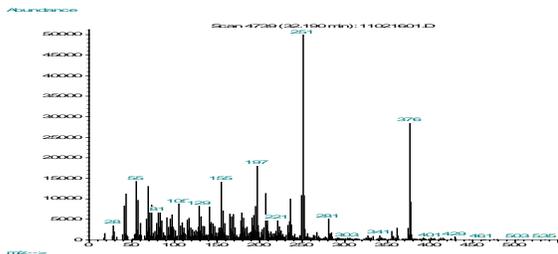
V. Estigmast-3-ol



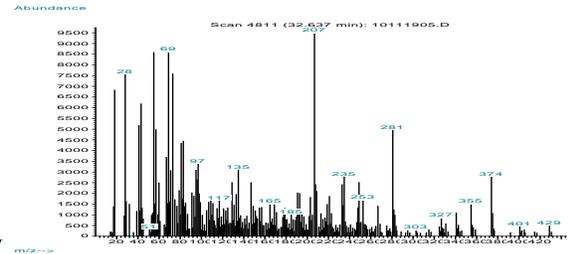
VI. Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol



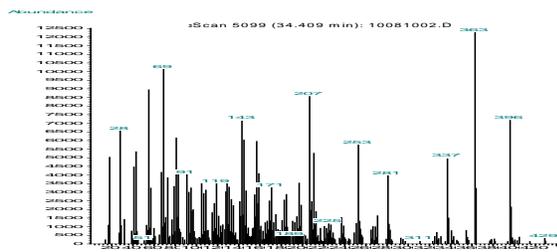
VII. Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno



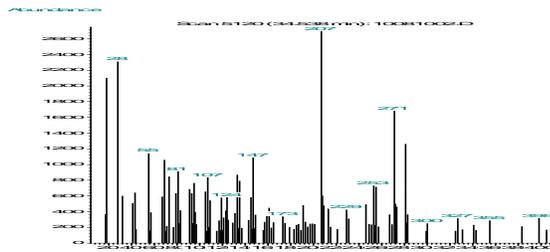
VIII. Ergost-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno



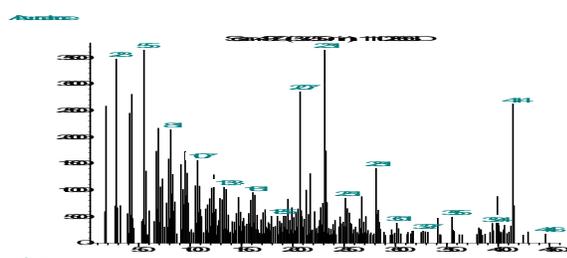
IX. Ergost-5,7,22-trien-3-ol



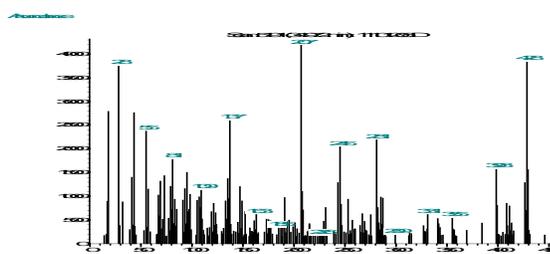
X. Ergost-7,22-dien-3-ol



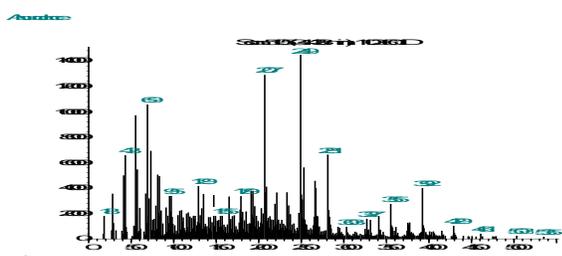
XI. Estigmast-3-ona



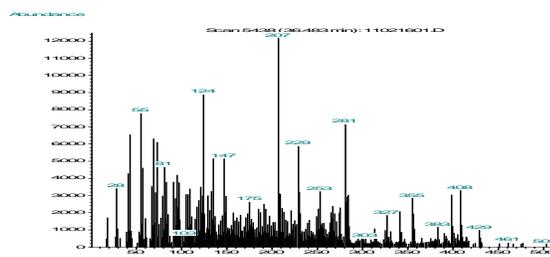
XII. 6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona



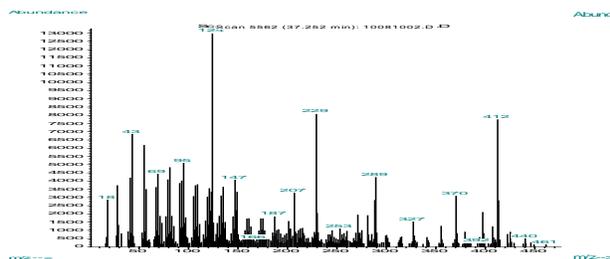
XIII. Ergost-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona



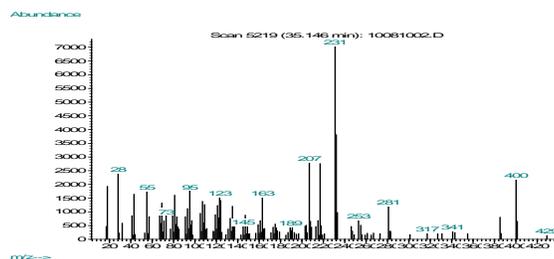
XIV. 4,4-Dimetilcolest-5,7,14,22-tetraen-3-ol

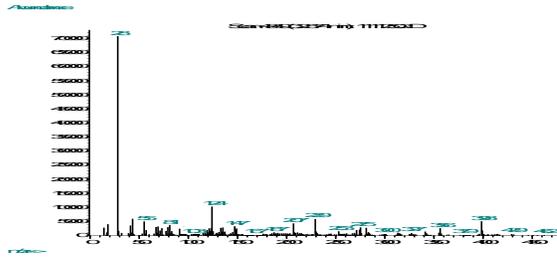
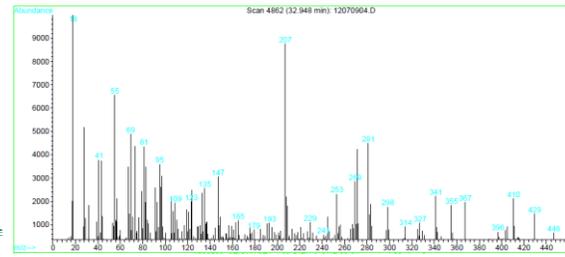
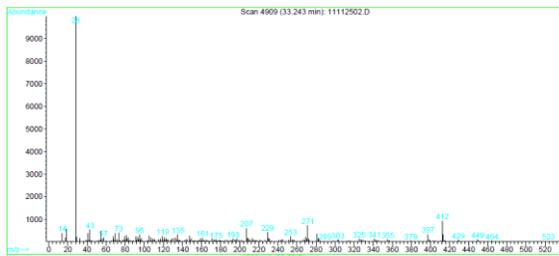
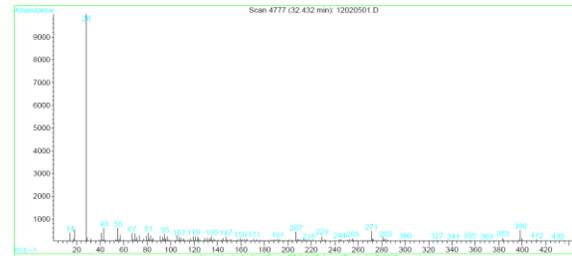


XV. Estigmast-4-en-3-ona



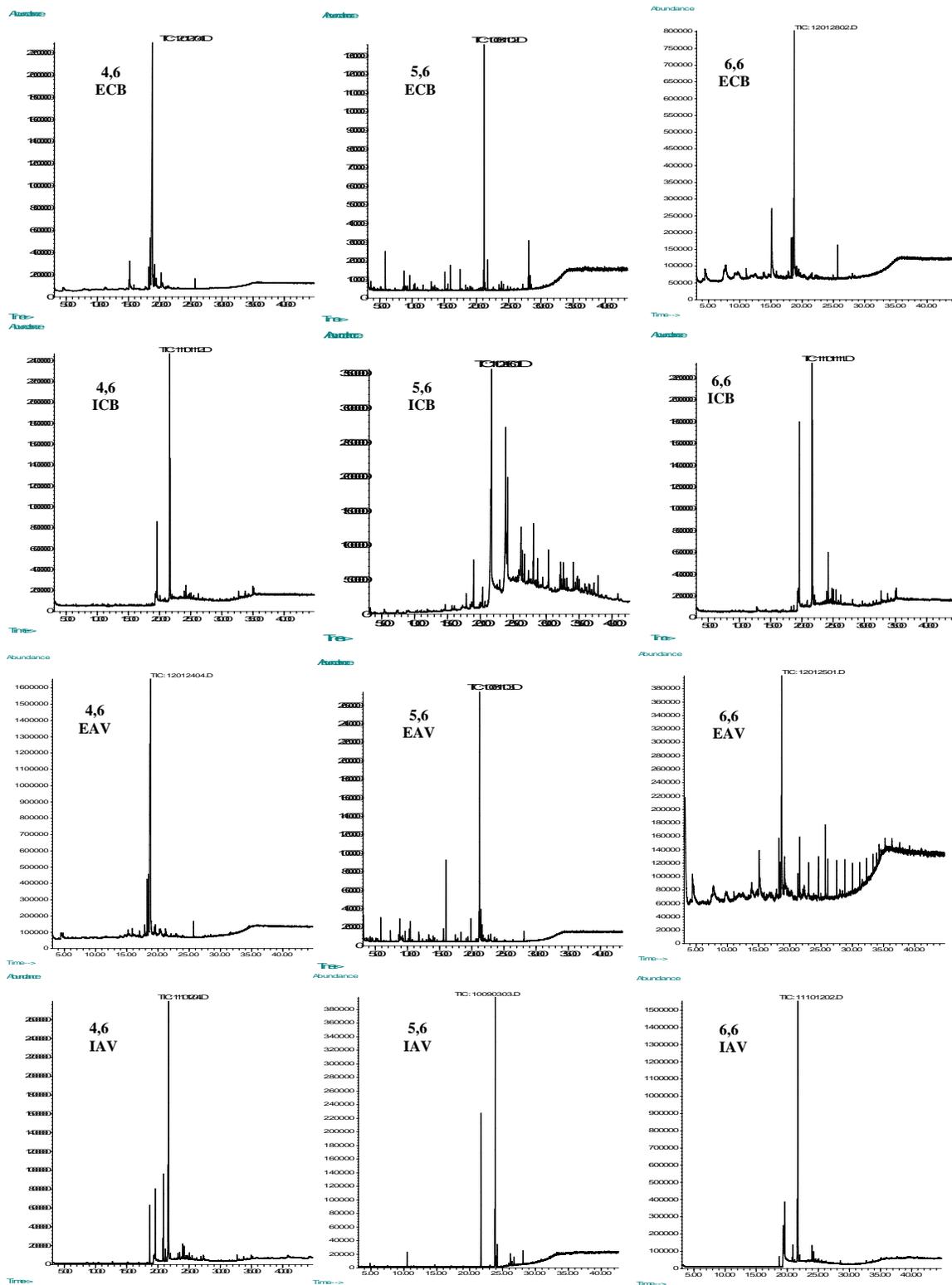
XVI. Ergost-3-ona

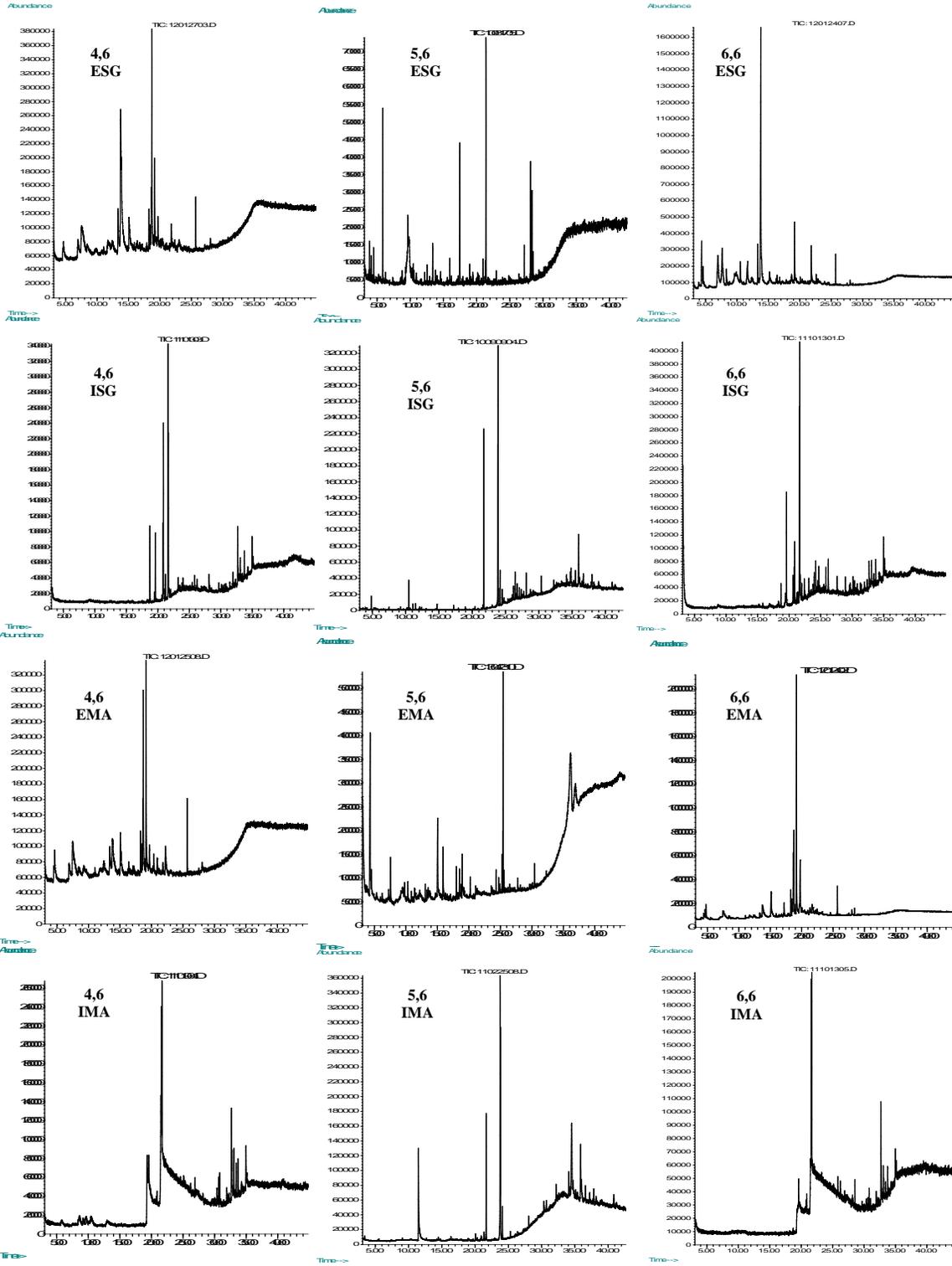


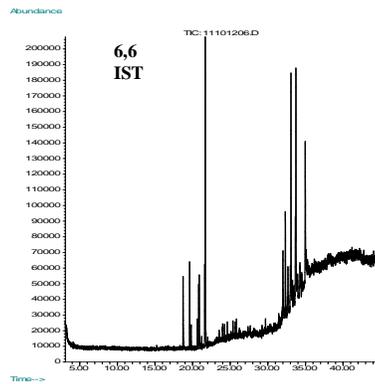
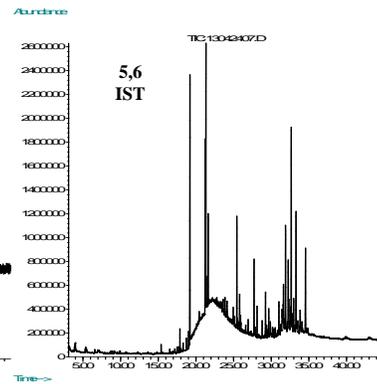
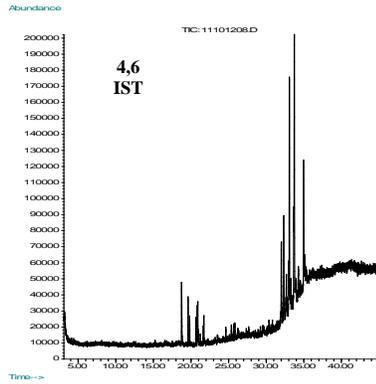
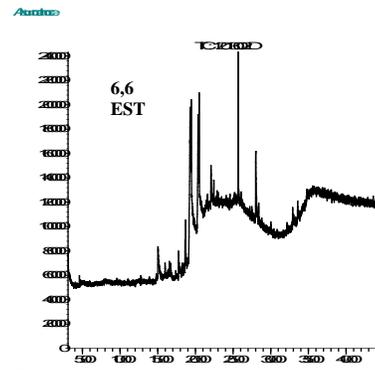
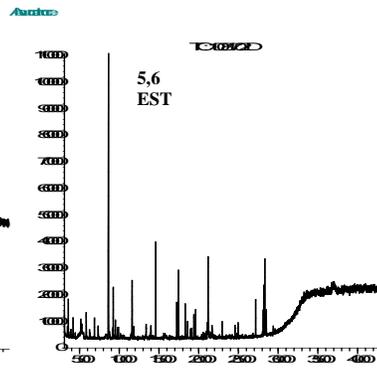
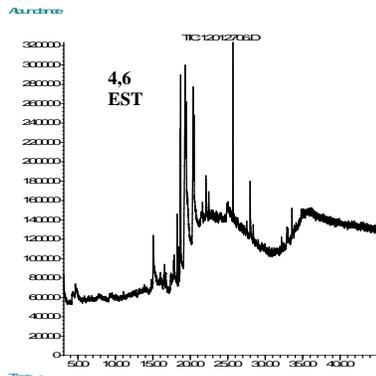
XVII. Ergost-4-en-3-ona**XVIII. Estigmast-4,22-dien-3-ona****XIX. Estigmast-7-en-3-ona****XX. Ergost-8(14)-en-3-ona**

ANEXO 6A

Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (E) y del micelio (I) de *Pleurotus ostreatus* cultivado por FEL a pH 4,6, 5,6 y 6,6 empleando harina de cebada (CB), harina de avena (AV), salvado de trigo (ST), harina de siete granos (SG) y harina de maíz amarillo (MA).

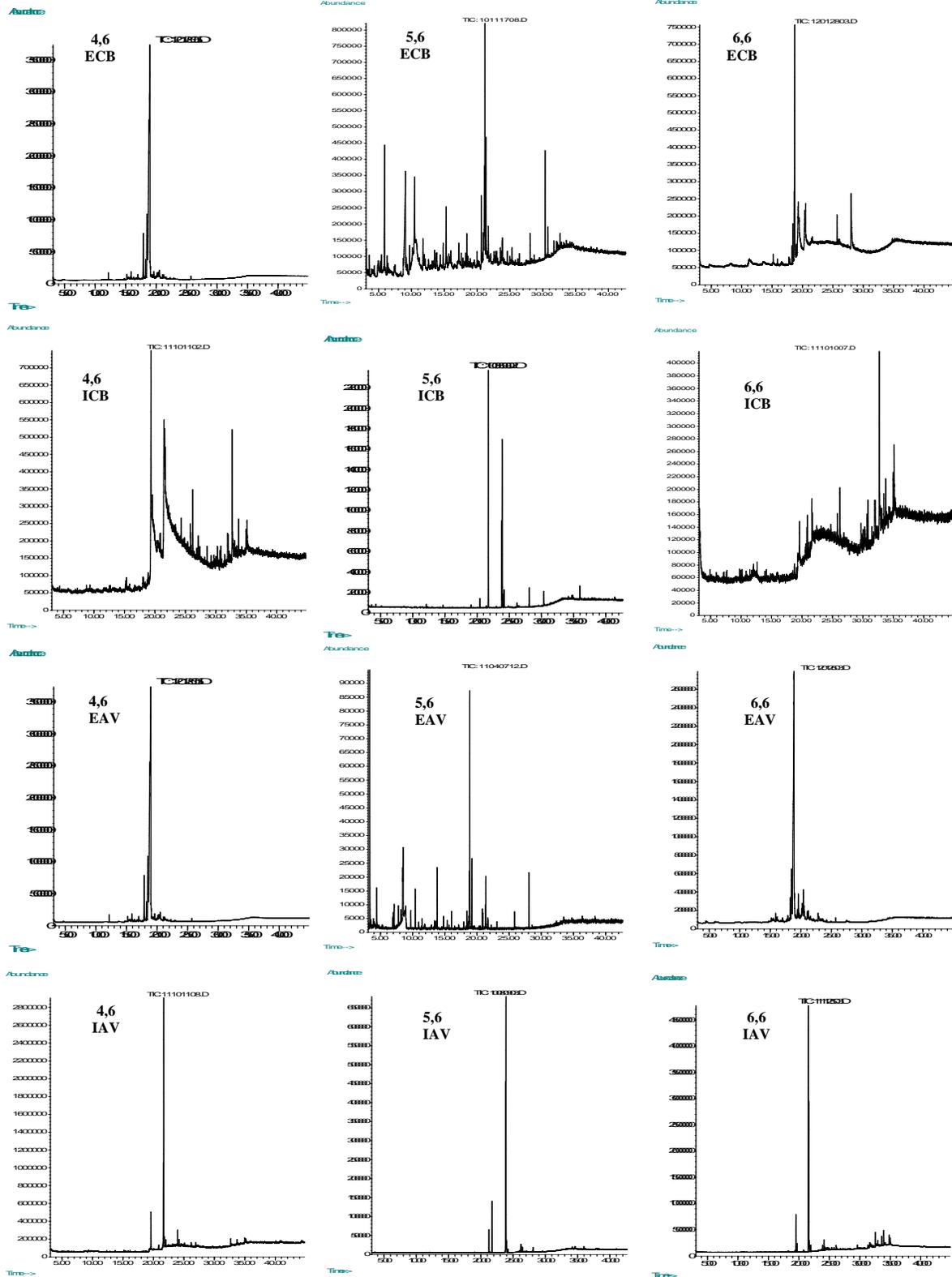


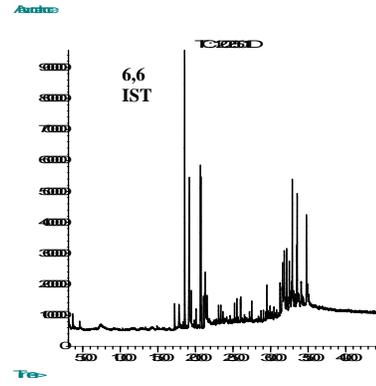
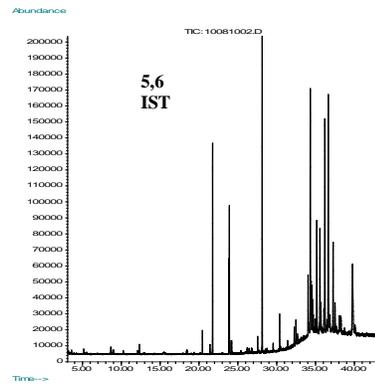
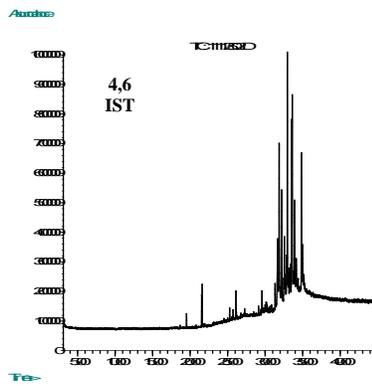
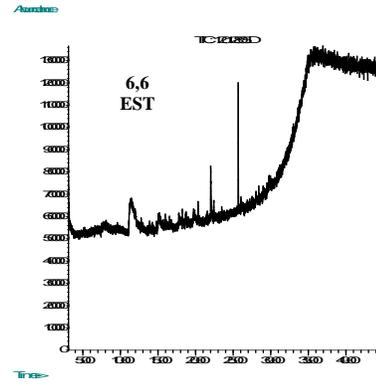
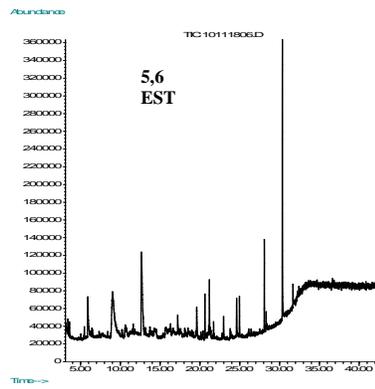
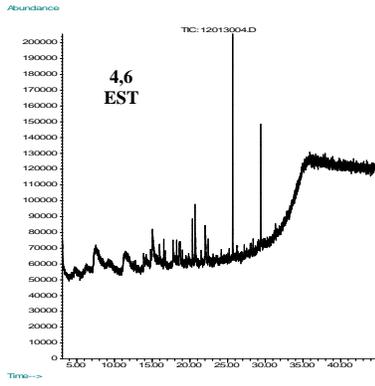




ANEXO 6B

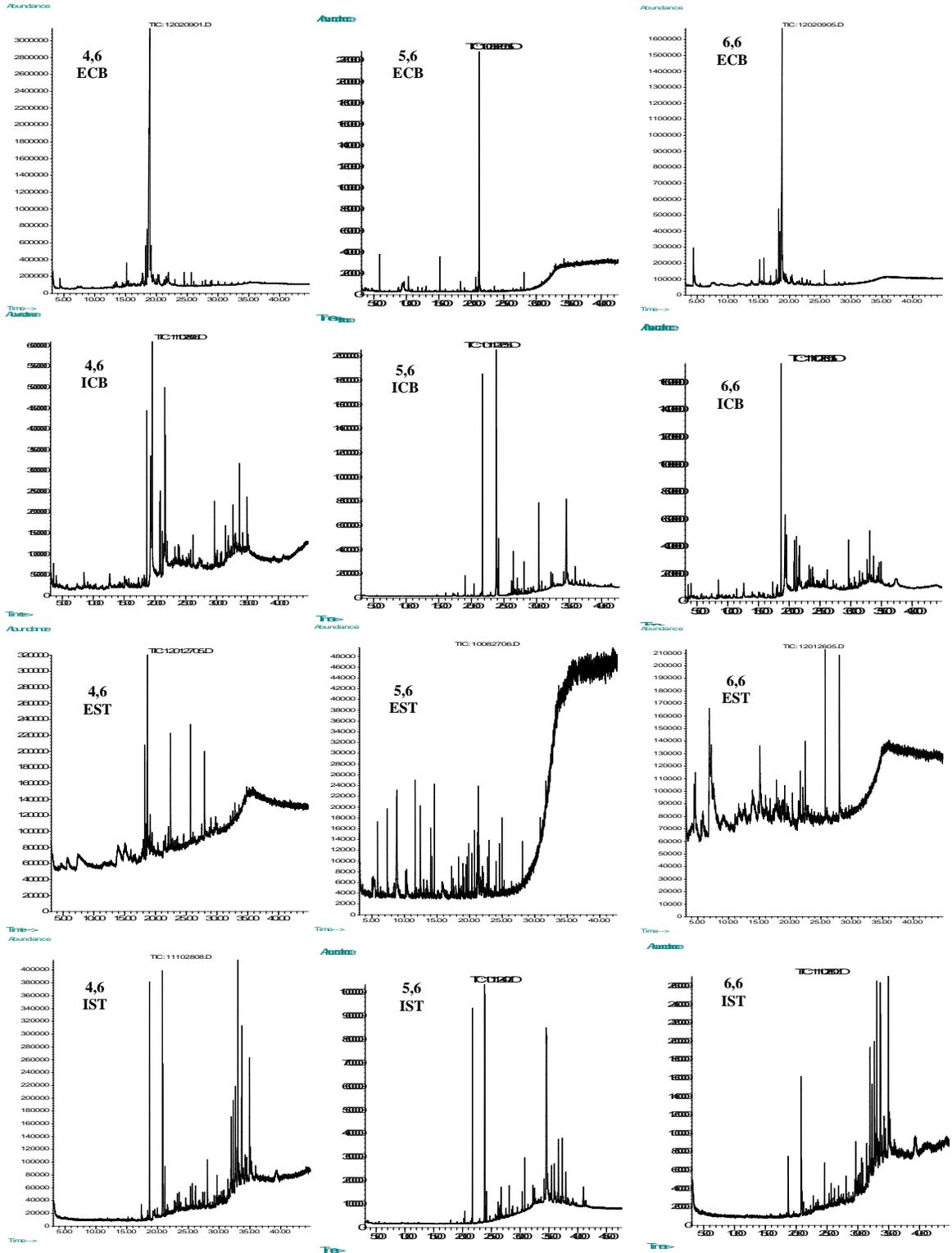
Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (E) y del micelio (I) de *Pleurotus djamor* cultivado por FEL a pH 4,6, 5,6 y 6,6 empleando harina de cebada (CB), harina de avena (AV) y salvado de trigo (ST).

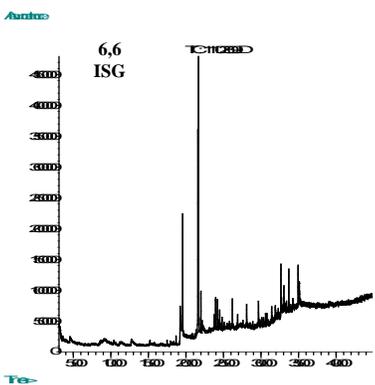
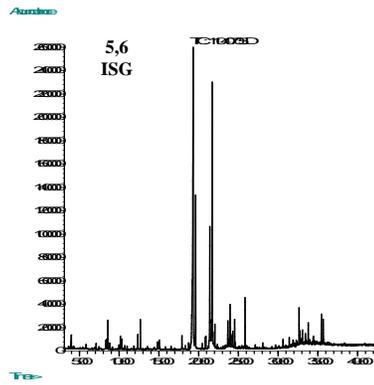
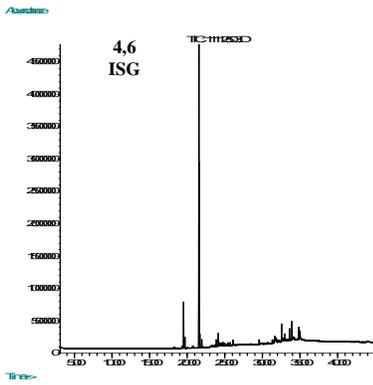
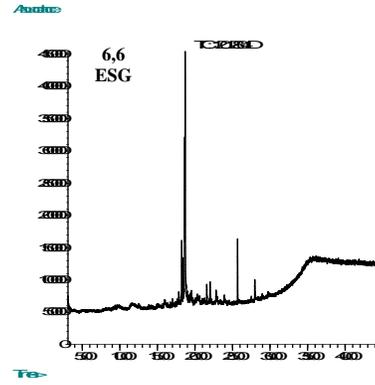
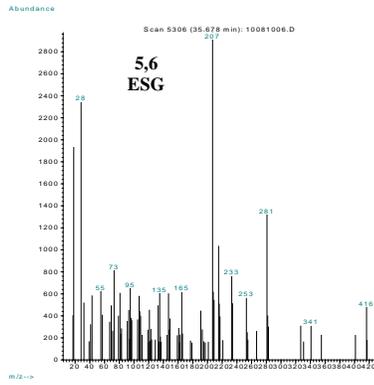
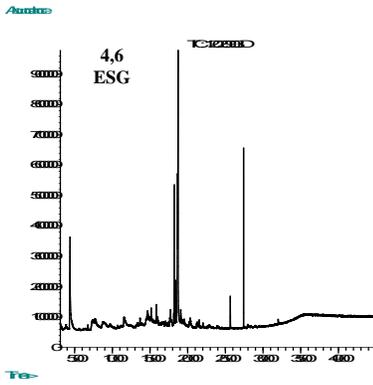




ANEXO 6C

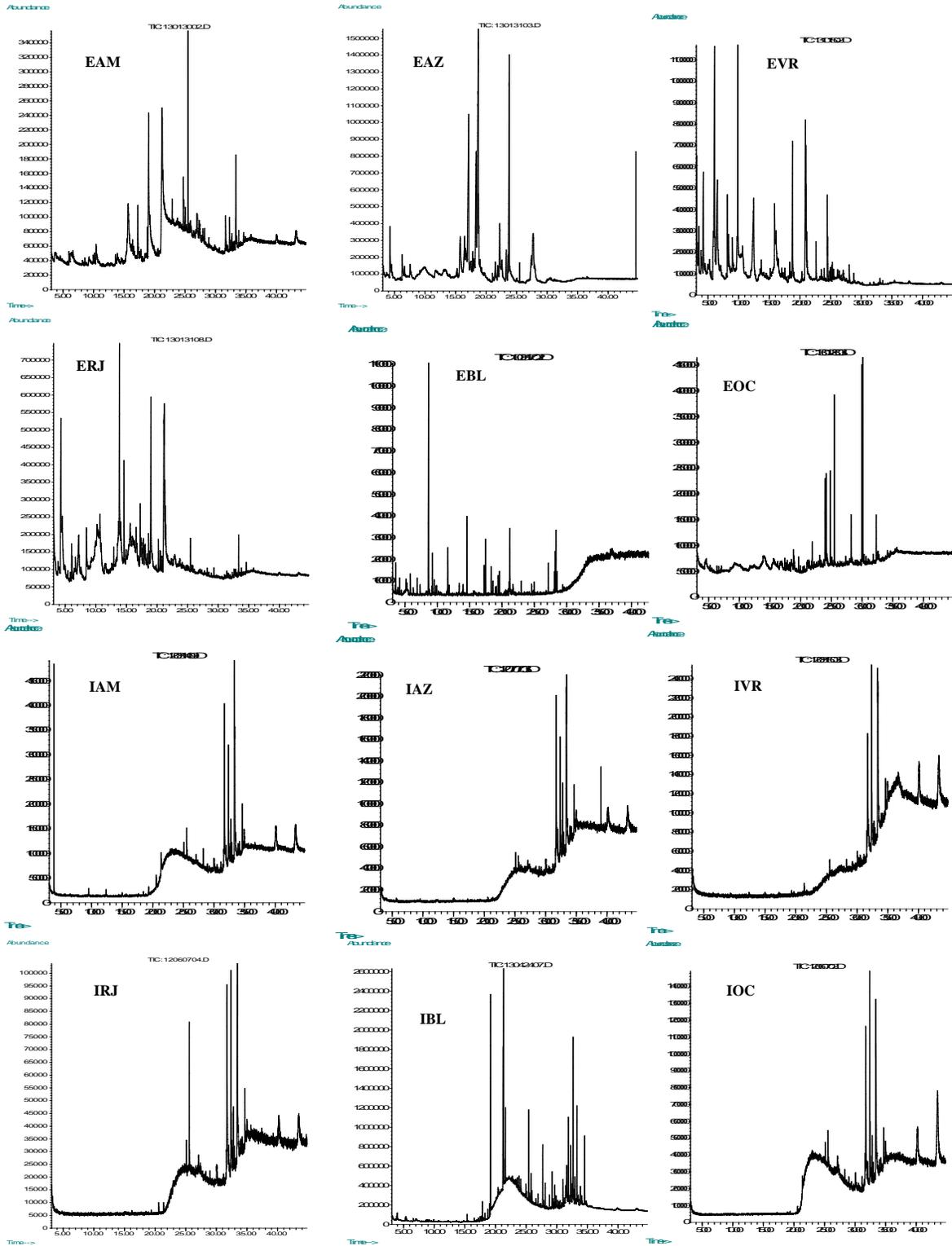
Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (E) y del micelio (I) de *Pleurotus pulmonarius* cultivado por FEL a pH 4,6, 5,6 y 6,6 empleando harina de cebada (CB), salvado de trigo (ST) y harina de siete granos (SG).





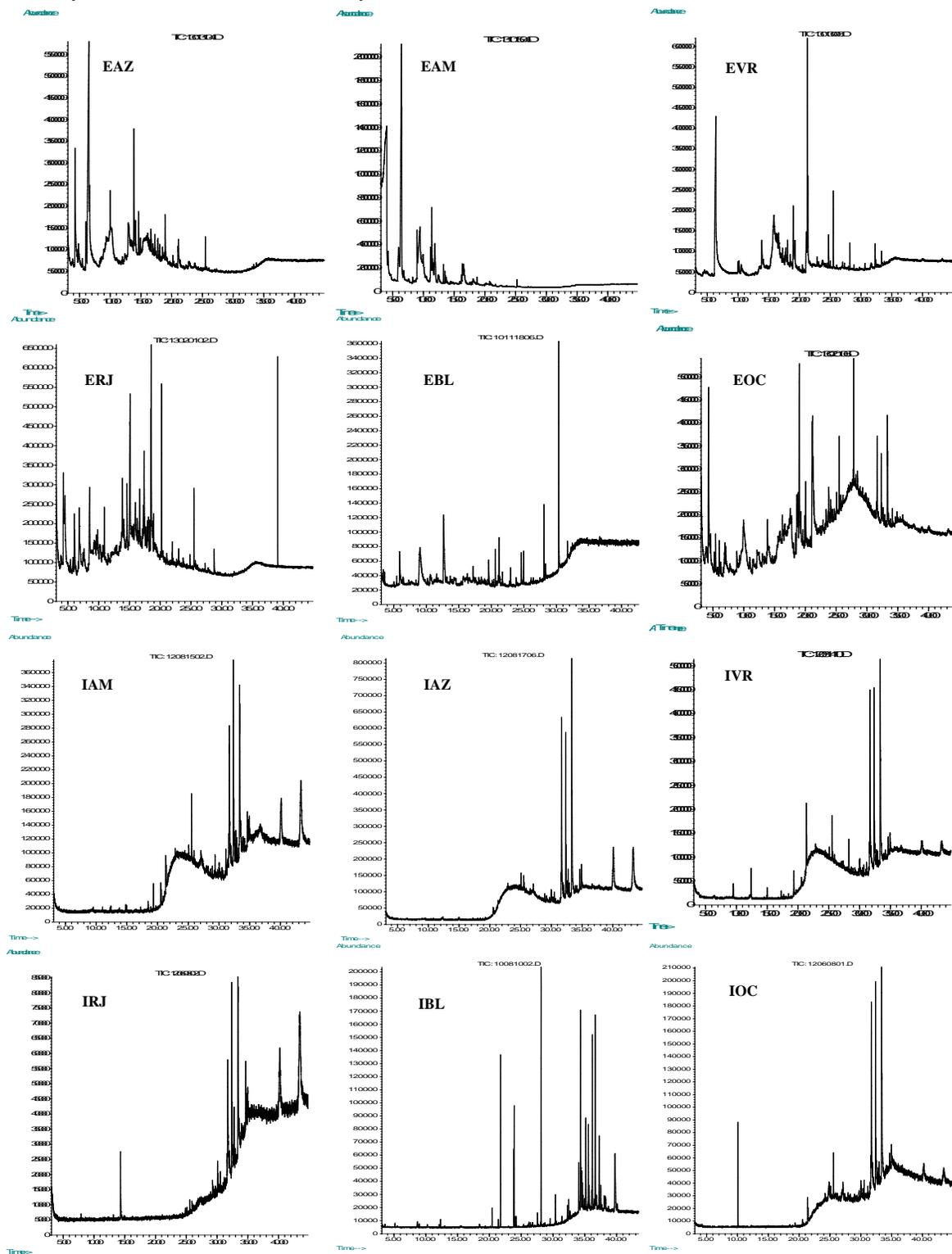
ANEXO 7A

Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (**E**) y del micelio (**I**) de *Pleurotus ostreatus* cultivado por FEL con salvado de trigo como fuente de carbono y empleando LED's amarillo (**AM**), azul (**AZ**), verde (**VR**), rojo (**RJ**) y como controles la luz blanca (**BL**) y oscuridad (**OC**).



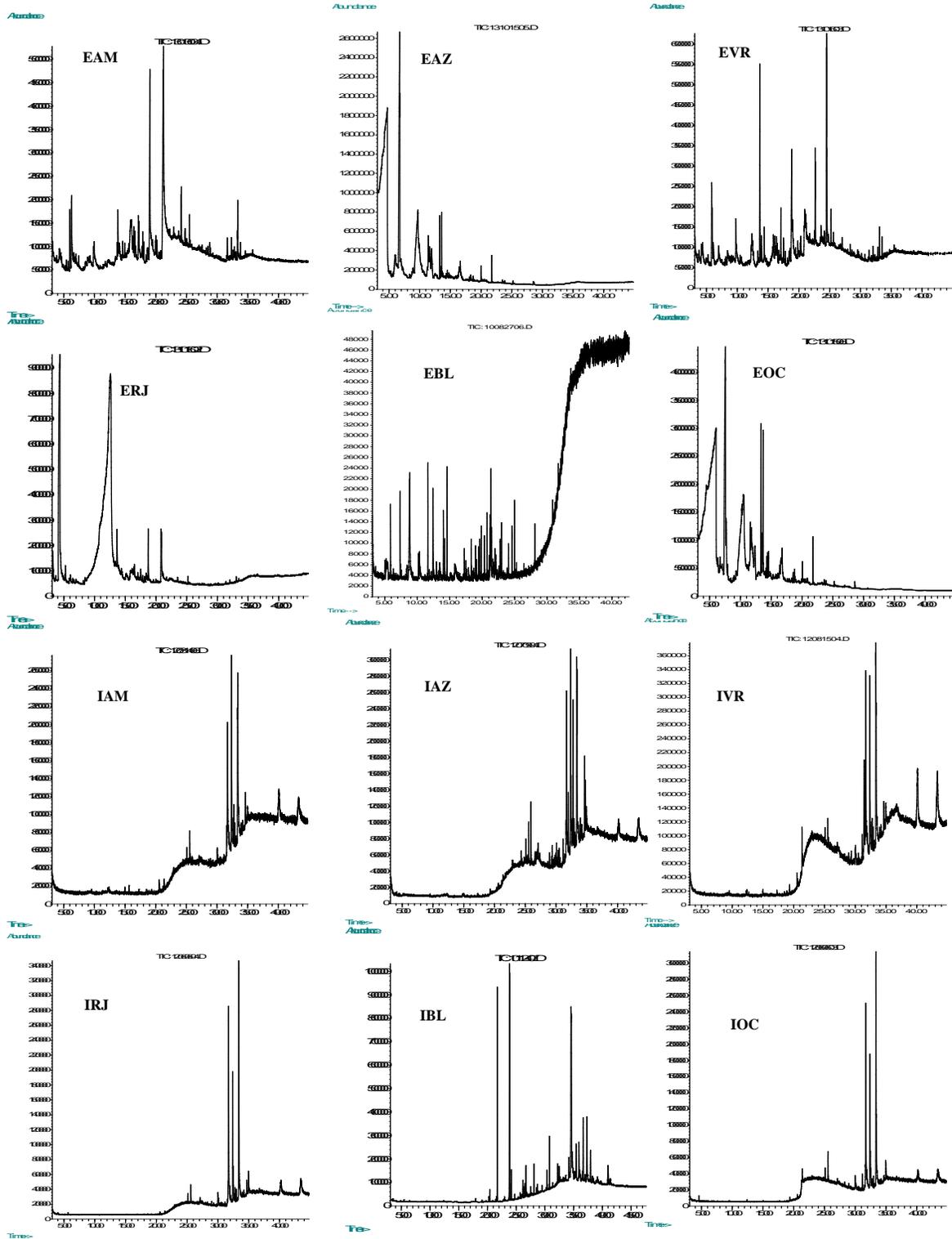
ANEXO 7B

Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (**E**) y del micelio (**I**) de *Pleurotus djamor* cultivado por FEL con salvado de trigo como fuente de carbono y empleando LED's amarillo (**AM**), azul (**AZ**), verde (**VR**), rojo (**RJ**) y como controles la luz blanca (**BL**) y oscuridad (**OC**).



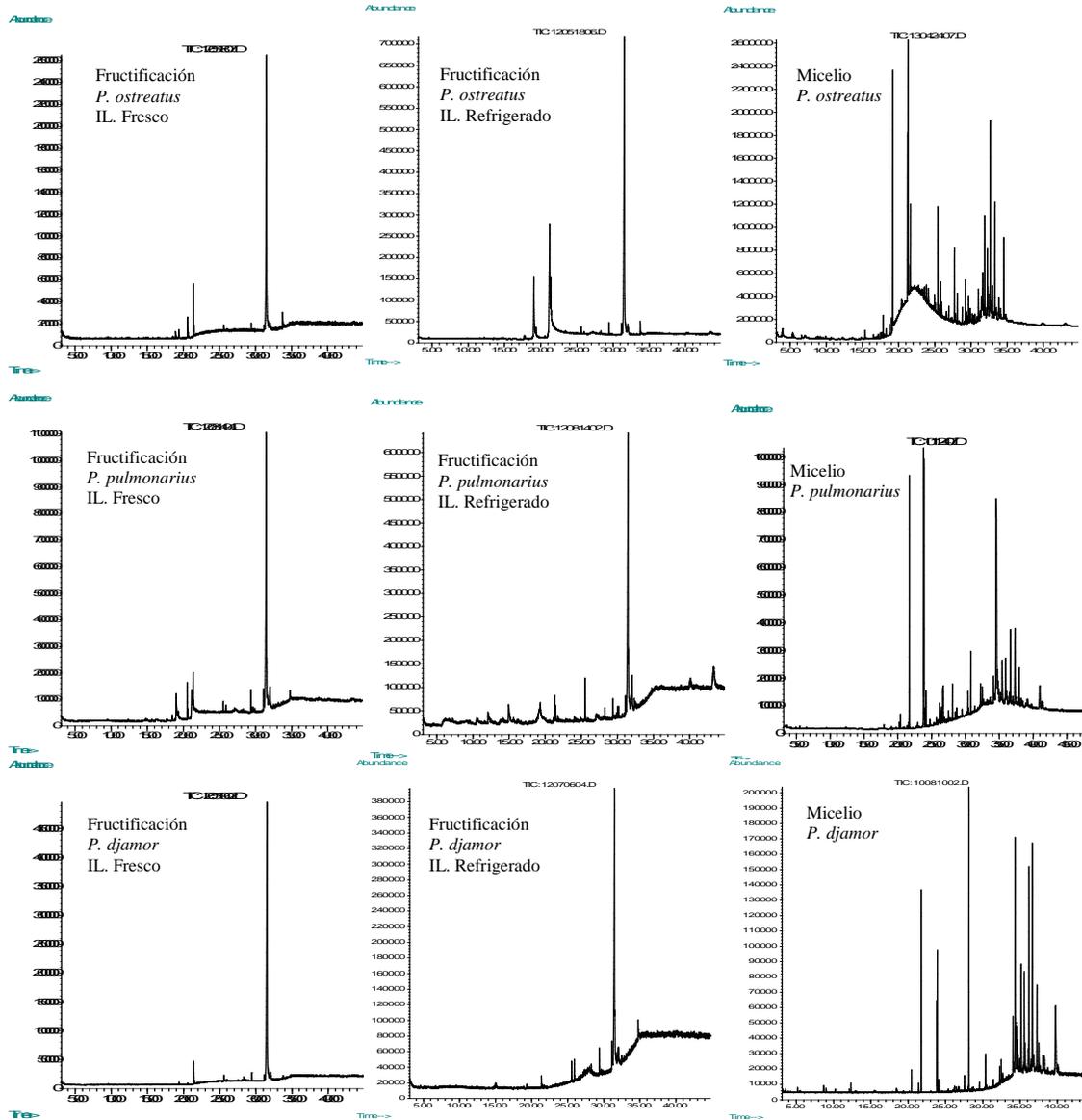
ANEXO 7C

Comparación por CG de los extractos en AcOEt del medio agotado (**E**) y del micelio (**I**) de *Pleurotus pulmonarius* cultivado por FEL con salvado de trigo como fuente de carbono y empleando LED's amarillo (**AM**), azul (**AZ**), verde (**VR**), rojo (**RJ**) y como controles la luz blanca (**BL**) y oscuridad (**OC**).



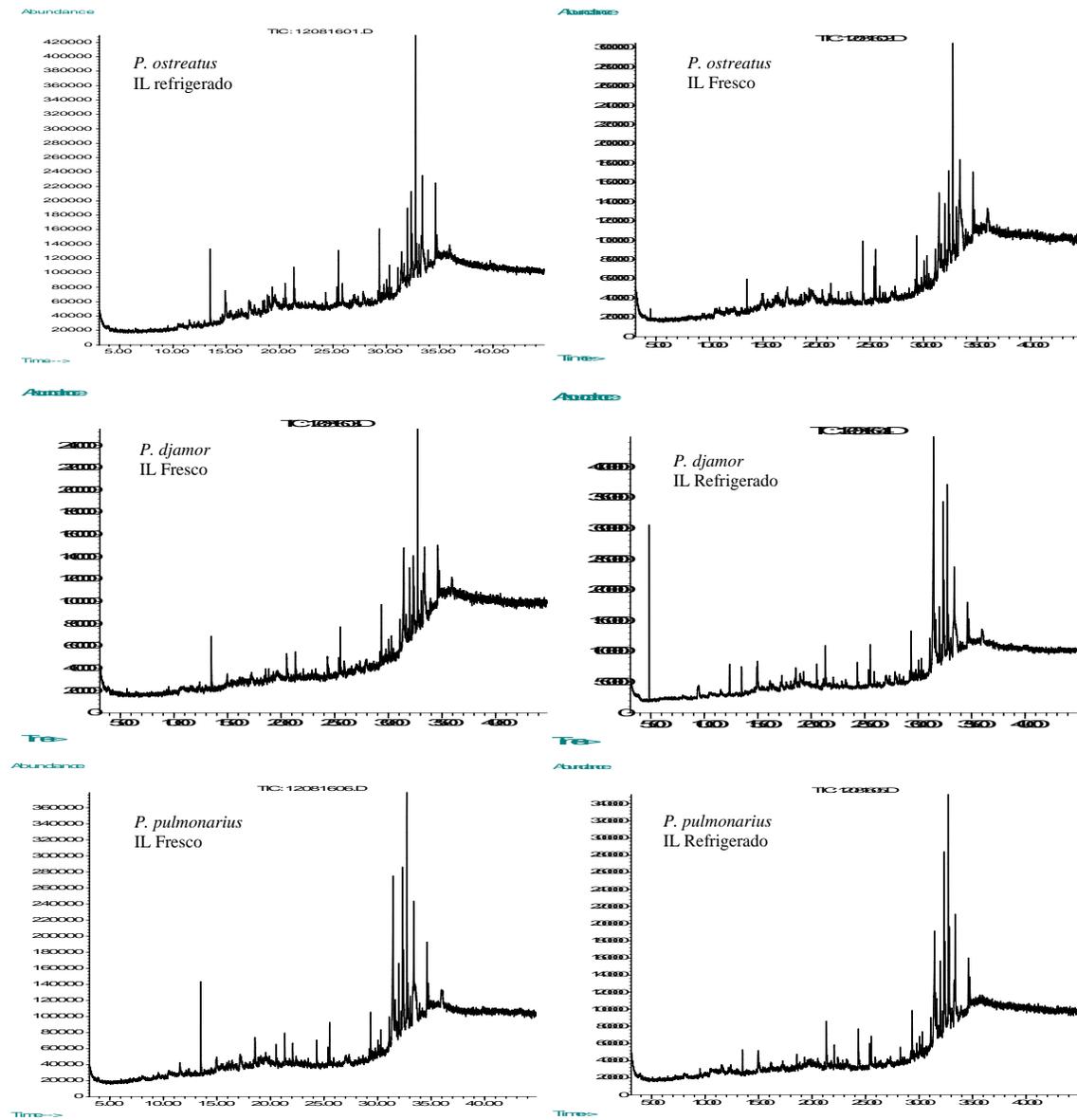
ANEXO 8A

Comparación por CG de los extractos en AcOEt de las fructificaciones, cultivadas empleando inóculo líquido (IL) fresco y refrigerado, con los micelios de *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*.



ANEXO 8B

Comparación por CG de los extractos en AcOEt de los sustratos agotados de los cultivos empleando inóculo líquido (IL) fresco y refrigerado de *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamora*.



Producción científica

Artículos publicados

Nieto-Ramirez, I.J., C. Chegwin-Angarita, L. Atehortúa, L.J. Sepúlveda, 2013. Las estatinas: Química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. *Vitae* 20: 49-63.

Chegwin-Angarita, C., I.J. Nieto-Ramirez, G.J. Diaz, J.R.Rojas, L. Sepúlveda, L. Atehortúa, 2013. Evaluation of a method using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of statins in macromycetes of the genus *Pleurotus* cultivated by fermentation processes. *Talanta* 116: 56-64.

Chegwin-Angarita, C., I. Nieto R, 2013. Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología* 37: 1-9.

Chegwin-Angarita, C., I.J. Nieto-Ramírez, L. Atehortúa, L. Sepúlveda, 2012. Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 157-178.

Nieto R, I.J., C. Chegwin A, 2014. The effect of different substrates on triterpenoids and fatty acids in fungi of the genus *pleurotus*. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 59 (1). 1986-1992.

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. 2014. Inóculo líquido: una alternativa para el cultivo de hongos del género *Pleurotus*. *Revista Latinoamericana de Química*. 42/1: 27 -35.

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. 2014. Empleo de LEDs como elicitores para activar producción de triterpenoides en *pleurotus* cultivados por FEL. *Revista Latinoamericana de Química*. 42/1: 1 -12.

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. 2014. Incidencia del tipo de fermentación sobre la producción de triterpenoides en hongos del género *Pleurotus*. *Revista Latinoamericana de Química*. 42/1: 13 -2.

Artículos en preparación

Chegwin-Angarita, C., I.J. Nieto-Ramirez, L. Sepúlveda, L. Atehortúa. Producción de biomasa de tres especies del género *Pleurotus* empleando fuentes de carbono no convencionales. Revista Mexicana de Micología.

Sepúlveda, L., Chegwin-Angarita, C., I.J. Nieto-Ramirez, L. Atehortúa. Use of non-conventional sources of carbon in the biotechnological production of biomass with potential antifungal activity of three species of *Pleurotus*. International Journal of Medicinal Mushrooms.

Presentaciones en eventos

Ponencia oral:

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. El papel de las fermentaciones en estado líquido y en estado sólido sobre la producción de compuestos triterpenoidales en hongos macromicetos: el caso del género *Pleurotus*. VII Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones. Talca – Chile. Noviembre de 2013.

Poster:

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. Inóculo líquido: una alternativa para el cultivo de hongos del género *Pleurotus*. VII Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones. Talca – Chile. Noviembre de 2013.

Carolina Chegwin-Angarita, Ivonne Jeannette Nieto-Ramírez, Carolina Suarez A. Elicitación con LEDs para la producción de triterpenoides en fermentaciones en estado líquido de hongos del género *Pleurotus*. Talca – Chile. Noviembre de 2013.