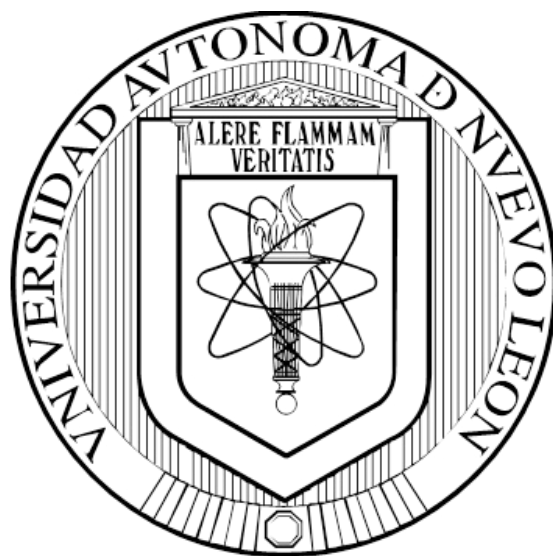


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL ERITRITOL SOBRE EL DESARROLLO Y FRUCTIFICACIÓN
DE *Pleurotus ostreatus*

PRESENTA

L.B.G. EDUARDO ALAIN SÁNCHEZ SALDÍVAR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

ENERO, 2018

Efecto del eritritol sobre el desarrollo y fructificación de *Pleurotus ostreatus*

Comité de Tesis

Dr. Efrén Robledo Leal.
Director de Tesis

Dr. Arturo Espinoza Mata.
Secretario

M.C. Juan Manuel Adame.
Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna.
Vocal

Dra. Licet Villareal Treviño.
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efrén Ricardo Robledo Leal y a la Facultad de Ciencias Biológicas, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto

Particularmente agradezco al Dr. Arturo Espinoza Mata por su apoyo con equipos para la realización del proyecto, al Maestro Juan Manuel Adame por las asesorías y consultas realizadas a su persona, Además del Dr. Carlos Hernández Luna y Dra. Licet Villareal Treviño por su apoyo, equipo, instalaciones, asesorías, consultas y recursos prestados.

A todos los maestros, tesisistas, y amigos del área de Microbiología en los Departamentos de Micología, Fitopatología y Manipulación genética. por permitirme su valioso tiempo, experiencia, y asesoramiento durante la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia...

A mis padres, Guadalupe Eduardo Sánchez Quiroz y Berenice Saldívar Rodríguez. Mi hermana Samantha Emanuel Sánchez Saldívar. Por su amor, apoyo, comprensión y por todos sus esfuerzos a lo largo de mi vida.

A mis amigos...

Por permitirme su amistad, apoyo e ideas durante esta etapa de mi vida.

A mis maestros...

Quienes nunca desistieron de enseñarme, y que continúan depositando su esperanza en mí.

ÍNDICE

1.	RESUMEN EN ESPAÑOL	7
2.	RESUMEN EN INGLÉS	8
3.	INDICE DE FIGURAS	9
4.	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	10
5.	INTRODUCCIÓN	11
6.	ANTECEDENTES	13
6.1.	Eritritol	13
6.2.	Género Pleurotus	14
6.3.	Inductores de crecimiento en hongos y vegetales.	17
6.4.	Metabolismo de carbohidratos en el crecimiento de hongos	23
6.5.	Poliolés aplicados al cultivo de hongos	27
6.6.	Relación entre poliolés, presión osmótica y estabilidad enzimática.	32
6.7.	Efecto de los poliolés en la actividad enzimática	33
7.	JUSTIFICACIÓN	37
8.	HIPÓTESIS	38
9.	OBJETIVOS DEL TRABAJO	39
9.1.	Objetivo General	39
9.2.	Objetivos Particulares	39
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
10.1.	Cepa de Pleurotus ostreatus	40
10.2.	Sustratos	40
10.3.	Medios de cultivo	40
10.4.	Efecto del eritritol como única fuente de carbono	41
10.5.	Efecto en el crecimiento y observación de cambios microscópicos.	41
10.6.	Efecto del eritritol sobre la producción de biomasa	42
10.7.	Efecto del eritritol sobre la producción de carpóforos	42
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
12.	RESULTADOS	45
12.1.	Capacidad de metabolizar fuentes de carbono	45
12.2.	Crecimiento radial	46
12.3.	Observaciones y cambios morfológicos en el micelio de P. ostreatus.	47
12.4.	Peso seco	51
12.5.	Evaluación de carpóforos.	53

13.	DISCUSIÓN	59
14.	CONCLUSIONES	64
15.	PERSPECTIVAS	65
16.	BIBLIOGRAFÍA	66
17.	RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	73

1. RESUMEN EN ESPAÑOL

Los polioles son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo que se utilizan como edulcorantes debido a que no son absorbidos en el intestino, son producidos de manera natural por diversos organismos en particular hongos y plantas, algunos ejemplos de estos son el manitol, glicerol, xilitol y el eritritol. En base a investigaciones realizadas en hongos comestibles tales como *Lentinula edodes*, así como los resultados observados en el crecimiento de hongos asociados a líquenes y micorrizas. Se determinó que diversos polioles confieren efectos positivos, estos efectos van desde el un incremento de la biomasa y el mejoramiento de la velocidad de crecimiento. Se buscó determinar si el eritritol confería efectos positivos sobre el desarrollo y producción de hongo *Pleurotus ostreatus*, así como la concentración ideal del mismo sobre el hongo. Se realizaron múltiples pruebas en que se probaron las concentraciones de 0, 0.05, 0.5 y 5% de eritritol en el medio de cultivo. Estas pruebas midieron los valores de producción de biomasa, tiempo de crecimiento, además de cambios morfológicos a nivel microscópico y macroscópico para concluir con la evaluación de la producción de carpóforos. Las pruebas iniciales no mostraron cambios significativos la producción de biomasa y el tiempo de producción del hongo no son afectados en las concentraciones de prueba de 0, 0.05, 0.5% por el contrario las pruebas realizadas al 5% mostraron efectos deletéreos al reducir el crecimiento del hongo. En base a las observaciones microscópicas se dedujo que la concentración de eritritol afecta la morfología del micelio y esto se ve reflejado en un efecto negativo sobre el mismo. Los resultados en la fase de fructificación fueron semejantes a los de la fase inicial al no mostrar cambios aparentes en las características de los carpóforos en relación con peso, morfología, aunque se mostró un incremento significativo en la producción de carpóforos en la concentración de 0.05% de eritritol la cual produjo un 39% más carpóforos que el control al 0% de eritritol, los cuales no mostraron cambios aparentes como la reducción de peso o volumen lo que indicaba la adicción de eritritol al 0.05% mejoraba la capacidad del hongo de extraer nutrientes del sustrato. Hay una correlación directa entre la concentración de eritritol en el sustrato y los cambios morfológicos en el micelio, la naturaleza de estos cambios es positiva en un rango de 0.05% dependiendo de la prueba, tal es el caso incrementó la producción de carpóforos.

2. RESUMEN EN INGLÉS

Polyols are polyhydric alcohols with several hydroxyl groups, those are used as sweeteners because they are not absorbed by the intestine, are produced naturally in various organisms in particular fungi and plants, some examples of these are mannitol, glycerol, xylitol and erythritol. Based on research conducted on the edible fungi *Lentinula edodes*, as well as the results observed in the growth of fungi associated with lichens and mycorrhizae, it was determined that various polyols confer positive effects, these effects range from an increase in biomass and the improvement of the growth rate. We seek to determine whether erythritol conferred positive effects on the development and production of the fungus *Pleurotus ostreatus*, as well as the ideal concentration of the same on the fungus. Multiple tests were performed in which the concentrations from 0, 0.05, 0.5 and 5% of erythritol in the culture medium were tested. These tests measured the values of biomass production, growth rate, in addition to morphological changes at microscopic and macroscopic level to conclude with the evaluation of the production of carpophorus. The initial tests did not show significant changes, the production of biomass and the growth rate of the fungus weren't affected in the test concentrations of 0, 0.05, 0.5%, on the contrary, the tests carried out at 5% showed deleterious effects when reducing the growth of the fungus. Based on the microscopic observations it was deduced that the concentration of erythritol affects the morphology of the mycelium and this is reflected in a negative effect on it. The results in the fructification phase were similar to those of the initial phase, showing no apparent changes in the characteristics of the carpophorus in relation to weight, morphology, although there was a significant increase in the production of carpophorus in the concentration of 0.05% of erythritol which produced 39% more carpophorus than the 0% of control erythritol, which did not show apparent changes, such as the reduction of weight or volume, indicating the addition of 0.05% erythritol, improved the fungus's ability to extract nutrients from the substrate. There is a direct correlation between the concentration of erythritol in the substrate and the morphological changes in the mycelium, the nature of these changes is positive in a range of 0.05% depending on the test, such is the case of an increase in production of carpophorus

3. INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura 1.	Estructura química del eritritol	13
Figura 2.	Ciclo de vida de los Basidiomicetos	15
Figura 3.	Frascos de cultivo	43
Figura 4.	Prueba de metabolismo	45
Figura 5.	Crecimiento radial	46
Figura 6.	Crecimiento radial	47
Figura 7.	Microscopia en PDA	48
Figura 8.	Programa de análisis de imágenes ImageJ	49
Figura 9.	Análisis de los resultados del programa ImageJ	49
Figura 10.	Microscopia en Agar Czapek	50
Figura 11.	Cultivo en medio líquido	51
Figura 12.	Peso seco	52
Figura 13.	Análisis de Peso seco	52
Figura 14.	Condiciones experimentales de producción de carpóforos	53
Figura 15.	Carpóforos en fructificación	54
Figura 16.	Análisis de peso de los carpóforos	54
Figura 17.	Análisis de largo de los carpóforos	55
Figura 18.	Análisis de diámetro del sombrero los carpóforos	55
Figura 19.	Análisis de tiempo de maduración	56
Figura 20.	Valores de producción de carpóforos	57
Figura 21.	Comparación de carpóforos.	58

4. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
°C	Grados Celsius
EU/mg x 10 ³	Unidades de enzima por miligramo
g	Gramos
g/L	Gramos por Litro
H	Hora/Horas
L	Litros
M	Molar
M/dm ³	Moles por decímetro cúbico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mol/L	Moles por Litro
Mpa	Mili-pascales
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución.

5. INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos es una de las industrias más rentables, tomando en cuenta que los hongos son cultivados usando material de desecho o materiales de bajo costo, convirtiéndolo en una industria con ganancias de aproximadamente 1,900 millones de dólares anuales de acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2016). Esto genera un gran campo de inversión con respecto a la mejora en la producción y la calidad de los hongos para el consumo humano en este aspecto el cultivo de hongos a escala industrial está altamente estandarizado controlando las condiciones de esterilidad, temperatura, humedad, pH, nutrientes en el sustrato, cepas de alta producción entre otras condiciones, pero aún está limitada por los tiempos de crecimiento de algunas variedades que aún en condiciones ideales puede tomar largos periodos de tiempo en obtener una cosecha.

De manera natural a lo largo de múltiples estudios se ha demostrado la existencia de sustancias estimulantes las cuales inducen una respuesta ya sea incrementando la velocidad de crecimiento de diversos microorganismos ya sea indicando un punto de entrada o concentración de nutrientes, tal es el caso de *Fusarium graminearum* el cual presenta predilección por usar las anteras de las plantas de trigo como sitio de entrada para iniciar la infección (Strange & Smith, 1971). En este caso un estimulante indica el mejor sitio de entrada por el que el hongo puede propagarse o actúa como señal de activación para iniciar la infección. En estudios posteriores se demostró que los agentes causantes de este efecto en las anteras de las inflorescencias del trigo eran la colina y la betaína también conocida como trimetilglicina (Strange, 1974).

El micelio, pese a su imagen homogénea, sufre cambios en su composición a lo largo de su desarrollo, maduración y fructificación. En un estudio realizado por Hammond & Nichols (1976), se demostró que en los carpóforos del hongo *Agaricus bisporus* se acumula manitol (un poliol) y se reducía en concentración en el micelio lo que indica que este es necesario en la maduración y crecimiento de los carpóforos.

El uso de polioles como el para mejorar el desempeño de crecimiento y la velocidad de producción en cuestión del tiempo necesario para poder cosechar es un importante

campo de investigación, el cual se basa en que estos son requeridos de manera natural para inducir la fructificación. Tal es el caso de *Coprinus cinereus* (Nyunoya & Takemaru, 1984), en la cual se demostró que cuando una cepa presenta bloqueada su ruta metabólica natural para inducir la fructificación esta se puede inducir de manera artificial mediante la adición de carbohidratos y polioles.

El uso del eritritol como acelerador de crecimiento ya ha sido documentado en diferentes organismos: en el hongo *Lentinula edodes*, y los vegetales *Raphanus sativus*, *Allium sativum*, *Arabidopsis thaliana* (Kuroda & Hirakawa, 2008), así como un osmoregulador en otros los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces farinosus*. (Hallsworth & Magan, 1995).

Otro ejemplo de la asociación entre los hongos y los polioles es el caso de la simbiosis de la planta *Stevia rebaudiana* y el hongo *Piriformospora indica* en el cual el efecto del hongo sobre crecimiento de la planta, así como la producción de glucósidos de steviol los cuales se incrementan en la planta sirviendo como nutrientes aprovechables por *P. indica*. (Kilam *et al.* 2017), estos glucósidos se generan a partir de una derivación de la ruta de la glicolisis a partir de la ruta del 2-C-metil eritritol 4-fosfato (MEP).

Con respecto a la seguridad del eritritol como aditivo para productos alimenticios, este se presenta como un compuesto inocuo que es casi totalmente absorbido en el intestino delgado, (FDA, 2011). Los efectos secundarios gástricos del consumo excesivo se presentan cuando se supera un consumo de 0.5gr/Kg, los cuales son el efecto laxante, flatulencias y dolor abdominal, dado que el eritritol se absorbe en el intestino delgado en proporción de 60 a 90% para posteriormente eliminarse en la orina el riesgo que este presenta es bajo.

6. ANTECEDENTES

6.1. Eritritol

El eritritol (butano-1,2,3,4-tetraol) es un polialcohol (poliol) empleado como sustituto de azúcar (Figura 1). Aprobado en Estados Unidos como edulcorante, por la FDA, se produce de forma natural en frutas y alimentos fermentados.

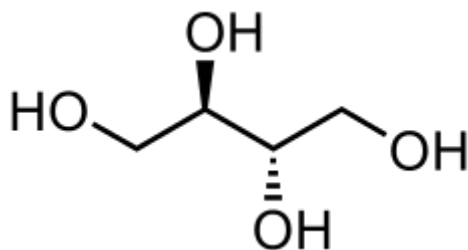


Figura 1. Estructura química del eritritol

A nivel industrial, se produce a partir de glucosa o dextrosa que se aplica a la levadura *Moniliella pollinis*, este es producido por fermentación, que utiliza un medio a base de carbohidratos para producir eritritol, este medio contiene dextrosa, fosfato de diamonio, sulfato de magnesio y extracto de levadura además del inóculo. Este medio se utiliza para cultivo iniciador de *M. pollinis* y para producción industrial de manera indistinta. Una vez completado el proceso de fermentación, los microorganismos se matan por calentamiento, elevando la temperatura del medio de cultivo de 85 a 90 °C. Después de la inactivación completa por tratamiento térmico, las células muertas del medio de cultivo se separan por filtración. El sobrenadante se somete a un proceso de purificación y cristalización donde los cristales se separan por centrifugación, seguido por lavado con agua, evaporación, secado con aire caliente, tamizado y envasado, el producto final es aproximadamente eritritol puro al 99.5%. el cual es un sólido cristalino soluble en agua y parcialmente soluble en etanol, que se derrite a los 120 °C y entra en ebullición a 330 °C, de color blanco sin aroma y de sabor dulce con un poder edulcorante de entre 60 y 70% del azúcar de mesa, el cual es relativamente estable en condiciones ácidas y alcalinas. (FDA, 2011).

6.2. Género *Pleurotus*

Pleurotus ostreatus pertenece al *phylum* de los basidiomicetos, una división del reino Fungi que comprende aproximadamente de 23,000 a 25,000 especies las cuales son capaces de presentar un ciclo reproductivo sexual (Figura 2). Los basidiomicetos pueden ser saprófitos, ayudando en la recuperación del suelo y la degradación de materia orgánica, como madera y otros desechos orgánicos. Son hongos generalmente subterráneos y algunos de ellos son simbioses mutualistas que se asocian con las raíces de diversas plantas las cuales suministran nutrientes que el hongo por sí mismo no puede sintetizar o conseguir y que en respuesta produce un microambiente que protege a las raíces de patógenos, condiciones adversas o provee nutrientes como nitrógeno que la planta no puede obtener por sí sola. Dentro de este mismo grupo se encuentran también hongos patógenos de plantas tales como las royas y los carbones.

P. ostreatus se desarrolla casi siempre en troncos o tocones de árboles en fase de descomposición lo que lo clasifica como un saprófito, aunque en algunas raras ocasiones puede comportarse como parásito oportunista al propagarse en árboles vivos que presentan las condiciones apropiadas. Los carpóforos presentan un tamaño de entre 5 y 20 cm, en coloraciones que van desde el blanco hasta el gris oscuro, son comestibles y se les cultiva activamente en muchas regiones por su valor comercial. Está ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales, presenta un micelio septado blanquecino, longitudinalmente radial, que con forme envejece se hace algodonoso. El micelio envejecido a menudo secreta gotas de color amarillentas a anaranjadas de un metabolito el cual es una toxina para los nemátodos, sus esporas son de color blancas a ligeramente grises, de entre 3 – 4 μm .

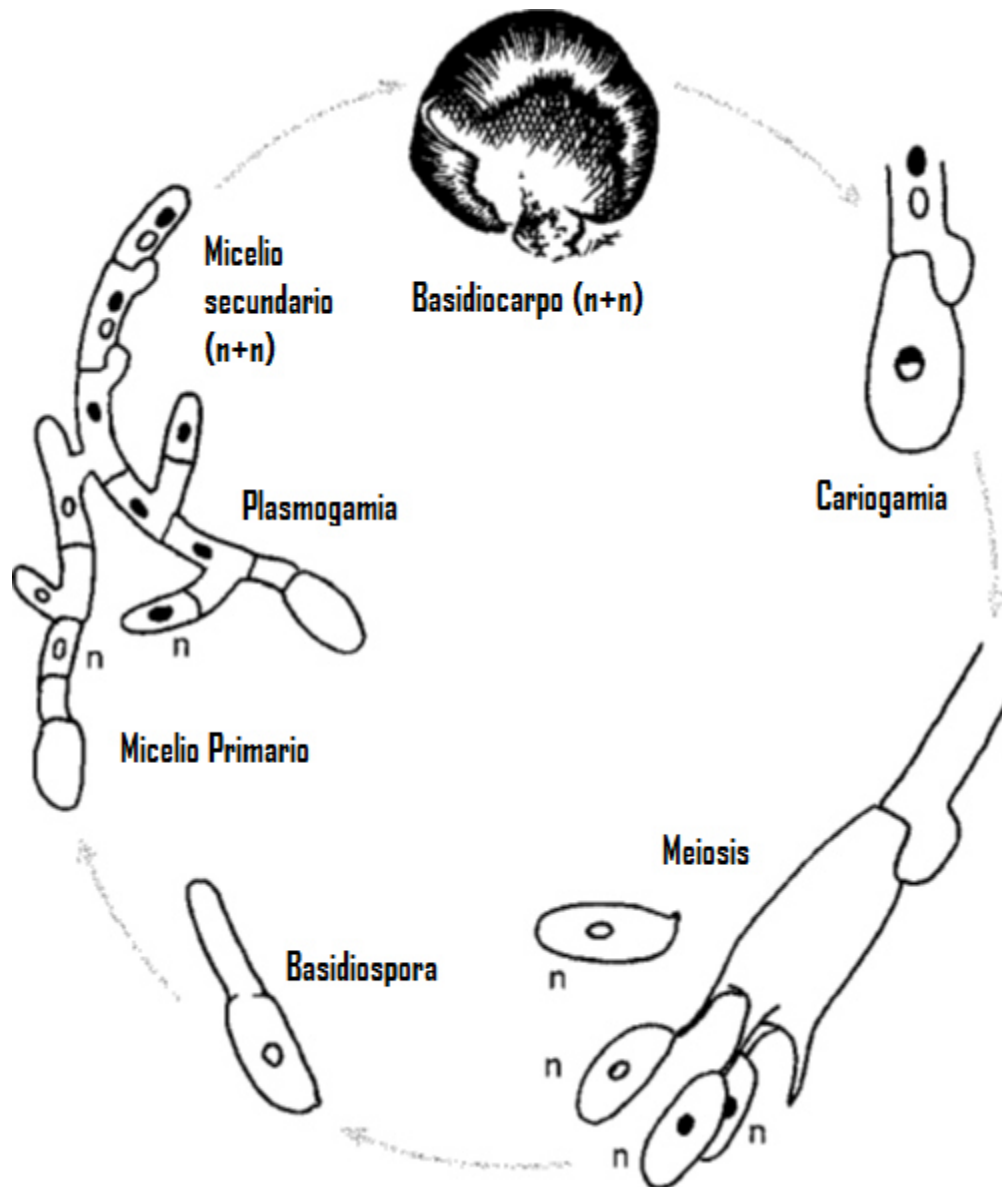


Figura 2. Ciclo de vida de los basidiomicetos.

Es fácil de cultivar en múltiples sustratos lignocelulósicos, requiere condiciones de entre 24 y 27° C con una humedad relativa de entre 85 y 95%. La formación de primordios se consigue entre 3 a 5 días después de que los nutrientes del sustrato se comienzan a agotar de acuerdo con lo reportado esto se consigue al exponer los micelios a una temperatura de entre 10 y 15° C generando un choque térmico y la maduración de los carpóforos a una temperatura de entre 15 y 21° C. Las desventajas de su cultivo son su corta vida útil después de la cosecha y los problemas de salud asociados la masiva carga de esporas generada dentro de los confines del área de cultivo (Stamets., 2011).

P. ostreatus pertenece al grupo de los hongos de pudrición blanca los cuales tienen un grupo de enzimas celulasas oxidasas y lignasas que les permiten degradar los componentes de las paredes celulares de la materia vegetal. En un experimento se estudiaron las capacidades de degradación de dos hongos *P. ostreatus* y *Trametes versicolor*. Los carpóforos de *P. ostreatus* y *T. versicolor* fueron recogidos de un árbol de haya caído en el bosque de Alamdardeh, Irán. Las muestras de madera de haya fueron expuestas a ambos hongos durante un periodo de 120 días. Se evaluó la pérdida de masa, la resistencia a la compresión, así como el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa, en las muestras antes y después de la exposición a hongos, los resultados mostraron que las capacidades de degradación y los patrones de descomposición de la pudrición en la madera de haya debido a hongos *P. ostreatus* y *T. versicolor* indicaron que ambos hongos tienen capacidades de degradación similares ya que redujeron la celulosa en un 15 %, la lignina en un 60 % sin reducir las hemicelulosas de manera significativa y son capaces de afectar a la madera de haya de la misma manera con mecanismos similares. La exposición a hongos de pudrición blanca redujo la masa de la madera en un 26%, la resistencia a la compresión causada por la pérdida de lignina se redujo en el caso de *Pleurotus* en aproximadamente un 46 % mientras que en *T. versicolor* fue de 56%. La reducción de los componentes químicos de la madera de haya fueron similares para ambos hongos del ensayo y los análisis por espectroscopia confirmaron cambios similares en la madera debido al ataque de hongos (Bari *et al.*, 2015).

Pleurotus incluye a algunas especies comestibles de gran interés comercial, como el hongo “seta” *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju* entre otras. Experimentalmente se evaluaron los valores nutricionales y los resultados arrojaron valores de un 47% de carbohidratos, 17% de proteína, 6% de grasas, 9% de fibra, 3% de nitrógeno libre, 6% de cenizas como excedente, al ser cultivado en diferentes sustratos (paja de arroz y cáscara de plátano) estos sustratos se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 1 h 30 min, se enfriaron a la temperatura ambiente bajo radiación UV durante 30 min, se inocularon en una cámara de flujo laminar y se inocularon utilizando inóculo al 10% en peso seco. Los resultados mostraron que el tipo de sustrato no influía en los valores nutricionales lo que demostraba la capacidad de *Pleurotus* de obtener nutrientes de diferentes sustratos lignocelulósicos (Bonatti *et al.*, 2004).

Si bien no hay diferencias marcadas en la calidad o los valores nutricionales de *P. ostreatus* dependiendo del tipo de sustrato en que *Pleurotus* sea cultivado, se demostró que el sustrato juega un rol importante en la producción del hongo. Se cultivó el hongo en diferentes sustratos tales como semilla de algodón, paja de trigo, aserrín y en papel de desecho. Se evaluó el tamaño y grosor del píleo, así como el largo y grosor del talo en los diferentes sustratos y no se mostraron diferencias significativas, salvo en el caso del papel el cual obtuvo un mejor desempeño en el grosor del píleo, pero en relación con la producción del hongo la semilla de algodón fue la que tuvo la mayor producción por kilogramo (32 carpóforos) mientras que la paja de trigo y el papel de desecho tuvieron una producción de 18 carpóforos/Kg y dejando en la menor eficacia al aserrín con solo 11 carpóforos. Cuando se comparan los niveles de producción en gramos también se puede ver que el mejor desempeño se obtuvo en semilla de algodón con un peso de 315 gr. de producción seguido del papel el cual produjo 235 gr. También se compararon los niveles de reducción de peso del sustrato tras el desarrollo del hongo en que la semilla de algodón tuvo una eficiencia del 74% de capacidad de ser procesada por *P. ostreatus*, mientras que el papel y la paja se metabolizan en un 35% y el aserrín solo en un 9.7%, de esto se puede concluir que más que afectar la calidad del producto los diferentes tipos de sustrato influyen en la capacidad de producción. En este estudio, el mayor porcentaje de eficiencia biológica se obtuvo a partir de semillas de algodón y el menor se observó en el aserrín. Esto podría atribuirse al hecho de que los materiales lignocelulósicos en el aserrín son generalmente bajos en su contenido de proteína y por lo tanto inadecuado para el cultivo de hongos, aunque el rendimiento se puede mejorar mediante procesos de compostaje previos que ayuden a liberar los nutrientes y volverlos disponibles para *P. ostreatus*, además de la suplementación con fuentes de nitrógeno fósforo y potasio. (Girmay *et al.*, 2016).

6.3.Inductores de crecimiento en hongos y vegetales.

El uso del glicerol presenta un amplio campo de trabajo como aditivo para la producción de fertilizantes y mejorar la actividad de formulados para el biocontrol de insectos fitopatógenos, esto debido a que el glicerol presenta múltiples características que lo vuelven atractivo para su uso al ser un material de desecho de la industria de producción

de biocombustibles el cual cada año aumenta aproximadamente en un 10 % y que debido a los residuos e impurezas que presenta este es usualmente incinerado y del cual solo se utiliza solo un estimado del 3%, pudiendo este ser utilizado en la industria con múltiples aplicaciones una de estas puede ser utilizado para la producción de biofertilizantes por sus propiedades de bajo costo, fuente de carbono adecuada para los organismos de la rizósfera, propiedades amortiguadoras contra condiciones de estrés térmico y osmótico, además de incrementar la producción vegetal (Vassilev *et al.*, 2016).

Los hongos presentan condiciones de crecimiento óptimas dependiendo de factores tales como la fuente de carbono, el nitrógeno, la temperatura y el pH. En un estudio realizado se evaluó el desempeño de diferentes cepas de hongos ectomicorrícicos al probar el desempeño del crecimiento de las siguientes especies *Lactarius deliciosus*, *Russula sanguinaria*, *Tricholoma batchii*, *Tricholoma imbricatum*, *Suillus collinitus*, *Suillus granulatus*, al ser cultivadas en 6 diferentes fuentes de carbono: glucosa, xilosa, dextrosa, arabinosa, almidón y sacarosa a una concentración de 10 g/L en los que se midió el crecimiento radial en placa a los 7, 14, 21 y 28 días, dando los mejores resultados en crecimiento *L. deliciosus* en glucosa, arabinosa y sacarosa, alcanzando un tamaño medio radial de 5.7 cm. *R. sanguinaria* en dextrosa y glucosa mostró un crecimiento radial de aproximadamente 2.9 cm. Ambos *Suillus* se desarrollaron en sacarosa alcanzando un tamaño de 5.2 cm en *S. collinitus* y 8.3 cm en *S. granulatus*, esto sugirió que organismos pertenecientes al mismo género tienden a tener un metabolismo semejante. Para *T. imbricatum* se desarrolló en dextrina y sacarosa alcanzando un crecimiento radial de alrededor de 4.5 cm y *T. batchii* obtuvo su mejor desempeño en dextrosa, glucosa y arabinosa con un crecimiento medio de 4.8 cm. Los datos confirman que los hongos presentan diferentes fuentes de carbono preferenciales las cuales pueden ser utilizadas para mejorar la producción, así como la velocidad de crecimiento de los hongos (Lazarević *et al.*, 2016).

Los hongos entomopatógenos tales como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces farinosus* pueden ser agentes de control biológico eficaces con una humedad relativa cercana al 100%; en menor disponibilidad de agua, la germinación de

los propágulos, y la infección del hospedero no puede ocurrir, experimentalmente los conidios con concentraciones intracelulares más altas de glicerol y eritritol germinaron más rápidamente y con menor cantidad de agua disponible esto ya que los polioles actúan entrando dentro de las células a una baja concentración de agua disponible sin perturbar la estructura enzimática permitiendo que esta se mantenga la actividad metabólica a bajas concentraciones de agua además de actuar como una fuente de carbono secundaria para el organismo, mediante la manipulación del medio para inducir una mayor acumulación de polioles en los conidios ayudó a la germinación al actuar como fuente de carbono y como regulador de la presión osmótica. La manipulación fue mediante el cambio en la fuente de carbono con la que se realizó el crecimiento del hongo siendo las cepas que crecían en glicerol o en almidón las que presentaban las mayores concentraciones de eritritol/glicerol y manitol respectivamente (Hallsworth & Magan, 1995).

El uso de fuentes de carbono sobre la producción de esporas del hongo *M. anisopliae* mostraron que en presencia de fuentes de carbono no preferenciales se induce un fenotipo de estrés el cual reducía los niveles de producción de esporas, pero incrementa los niveles de resistencia a luz UV-B lo cual era una ventaja para la resistencia del hongo a las condiciones ambientales en base a la expresión de genes de respuesta a estrés son activados durante la fase estacionaria en crecimiento en fuentes de carbono no preferenciales particularmente genes de respuesta a estrés osmótico, choque térmico y respuesta a privación de nutrientes, además de otros como la síntesis y acumulación de trehalosa la cual actúa inhibiendo la desnaturalización de las estructuras intracelulares lo que tiene un efecto en la resistencia a luz UV-B. Experimentalmente se comparó el medio de cultivo papa dextrosa, agar suplementado con extracto de levadura (PDAY) como el medio de crecimiento preferencial y se comparó contra un medio mínimo mineral solo con sales y una fuente de nitrógeno inorgánico, suplementado con una fuente de carbono al 3%. Los resultados mostraron que en efecto la mayor esporulación se dio en el medio PDAY siendo casi del triple que en cualquier otra fuente de carbono, pero en relación con la resistencia a la luz UV-B obtuvo los peores resultados en resistencia siendo superado por fuentes de carbono como la arabinosa, fructosa, galactosa, glicerol, inositol, lactosa, manitol, manosa y el sorbitol, esto deriva en que las

esporas de estos hongos pueden mantener su viabilidad un mayor tiempo y en condiciones menos favorables (Rangel *et al.*, 2006).

En la propagación de árboles de olivo la propagación por semilla además de ser un proceso lento se obtiene una baja cantidad de árboles que lleguen a madurar lo que es un problema, a la hora de conseguir material para propagar plantas en huertos. En experimentos llevados a cabo, se propagaron semillas *in vitro* a las que en los medios se agregaron diferentes fuentes de carbono como la sacarosa y el manitol. En la que el manitol obtuvo mejores resultados comparados contra la sacarosa casi duplicando el desarrollo de los explantes tras 60 días de cultivo, esto se explica porque en plantas se determinó que el manitol ofrece una ventaja ya que al metabolizarse este genera 2 ATPs en cambio la sacarosa tiene que ser metabolizada utilizando ATP en el proceso (García *et al.*, 2002).

El cultivo de *Usnea ghattensis* es de alto interés debido a que este es reservorio de una serie de metabolitos secundarios entre ellos el ácido úsnico que es un antibiótico natural de alto interés, activo frente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, y algunas especies anaeróbicas (*Bacteroides* y *Clostridium*) incluyendo cepas resistentes a las beta-lactamasas. Lamentablemente el cultivo de los mismos en condiciones de laboratorio es lento y la producción de estos metabolitos no es la suficiente para costear los medios de cultivo o los tiempos de producción de manera rentable, por lo que modificaciones en el medio de cultivo con el fin de incrementar el crecimiento, así como los niveles de ácido úsnico producidos. Se probaron 2 series de experimentos diferentes, en la primera serie de experimentos se probó con fuentes de carbono y aminoácidos, en concentraciones desde 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 y 0.1 mol/l además de vitaminas en concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/mL. En la segunda fase experimental se cultivaron en medio papa dextrosa adicionado con combinaciones de los siguientes componentes: 0.01 mol/L de sacarosa, 0.01 mol/L de polietilenglicol y 0.005 mol/L de glicina. Los resultados demostraron que las azúcares, así como los aminoácidos y las vitaminas no eran suficientes para inducir un efecto en el crecimiento del liquen o la producción de ácido úsnico. Cuando estos se cultivan en medio extracto de malta la adición de 0.01 mol/L de sacarosa en relación con

el control de extracto de malta puro este triplicaba la biomasa e incrementada hasta 13 veces la concentración de ácido úsnico y la adición de polietilenglicol 0.01 mol/L generó un incremento de 6 veces la cantidad de biomasa y 38 veces la cantidad de ácido úsnico, en relación con el control de extracto de malta puro por lo que el exceso en la concentración de la fuente de carbono tuvo el efecto de incrementar el desempeño del liquen (Behera *et al.*, 2007).

Se buscó optimizar las condiciones de cultivo de los hongos *Lactarius pyrogalus* y *Lactarius controversus*. Mediante evaluación de diferentes medios de cultivo en agar papa dextrosa, agar biotina, agar ácido fólico, agar extracto de malta, agar-Melin Norkrans modificado y medio M40 modificado, en la que el medio PDA obtuvo el mejor desempeño en cuanto a desarrollo del micelio se refiere, se evaluó el efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento del hongo obtuvo los mejores resultados a una temperatura de 25 °C y no presentó cambios significativos en un rango de pH de 4 a 6. Posteriormente se utilizó el medio Melin Norkrans modificado libre de carbono para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento, al que se adicionaron 7 diferentes fuentes de carbono para determinar la que reportaba los mejores resultados, en el crecimiento estas fueron glucosa, lactosa, maltosa, dextrosa, manitol, sacarosa y xilosa en una concentración de 10 g/L. Las fuentes de carbono que tuvieron efecto significativo sobre la tasa de crecimiento del micelio en ambas especies de *Lactarius* fueron manitol, glucosa, el medio libre de carbono, dextrosa y maltosa y en *L. pyrogalus* el manitol, el medio libre de carbono y la lactosa fueron las más altas para *L. controversus* (Kibar *et al.*, 2011).

Un estudio llevado a cabo en *Amanita caesarea*, un hongo micorrízico comestible asociado con el árbol de alcornoque (*Quercus suber*) y con el castaño (*Castanea sativa*) con respecto al efecto de diferentes fuentes de carbono, así como fuentes de nitrógeno, condiciones de temperatura y pH, arrojó como resultado que la fuente de carbono con mayor eficiencia para el crecimiento es el manitol a un 2% que fue probado en medio Melin Norkrans modificado al que se le retiró la glucosa para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento del hongo, esto se realizó mediante la preparación del medio suprimiendo la adición de glucosa y reemplazandola por las

azúcares de prueba en una concentración de 20 g/L, las cuales fueron almidón, glucosa, fructosa, manitol, sacarosa y xilosa. Los resultados se midieron en relación al crecimiento del micelio y al peso seco total del mismo, que se evaluaron tras 40 días de crecimiento (Daza *et al.*, 2006).

Un enfoque diferente sobre la necesidad de los polioles en el desarrollo de los hongos o el efecto de la carencia de estos se puede ver reflejada en un estudio realizado mediante la inserción del gen de manitol deshidrogenasa (*MTD*) de apio en plantas de tabaco lo que generaba resistencia en la planta al hongo *Alternaria alternata* el cual produce manitol como contra medida a la respuesta de la planta a las infecciones por el hongo, *A. alternata* que produce manitol con el fin de reducir la capacidad de la planta de defenderse de la infección al suprimir el efecto de las especies reactivas de oxígeno, que son secretados por la planta en respuesta a la infección. La resistencia se consiguió mediante la transfección del gen *MTD* de apio lo que permitía a la planta de tabaco degradar el manitol secretado por el hongo, se comprobó el efecto protector de la inserción mediante la comparación de los síntomas causados por *A. alternata* y *Cercospora nicotianae* ambos hongos que afectan al tabaco con la diferencia que *C. nicotinae* no secreta manitol. Experimentalmente mediante la inoculación controlada con esporas en suspensión de *A. alternata* sobre hojas de la planta nativa y la cepa transfectada se observó la supresión de las lesiones necróticas causadas por el hongo, no así *C. nicotinae* la cual mostró lesiones en las hojas de la variedad nativa como la cepa transfectada confirmando que el efecto protector se debía a la reducción de la cantidad de manitol del hongo (Jennings *et al.*, 2002).

En otro estudio se evaluó el efecto que tendría la adición de diferentes concentraciones de manitol sobre el desarrollo de la cápsula y el exopolisacárido de la levadura *Cryptococcus neoformans* el cual es el principal factor de virulencia al permitirle sobrevivir en el interior de los macrófagos. Esto se logró mediante el cultivo *in vitro* con manitol como fuente de carbono en un medio mínimo en concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 y 3.9 mM y en paralelo con glucosa en las mismas concentraciones a modo de control, donde el mayor crecimiento de la cápsula se alcanzó en una concentración de manitol a 125 mM. En condiciones *in vivo* se tomaron ratas a

las que durante 12 días se les administró de manera intraperitoneal 100 µl con una concentración de 20% peso-volumen de manitol o glucosa además de PBS a modo de control. Al séptimo día del tratamiento se infectaron con una concentración de 10^7 UFCs/ml de manera intra traqueal, al 12 día los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de pulmón y cerebro. Los resultados de las pruebas *in vitro* mostraron un que *C. neoformans* tenía un mayor tamaño de cápsula al ser cultivado en manitol y los resultados *in vivo* mostraron que en el caso de ser expuesta al manitol no tuvo efecto sobre el desarrollo en pulmón, pero el mayor tamaño de la cápsula inhibió la capacidad *C. neoformans* de dispersarse a cerebro por lo que podría plantearse como una opción en el tratamiento de la criptococosis (Guimarães *et al.*, 2010).

6.4. Metabolismo de carbohidratos en el crecimiento de hongos

Los cambios en las concentraciones de arabitol y manitol indujeron cambios en el micelio y carpóforos del hongo *Flammulina velutipes* esto mediante la translocación de polioles adicionados al micelio marcados con carbono-14. Estos experimentos mostraron que al menos la mitad del manitol se transfiere desde el micelio para ser utilizado en el desarrollo de carpóforos, mediante la conversión de manitol a fructosa por parte de la enzima manitol deshidrogenasa dependiente de NAD (NADP⁺-MDH) que actúa metabolizando el manitol en fructosa en el hongo. La tasa de incorporación de manitol en carpóforos se calculó en 1.98 mg/día, de acuerdo a los resultados obtenidos en una prueba del metabolismo de manitol en los carpóforos, uno de 25 días de edad de fue extirpado y se cultivó en una solución que contenía 1 % de manitol durante 4 h y se trazó la distribución de la actividad de C¹⁴ en diferentes partes del carpóforo, donde la mayor parte de la radiactividad un 93.6 % se detectó en manitol absorbido por el hongo, y el 6.4 % restante se distribuyó entre fracciones de fructosa, glucosa, trehalosa, y otros compuestos fosfatados. Este resultado demostró que el manitol se había incorporado en la vía glucolítica a través de fructosa y se convirtió en diversos carbohidratos y ésteres de fosfato, así mismo la disminución de arabitol en el micelio correspondió cuantitativamente con el aumento de este en los carpóforos, lo que sugiere que la mayor parte de este poliol se sintetizó en el micelio, para posteriormente ser trasladado a los carpóforos, donde se acumula como un producto final. Estos resultados se obtuvieron

mediante análisis de cromatografía de gases para determinar la acumulación de los polioles en el micelio y carpóforos y la translocación del manitol marcado con carbono-14 del medio al micelio y los carpóforos mediante análisis de conteo de centelleo. Los resultados del efecto de las diferentes fuentes de carbono y polioles como la trehalosa o el manitol en el crecimiento y metabolismo del micelio y los carpóforos de *Flammulina velutipes* se evaluaron adicionando al medio de cultivo un 1% de glucosa, 1% de trehalosa y 1% de manitol además de un control sin ningún adicionado en estos experimentos. El control dio un peso de 202 mg de carpóforos y 274 mg de micelio en peso seco al compararla contra la glucosa se obtuvo un valor de 294.7 mg de carpóforos y 336.5 mg de micelio, la trehalosa 300.9 mg de carpóforos y 274.1 mg de micelio y el manitol obtuvo resultados de 243.4 mg de carpóforos y 331.2 mg de micelio respectivamente (Kitamoto *et al.*, 2000).

Se determinaron cambios en la concentración de carbohidratos en el micelio y en los carpóforos de *P. ostreatus*. Tomando muestras del micelio y de los carpóforos durante los diferentes estadios del crecimiento del hongo, se determinó que este genera trehalosa durante el crecimiento del micelio y que luego es utilizada para la fructificación del hongo, la glucosa se acumulaba en el micelio para posteriormente ser transferida a los carpóforos y que el manitol comenzaba a consumirse en el micelio a la par de la formación de los carpóforos inmaduros, en este artículo se mostró que el micelio pierde carbohidratos a diferente ritmo dependiendo de la localización del micelio en relación con la distancia que este tenga de los carpóforos donde las partes más alejadas de los puntos de fructificación tendían a perder primero los carbohidratos siendo estos transportados hacia los puntos de fructificación (Zhou *et al.*, 2016).

Psathyrella atroumbonata es un hongo comestible que pertenece al *phylum basidiomycetes*, del orden *agaricales* y a la familia *Coprinaceae*. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza que se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo donde crecen en residuos de los bosques en la madera muerta. El hongo se cultivó en medio PDA para obtener la cepa pura a partir de esporas de carpóforos y se utilizó un medio basal líquido que contenía extracto de levadura 2.5 g, KH_2PO_4 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{-H}_2\text{O}$ 0.05 g, FeSO_4 0.01 g, KNO_3 1.55 g y

1000 ml de agua desionizada al que se le agregaba la fuente de carbono a modo de prueba. Se inoculó el micelio, al que se adicionaron una serie de diferentes azúcares simples y complejos además de polioles en la que los mejores resultados se obtuvieron glucosa 210 mg/cm³, la cual fue determinada como la mejor fuente de carbono para ser utilizada luego la manosa con 173 mg/cm³ (S. G. & Fasidi., 2001).

Se evaluaron cambios en la producción y composición de diferentes compuestos antimicrobianos generados por el hongo *Aureobasidium pullulans* el cual produce una serie de compuestos efectivos contra *Streptococcus* los cuales son conocidos como liamocinas y cómo estos cambian cuando la fuente de carbono cambia en los que se probaron D-Fructosa, D-Glucosa, D-Manosa, D-Galactosa, D-Arabinosa, L-Arabinosa, D-Xylosa, D-Manitol, D-Sorbitol, D-Galactitol, D-Arabitol, L-Arabitol, D-Xylitol, D-Ribitol, L-Threitol, D-Threitol, Mesoerythritol, D-Glycerol. Se observó que la mayoría de las fuentes de carbono derivan en liamocinas con base en el manitol. Cambios en la conformación se observaron en los carbohidratos del sorbitol al glicerol que en mayor o menor medida producían liamocinas diferentes del manitol las cuales mantenían actividad contra *Streptococcus agalactiae* aun cuando la cabeza de la liamocina era cambiada por un poliol diferente del manitol esto es útil ya que se generan múltiples variedades de compuestos antimicrobianos los cuales tienen una alta especificidad contra patógenos del grupo *Streptococcus* sin tener que recurrir a antibióticos de amplio espectro (Price *et al.*, 2016).

Se buscó determinar si el hongo *P. ostreatus* posee el ciclo metabólico del manitol. Esto se demostró mediante la presencia de la enzima manitol 1 fosfato deshidrogenasa (M1PDH) la cual se encontraba presente a lo largo de todo el ciclo biológico del hongo y que fue detectada por medio de RT-PCR. El rol del manitol en el hongo cumple funciones de osmoregulador además de actuar regulando la presencia de NADPH y NADP. Para determinar la presencia de M1PDH en el hongo se realizaron extractos del hongo en diferentes estadios de desarrollo, así como del micelio y las esporas, se buscó evaluar la presencia de las enzimas responsables del ciclo del manitol, estas son: M1PDH, Fructosa-6-fosfato deshidrogenasa, Manitol-1-fosfato fosfatasa, fructoquinasa, NADH oxidasa, en estas enzimas los análisis se realizaron por triplicado en 5 lotes

diferentes de *P. ostreatus* con el fin de obtener resultados seguros de que la capacidad metabólica no era exclusiva de una cepa en particular, los resultados mostraron la presencia de todas las enzimas a lo largo del desarrollo del carpóforo lo que mostraba que *P. ostreatus* utilizaba el manitol durante su desarrollo y fructificación (Sengupta *et al.*, 2004).

En un estudio realizado sobre el hongo *Moniliophthora perniciosa* que es un patógeno del cacao y el tabaco se evaluó el efecto que tenían diferentes fuentes de carbono como polioles sobre el crecimiento, morfología, y cambios en capacidad de inducir necrosis en tejidos vegetales expuestos a las enzimas extracelulares de los cultivos del hongo sobre la superficie de las hojas de tabaco. En este experimento se evaluaron diferentes fuentes de carbono tales como la glucosa, el glicerol, manitol, galactosa, fructosa, manosa y sacarosa, en estas las fuentes de carbono no fermentables glicerol y manitol generaron cambios morfológicos semejantes a los vistos en el micelio cultivado en ausencia de una fuente de carbono principalmente generando un micelio de tipo floculante o aéreo es decir con una menor compactación y que generó niveles más altos de producción de enzimas lo que mostró una mayor actividad necrótica en las hojas expuestas las cuales mostraban lesiones en los puntos de explosión a los extractos del hongo cultivado en glicerol o en manitol si bien estos resultados eran similares a los vistos en cultivos generados en ausencia de una fuente de carbono se observó que los cultivos que crecieron en presencia de manitol o glicerol tuvieron un mayor crecimiento así como una mayor biomasa, además de una mayor actividad peroxidasa en relación con el glicerol que en ausencia de una fuente de carbono (Alvim *et al.*, 2009)

Se evaluó el efecto de diferentes medios y condiciones de cultivo sobre diversas cepas de *Pleurotus eryngii* aislados de diversas áreas en Israel en fueron evaluados en diferentes medios de cultivo como: PDA (papa dextrosa agar), PGA (papa glucosa agar), MEA (agar extracto de malta), CZA (medio de cultivo Czapek), con un pH ajustado a 5.4 ± 0.4 , y se probaron a diferentes temperaturas de 4° C, 19° C, 27° C, 30° C, y 37° C. De todos los medios de cultivo se alcanzó el mejor desempeño a 27° C en medio PDA en el que se obtuvo un micelio grueso y algodonoso ideal para mantener una cepa de cultivo; los medios PGA y MEA tuvieron un desempeño semejante siendo el medio de

cultivo Czapek el que inclusive en las condiciones óptimas mostró el menor desempeño mostrando sólo un crecimiento limitado. Se buscó demostrar si había diferencias a la tolerancia al estrés térmico entre las variedades europeas y las aisladas de Israel. En el experimento de tolerancia al estrés consistía en cultivar todos los genotipos y se incubaron a 37 °C durante 4 semanas, y luego a 27 °C durante 3 semanas más. El experimento se realizó por triplicado y se realizaron valoraciones de cada colonia a los 7 y 14 días después de la transferencia a 27 °C. Los resultados mostraron que las variedades europeas no podían sobrevivir a una temperatura de 37 °C, pero las variedades israelitas mostraron un mejor desempeño una vez que se les regresaba a las condiciones ideales por encima de sus condiciones de control que fueron incubadas a 27 °C en todo momento. Ellos concluyen que la alta variabilidad en las tasas de crecimiento entre las variedades de *P. eryngii* israelitas y su capacidad para tolerar temperaturas más altas que los genotipos europeos se debe a la adaptación a las temperaturas que en promedio son superiores a los 30 °C en Israel y que pueden ser de interés para su cultivo a escala comercial al mejorar las condiciones de producción de hongo solo con el control de la temperatura (Lewinsohn *et al.*, 2000).

El efecto del pH y la fuente de carbono puede inducir cambios morfológicos sobre el desarrollo de un hongo como en el caso de *Ustilago cynodontis*. Los resultados indicaron que en los que al cultivarse en glucosa ya sea en medio líquido o sólido el cambio entre el desarrollo de levadura o micelio se vio desencadenado por el pH, mientras que en los cultivos con glicerol el cambio se observó de manera más marcada indicando que el efecto del estrés causado por el cambio en la fuente de carbono, así como la acumulación de este en las células genero la presencia de levaduras conforme el pH cambiaba de ácido a básico (Zapata *et al.*, 2010).

6.5. Polioles aplicados al cultivo de hongos

Se investigó el efecto del eritritol en la seta *L. edodes*. El hongo se cultivó en un medio a base de aserrín a un fotoperiodo de 8-h luz /16 h oscuridad. Durante el período de luz, la temperatura se ajustó a 25 °C y durante el periodo de oscuridad, la temperatura se ajustó a 4 °C. Las diversas concentraciones de eritritol se suministran en primer lugar a la cama cultivo aserrín por remojo en agua que contiene eritritol, y el agua destilada se pulverizó

a continuación, una vez al día. El suministro de 0.5% (w/v) y 5% de eritritol marcadamente aceleró el crecimiento de los carpóforos. Los pesos y diámetros de los carpóforos del hongo crecido con la suplementación de eritritol fueron mucho mayores que las de la seta de control cultivada sin suplementación de eritritol. El suministro de 0.5 % de eritritol acorta el tiempo para el desarrollo de un cierto tamaño de los carpóforos de aproximadamente un 30% sin disminución en la densidad del tejido del carpóforos crecido con el suministro de eritritol (Kuroda & Hirakawa, 2008).

El xilitol y el sorbitol son utilizados como edulcorantes bajos en calorías utilizados en dulces sin azúcar, medicamentos y otros productos como la pasta dental, estos suelen ser afectados por hongos xerófilos y se evaluó el efecto del xilitol y el sorbitol. en la cinética de crecimiento de cuatro especies de hongos *Penicillium chrysogenum*, *Wallemia sebi*, *Eurotium chevalieri* y *Eurotium repens*. El experimento se realizó mediante la preparación de medio basal que contenía 2% de extracto de malta, 0.1 % de peptona, 2 % de glucosa y glicerol en las concentraciones necesarias para ajustar el agua disponible además de los diferentes polioles en concentración del 10% y lo que se observa es que estos solutos acortan los tiempos de germinación y el aumento de las tasas de crecimiento. (Patriarca *et al.*, 2011).

El hongo medicinal *Hydnum repandum* fue cultivado en 7 diferentes fuentes de carbono, así como la fuente de nitrógeno y el pH del medio de prueba las fuentes de carbono a utilizar fueron: glucosa, lactosa, maltosa, dextrosa, manitol, xilosa y sacarosa. Todas ellas fueron probadas en una concentración de 20 g/L, a 25° C en oscuridad con 9 repeticiones cada una donde los resultados indicaron que las fuentes de carbono idóneas para lograr el crecimiento del hongo fueron glucosa y manitol las cuales alcanzaron un crecimiento de 47.11 y 51.80 cm² respectivamente los cuales se midieron a partir de que al menos 1 de las placas del experimento alcanzará el 100% de colonización, esto sucedió a los 11 días de prueba (Peksen *et al.*, 2013).

El género fitopatógeno *Verticillium*, el cual es conocido por afectar cultivos como el algodón, tomate, patata, berenjena, pimiento, olivo, plantas ornamentales así como otras especies silvestres fue cultivado utilizando como fuente de carbono glucosa y permitió el desarrollo de las diferentes estructuras como los microsclerocios, tras análisis por

cromatografía se determinó que en el hongo estaban presentes múltiples, componentes como la trehalosa, el manitol, pentanol, tetritol, entre otros en menor concentración por lo que se buscó determinar si era posible el crecimiento del hongo en otras fuentes de carbono además de la glucosa, los resultados fueron que *Verticillium* spp. podía desarrollarse al mismo nivel en glicerol y trehalosa, tal y como se desarrollaba en glucosa, pero el nivel de crecimiento y la producción de microsclerocios se vio reducida cuando se cultivó en manitol, glucitol, eritritol y ribitol esto indicaba que estos eran metabolizados mediante rutas alternativas o secundarias por el hongo y solo suplían parcialmente los requerimientos energéticos del hongo (Vega & Tourneau., 1971).

El cultivo de líquenes presenta un gran interés ya que estos son una gran fuente de compuestos antimicrobianos, pigmentos, antioxidantes, compuestos capaces de absorber la luz UV además de metabolitos secundarios, los cuales pueden tener efectos contra el cáncer, Cultivos de líquenes crecieron más rápidamente en medio LB adicionado con 2% de un poliol de prueba. Se probaron los efectos de diferentes azúcares y polioles en el crecimiento de los líquenes de la familia *Usneaceae*: *U. rubescens* *U. longissima* *U. difracta* contra la glucosa: tales como la sacarosa, sorbitol, ribitol y manitol, en que el poliol que mostró el mejor efecto de crecimiento entre una concentración del 2% y el 4% fue el ribitol que generó los mejores resultados en comparación contra la glucosa que generó un aumento de 9 veces la biomasa en 12 semanas en comparación con el ribitol que la incrementó 13 veces en el mismo periodo de tiempo esto se explica porque la parte que es un alga del liquen genera polioles como el ribitol y el manitol los cuales son las fuentes preferentes de azúcares del hongo (Yamamoto *et al.*, 1987).

En un estudio se evaluó el efecto de polioles y las hormonas vegetales sobre el crecimiento de los hongos formadores de líquenes *Ramalina farinacea* y *Ramalina fastigiata*. en que la adición de ribitol al medio basal (extracto de malta-levadura) vio mejorada las tasas de crecimiento relativo de los tres hongos formadores de líquenes del estudio. *R. farinacea* var. (CH050010), *R. farinacea* var. (40403) y *R. fastigiata* var. (H06127) los cuales mostraron tasas de crecimiento un 35.3%, 29.0% y 29.3% más altas, respectivamente y cuando su efecto se combinó con el de la hormona IBA (ácido indol-3-butírico), muestran un aumento de las tasas de crecimiento *R. farinacea*

(CH050010), *R. farinacea* (40403) y *R. fastigiata* (H06127), un 79.4%, 40.3% y 72.8% respectivamente, esto se cree es causado por el efecto que tiene la parte “fotobionte/alga” del líquen la cual es vez absorbido por la parte “micobionte/hongo”, en la que carbohidrato es metabolizado en manitol través de la vía de las pentosas fosfato (Wang *et al.*, 2009).

Los hongos productores de líquenes son una fuente de compuestos de interés, pero debido a los tiempos de cultivo, así como las diferencias entre los metabolitos expresados *in vivo* son diferentes de *in vitro* son causa de muchos inconvenientes, en la naturaleza el fotobionte “el alga” asociado al hongo “micobionte” produce una serie de compuestos como fuentes de carbono pero no los produce en condiciones para determinar cuál es el compuesto principal que permite el desarrollo del hongo o la producción de los metabolitos secundarios. Una solución para elevar la producción de metabolitos secundarios fue mediante la prueba de las diferentes fuentes de carbono que las algas asociadas al hongo producen, se evaluó la glucosa, el sorbitol y el ribitol en concentraciones de 1%, 5%, y 10% y se midieron por PCR cuantitativa los valores de expresión de los genes CrPKS1, CrPKS16, CrPKS3 y CrPKS7 que son genes productores de policétidos son metabolitos secundarios del hongo formador de líquenes *Cladonia rangiferina*. Los resultados mostraron que el ribitol al 1% indujo una alta expresión génica esto se explica por qué el ribitol es la principal fuente de carbono generada por el alga *Asterochloris* la cuál es el alga que naturalmente se asocia con el hongo para la simbiosis del líquen lo que permite simular *in vitro* las condiciones naturales de crecimiento y producción de metabolitos secundarios. (Mostafa *et al.*, 2016).

En la micorriza arbuscular *Gigaspora margarita* se evaluó el efecto de los extractos del alga marrón *Laminaria japonica* los cuales junto con otras algas son utilizados como fertilizantes en el crecimiento de vegetales en lo que se ha observado una mayor actividad por parte de hongos micorrizales. Los extractos se analizaron por HPLC y se identificó que uno de los compuestos principales era el manitol el cual representa entre un 20 y un 30% del peso seco del alga por lo que este se probó en el crecimiento del hongo en concentraciones de 50 a 500 mg/ L, además de otros polioles o azúcares

alcoholes: xilitol, sorbitol y meso-eritritol, esto debido a que se sabe que estos son naturalmente exudados por las raíces de diferentes plantas como en el caso del xilitol de las raíces de *Picea abies* o el Sorbitol comúnmente en las raíces de las rosáceas.

En la primera fase experimental se adiciono el extracto del alga *Laminaria japonica* en concentraciones de 0.50, 100, 500 y 1,500 mg/L en el crecimiento de *Gigaspora margarita* en el cual el mejor desempeño se obtuvo a los 50 mg/L con un crecimiento de las hifas de 123.4 mm contra 25.5 mm del control, posteriormente se probaron los diferentes polioles de forma pura y estos generaron los mejores resultados en concentraciones de 100 mg/ L exceptuando al meso-eritritol el cual lo obtuvo a 300 mg/ L (Kuwada *et al.*, 2005).

Se realizó un estudio en el cultivo de la levadura *Rhodotorula glutinis* en que los objetivos de este trabajo fueron: 1, determinar el efecto del glicerol puro sobre el crecimiento de la levadura *R. glutinis*; 2, evaluar los efectos del glicerol puro sobre la acumulación de lípidos de la levadura y 3, determinar el efecto del glicerol puro como fuente de carbono única o secundaria en el contenido de ácidos grasos (FAME) para *R. glutinis* con intención de producir ácidos grasos para su uso en la producción de biodiesel. El medio de ensayo utilizado en los experimentos fue medio basal, pero se modificó cambiando las fuentes de carbono. Por 1 l de agua destilada: 0.4 g de KH₂PO₄, 0.3 g de extracto de levadura y 2.0 g de NH₄Cl y contenía las fuentes experimentales de carbono de modo que las relaciones molares C/N Fueron 10/1. Las fuentes de carbono fueron dextrosa, xilosa, glicerol, mezcla de dextrosa y xilosa, xilosa y glicerol además de glicerol y dextrosa. Se reportó que los mejores resultados se obtuvieron 24 % de incremento en el peso al utilizar dextrosa, 38% al usar dextrosa y glicerol, y 49% con una mezcla de dextrosa y xilosa contra solo un 18% del glicerol puro. Simultáneamente se evaluó la producción de ácidos grasos por cromatografía de gases donde se obtuvo que la mayor producción de ácidos grasos se consiguió con el uso del glicerol como fuente de carbono donde a las 48 horas de cultivo los ácidos grasos representan aproximadamente el 40% del peso seco de la levadura contra la combinación de glicerol y dextrosa la cual conseguía sólo 30% del peso seco (Easterling *et al.*, 2009).

6.6. Relación entre polioles, presión osmótica y estabilidad enzimática.

La relación entre polioles y presión osmótica se evaluó en la levadura *Moniliella megachiliensis* en este los cambios en la presión osmótica, así como el estrés oxidativo generaron como respuesta la producción de diferentes compuestos a manera de protección específicamente glicerol y eritritol. Se sabe que *M. megachiliensis* produce eritritol en medios con alta concentración de glucosa y poder sobrevivir en medios con hasta 60% de glucosa, en este se observó que cambios en la composición del medio generaban cambios en la producción de diferentes metabolitos, en que de manera natural sin un agente estresor se genera trehalosa a manera de fuente de carbono de reserva que se acumula de manera intracelular y que posteriormente se puede metabolizar para producir glucosa, por otra parte la producción de glicerol se da al tener un estrés osmótico elevado el cual puede producirse por causa de una elevada acumulación de glucosa y/o sales en el medio, y cuando se induce estrés osmótico mientras que en etapas tardías al medio este organismo reacciona produciendo eritritol para contrarrestar el daño a las células, a partir de las fuentes de reserva de la célula (Kobayashi *et al.*, 2015).

Existe una asociación entre la turgencia de un carpóforo que fue cosechado y factores de almacenamiento como la temperatura, humedad, pero adicionalmente se descubrió que conforme el carpóforo es cosechado, los niveles de ciertos polioles y azúcares tales como el manitol, arabitol, eritritol, glicerol, la glucosa y trehalosa, descienden en los carpóforos cosechados de *A. bisporus* particularmente manitol el cual desciende de manera casi uniforme en todos los tejidos de los carpóforos a lo largo de 5 días post cosecha, independientemente de las condiciones de temperatura siendo la humedad un factor más relevante en el crecimiento y maduración de carpóforos cosechados, ya que conforme los cuerpos se encuentran almacenados continúan con su desarrollo y se pierden los polioles de las hifas cuando estas dejan entrar agua ambiental, cuando estas se almacenan en condiciones de humedad superiores al 90%, esto en sí permite el crecimiento pero reduce la turgencia de las hifas lo que deriva en un ablandamiento del carpóforo en general (Beecher *et al.*, 2001).

A concentraciones altas, los polioles más grandes generan presiones osmóticas más altas que los más pequeños, esto se determinó experimentalmente por un osmómetro de

déficit de presión de vapor que es una técnica en que el instrumento no cambia el estado físico de la solución, pero determina la osmolaridad a partir de una medición de la temperatura del punto de rocío a la que el aire por encima de la muestra que está saturada con vapor de agua. Cuando se evaluaron combinaciones de los diferentes osmolitos no se vio un incremento significativo en la presión osmótica por encima de una concentración de 1M donde se alcanzan presiones osmóticas de entre 1.5 y 2 Mpa siendo que las presiones osmóticas naturales suelen rondar los 0.2 a 1 Mpa en hongos. De acuerdo con el reporte la resonancia magnética nuclear indicó una concentración máxima de glicerol de 0.4M en esporas de *Phycomyces blakesleeanus* mientras que los ensayos bioquímicos estándar informan 1.0 ± 1.5 M de glicerol en levaduras halotolerantes y 3.3 M en el apresorio del hongo del tizón del arroz *Magnaporthe grisea*. Esto indica que la acumulación de glicerol puede ser una estrategia de conservación de carbono ya que este es un poliol de 3 carbonos utilizado para aumentar la presión osmótica citoplasmática en especial la turgencia en las estructuras del hongo que puede ser producido de manera rápida y eliminado de la misma forma (Davis *et al.*, 2000).

6.7.Efecto de los polioles en la actividad enzimática

El efecto de los polioles sobre la capacidad de metabolizar otros compuestos como herbicidas por medio del hongo halotolerante *Dacryopinax elegans*, se evaluó para la capacidad de degradar el herbicida Diuron. Para la degradación del herbicida se evaluó la actividad de 3 enzimas: una lacasa, una peroxidasa de lignina y una peroxidasa dependiente de manganeso en condiciones de salinidad adicionado NaCl en concentración de 0.5 mol/L, así como la adición de manitol o glicerol a 0.5 M. En la primera prueba se evaluó el aumento de biomasa del hongo *D. elegans* en presencia y ausencia de Diuron en 4 condiciones: un control sin aditivos, uno en que se adiciono NaCl al 0.5M, otro al que se adiciono manitol al 0.5M y uno de 0.5M de glicerol. En el control no se observaron cambios en relación con la ausencia o presencia del Diurón en una concentración de 10 mg/L; en presencia de NaCl hubo una reducción de la biomasa, en manitol uno un incremento de biomasa de 6.4g/L a 7.2g/L y finalmente en presencia de glicerol una reducción de 6.2 g/L a 4.2g/L. cuando se evaluó la degradación de Diuron. Los resultados indicaron que en un medio con una concentración de glicerol de

0.5 M y una de glucosa de 0.03 M se veía un incremento en el tiempo necesario para el consumo de la glucosa de 96 h (control sin glicerol) a 192 h, en estas condiciones la eliminación de Diuron se alcanzó alrededor de las 240 h. Cuando la glucosa se adiciona en una concentración de 0.5 M y glicerol en concentración de 0.5 M la degradación del Diuron alcanzaba su máximo desempeño a las 96 h, se observó que el glicerol primero iniciaba una reducción en el medio para posteriormente incrementarse además de que en presencia de este el consumo de glucosa no sólo se redujo, sino que se detuvo manteniéndose en el medio en un 40% hasta las 480 h del experimento. Con respecto a la actividad de las enzimas responsables de la degradación del Diuron los resultados muestra que no había diferencias apreciables entre la adición de glicerol y manitol en la actividad de las enzimas lacasa y peroxidasa de lignina pero indican que el glicerol tenía efecto sobre la peroxidasa dependiente de manganeso donde se incrementó la actividad de la misma (Arakaki *et al.*, 2013).

Se evaluó el efecto de una serie de polioles sobre la termotolerancia de la enzima xilanasas del hongo *Aspergillus niger*. La hemicelulosa es una de las mayores fuentes de biomasa por lo que es una fuente de carbono de interés para la producción de diversos elementos como biocombustibles, en esta el segundo componente más abundante después de la celulosa es el xilano, el cual es de difícil degradación por lo que el uso de enzimas que puedan soportar las condiciones de degradación necesarias para su uso industrial es un blanco de interés, la enzima xilanasas tiene un rango de temperatura de trabajo de 45° C con una vida media de 460 min, sobre esta se probaron una serie de polioles todos los cuales mostraron una mejora en la termo estabilidad a una concentración 1 M a costa de reducir la actividad enzimática exceptuando al sorbitol el cual mejoraba la resistencia a la temperatura sin comprometer la actividad enzimática, esto se vio reflejado al incrementar la vida media de la enzima de 460 min a 1,380 min a 45° C, y en condiciones más extremas de 60 °C (temperatura de trabajo) mantuvo la actividad durante 385 min contra 144 del control (Pal & Khanum, 2011).

En la naturaleza la lignina es degradada principalmente por parte de los basidiomicetos en particular hongos de pudrición blanca. El hongo *Fomes sclerodermeus* genera una serie de enzimas en particular lacasas las cuales son estudiadas por su capacidad de

degradar lignina sin embargo estas enzimas en condiciones industriales tienden a perder su actividad enzimática por lo que buscar una manera de estabilizarlas a condiciones de pH, y temperatura es un campo de interés. Se probó el efecto de diversos aditivos (alcohol veratrílico, glicerol, trehalosa, 1-HBT, CuSO₄, manitol y glutaraldehido) en condiciones de pH 4.5 a 40° C durante 24 h, en la que el control sin aditivos mostró que en estas condiciones sólo se mantenía un nivel de actividad del 57%, en estos se vio que los mejores resultados se obtuvieron con CuSO₄ al 0.5 mM y 1.25 mM y manitol al 1%, los cuales mantuvieron la actividad enzimática en un 73%, 81% y 78% respectivamente. Con respecto a la vida media de la lacasa se probaron combinaciones de CuSO₄ y glicerol que dieron los mejores resultados en relación con la preservación de la actividad enzimática en relación con el tiempo donde el control en ausencia de CuSO₄ y glicerol tuvo una vida media de 40 h a 40° C y 9.81 h a 51° C en contra de 114 h a 40° C y 14.51 h a 50° C en la prueba con 1.25mM de CuSO₄ adicionado con 0.2% de glicerol (Papinutti *et al.*, 2008).

Se evaluó el efecto de una serie de polioles sobre la termoestabilidad de la lipasa de *Candida cylindracea* a 50° C, así como el efecto de la temperatura sobre la afinidad, la velocidad de reacción y la especificidad de la reacción enzimática en presencia de etilenglicol, glicerol, eritritol, xilitol y sorbitol. La adición de los polioles mostraron que a una mayor concentración de cualquier poliol el tiempo desde que la enzima se encuentra en su estado nativo hasta que solo tiene la mitad de su viabilidad se vio reducido lo que indicaba que la presencia de polioles reducía la velocidad de degradación de la lipasa en el medio, la afinidad enzimática no se vio alterada, salvo cuando se incorporo etilenglicol a una concentración de 8 M/dm³ efecto que no se observó en ninguna de las concentraciones de los diferentes polioles, lo que indica que los polioles no afectaron el sitio activo de la enzima finalmente se midió el efecto sobre la vida media de la enzima en la que el sorbitol y el xilitol mostraron que al adicionarse en una concentración de 1 M/dm³ incrementaron la vida útil de la enzima en la que el sorbitol mejoró la vida útil de la enzima hasta en 2,000 veces (Matsumoto *et al.*, 1997).

El efecto de los polioles sobre la estabilidad enzimática de la lisozima de *Micrococcus luteus* se evaluó por tres diferentes mecanismos de inactivación, el primero la agregación

o precipitación por sales, donde una vez determinada la concentración de sal que causaba el mayor nivel de agregación o desnaturalización se procedió a realizar un experimento en el que se adiciono a la enzima la misma concentración de sal adicionada con un aditivo poliol/azúcar a un volumen del 10% en relación peso volumen con manitol, sacarosa, lactosa, glicerol y polietilenglicol. La adición del manitol generó una recuperación de la actividad del $36.0 \pm 0.8 \text{ EU/mg} \times 10^3$ en comparación del control. El segundo punto fue la temperatura. Cuando se adicionaron los polioles todos generaron una respuesta positiva al aumentar la temperatura media de desnaturalización cuando estos se adicionaron especialmente la sacarosa que elevó la temperatura media a 75.4°C y el nivel de actividad enzimática a $42.0 \pm 1.4 \text{ EU/mg} \times 10^3$. Y finalmente el pH, cuando el experimento se repitió en pH ácido buscando desnaturalizar la lisozima, el control mostró una temperatura media de 66°C y un nivel de actividad enzimático de $23.0 \pm 1.0 \text{ EU/mg} \times 10^3$, todos los polioles generaron una mejora en la temperatura media y la actividad enzimática en particular la sacarosa que mejoró la temperatura media hasta alcanzar un valor de 73.4°C y un nivel de actividad enzimático de $42.0 \pm 1.7 \text{ EU/mg} \times 10^3$, esto indicaba que los polioles preservaron e incrementaron la temperatura que la lisozima puede soportar y la estabilidad a un pH ácido. Finalmente se evaluó el efecto de la oxidación sobre la lisozima al exponerla al peróxido de hidrógeno en presencia de los diferentes aditivos dando como resultado que en la lactosa se generó el mayor incremento en la estabilidad enzimática protegiendo a la lisozima de la presencia de peróxido de hidrógeno (Singh & Singh, 2003).

7. JUSTIFICACIÓN

Los polioles cumplen múltiples funciones en los hongos, así como en otros organismos al regular la presión osmótica, ayudar en el crecimiento y funcionar como fuentes de carbono secundarias y/o de reserva, actuar como reguladores de la actividad enzimática además de mediar respuesta al estrés oxidativo, por lo que la teoría que estos generan diversos efectos al ser adicionados al medio está sustentada.

El criterio para la selección del eritritol como aditivo en el crecimiento de *P. ostreatus* fue buscar un aditivo el cual no incrementa significativamente el costo de producción y que no fuera metabolizado por el hongo debido a que se busca optimizar el consumo de la materia vegetal más no reemplazarlo por una fuente de carbono adicional en el medio, esto descarta azúcares como la glucosa, la dextrosa, la maltosa y el almidón los cuales se sabe que pueden ser metabolizados por el hongo *P. ostreatus* como fuente de carbono. De acuerdo con (Kuroda & Hirakawa, 2008) el eritritol mostró un incremento en la productividad del hongo *Lentinula edodes* por lo que este, así como otros polioles como el glicerol y el manitol fueron considerados, pero finalmente por motivos de costos, así como la capacidad del hongo *P. ostreatus* de metabolizarlos al menos parcialmente como fuente de carbono (Sengupta *et al.*, 2004.) estos fueron descartados para finalmente reducir el marco de investigación únicamente al eritritol. El uso de eritritol promete ser un buen aditivo para mejorar el desempeño de la producción de hongos para consumo humano ya que el eritritol, así como otros polioles se han utilizado para mejorar la capacidad de crecimiento de diversos organismos tales como *Lentinula edodes*, *Raphanus sativus*, *Allium sativum*, *Arabidopsis thaliana* (Kuroda & Hirakawa, 2008).

8. HIPÓTESIS

La aplicación de una concentración controlada de eritritol en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* generará un cambio apreciable en los valores de crecimiento y/o volumen de producción de carpóforos, así como posiblemente cambios en las características del micelio.

9. OBJETIVOS DEL TRABAJO

9.1. Objetivo General

Evaluar diferentes concentraciones de eritritol para determinar la concentración ideal de este la cual produzca cambios positivos en el crecimiento del micelio y fructificación del mismo

9.2. Objetivos Particulares

- 1) Evaluar la capacidad de influir del eritritol en el crecimiento de *P. ostreatus*
- 2) Determinar si existen cambios morfológicos en el micelio los cuales puedan indicar cambios en el mismo causados por el eritritol
- 3) Evaluar si hay cambios en las propiedades de los carpóforos en comparación con los que fueron cultivados en condiciones de control.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Cepa de *Pleurotus ostreatus*

La cepa de trabajo fue obtenida de la empresa Fungi Perfecti, dirigida por el reconocido micólogo Paul Stamets.

10.2. Sustratos

Para el crecimiento de *P. ostreatus* en función de su velocidad y el costo del sustrato, se utilizó el grano de sorgo, el cual es de fácil adquisición, bajo costo, y en pruebas anteriores demostró ser un sustrato adecuado para el crecimiento de *P. ostreatus*. Las pruebas se realizaron inoculando el sustrato previamente esterilizado, con inóculo de *P. ostreatus*, en las respectivas condiciones de cultivo del experimento.

10.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- PDA de la marca comercial Difco, que fue preparado de acuerdo con lo establecido por la marca productora de 39 g/L, este será esterilizado en una autoclave a 121 °C durante 15 min a 15 lb de presión.
- Medio Czapek, de la marca comercial Bioxon el cual fue preparado a una concentración de 50g por litro de agua destilada y esterilizado en una autoclave a 121°C durante 15min a 15lb de presión.
- El caldo de cultivo extracto de papa al 2% y dextrosa al 1% en agua destilada y esterilizado en una autoclave a 121°C durante 15min a 15lb de presión.
- El medio mínimo mineral se preparó basado en el medio de cultivo por (Falony *et al.*, 2006), el cual contiene Fosfato de sodio monobásico, fosfato de potasio monobásico, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de calcio, sulfato de amonio y una fuente de carbono al 2%.

10.4. Efecto del eritritol como única fuente de carbono

Se empleó la marca comercial de eritritol conocida como Truvia la cual contiene el eritritol el cual es un poliol de 4 carbonos en una concentración del 97%,

Se realizó la prueba de crecimiento con eritritol como única fuente de carbono; la literatura consultada no indica que *P. ostreatus* tenga la capacidad de metabolizar el eritritol por lo que se realizó una prueba comparativa en medio mínimo mineral en dos condiciones una en que la fuente de carbono sea dextrosa al 2% a modo de control, y otra con eritritol al 2% a modo de prueba basado en el medio mínimo mineral de (Falony *et al.*, 2006), este experimento busco descartar que el efecto del eritritol sobre el micelio esté actuando como fuente de carbono secundaria en el medio.

10.5. Efecto en el crecimiento y observación de cambios microscópicos.

Cada placa fue inoculada con un cuadro de un 1 cm² de micelio del hongo crecido en medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa), las placas inoculadas fueron colocadas en una incubadora a 30° C donde se determinó el tiempo mínimo que requiere el micelio en las diferentes concentraciones de eritritol para colonizar la placa de Petri al 100%. Se adiciono el eritritol en placas de medio PDA en concentraciones de 0, 0.05, 0.5 y 5%, por triplicado para determinar concentración ideal del compuesto y también para poder realizar pruebas al micelio que indiquen si hay modificaciones estructurales o morfológicas que pudiesen estar afectado o mejorando la captación de nutrientes o el desarrollo del micelio mediante microscopía.

Posteriormente se repitió el experimento con el fin obtener mejores observaciones microscópicas en medio de cultivo Agar czapek y en concentraciones de 0, 0.05, 0.5 y 5%, por triplicado con el fin de observar si hay modificaciones estructurales o morfológicas que pudiesen estar afectado o mejorando la captación de nutrientes en el desarrollo del micelio esto mediante observación microscópica y que no pudiesen ser observados directamente en el medio PDA.

10.6. Efecto del eritritol sobre la producción de biomasa

Se evaluó el efecto del eritritol en la ganancia de peso cultivando en medio de cultivo caldo extracto de papa y dextrosa al cual le fue adicionado eritritol en concentraciones de prueba 0, 0.05, 0.5 y 5%. Una vez que el primer tratamiento colonizara el 100% del diámetro del matraz, se obtuvieron las colonias y se sometieron a secado durante 24h para posteriormente determinar su peso.

10.7. Efecto del eritritol sobre la producción de carpóforos

La fase de fructificación se realizó en frascos de vidrio estériles con una cantidad de 70 g de sustrato previamente hidratado en solución de eritritol a concentraciones de 0, 0.05, 0.5 y 5%, a modo de prueba.

Los frascos de sorgo una vez inoculados con *P. ostreatus* se colocaron en la incubadora durante 35 días a 28°C hasta que alcanzaron una colonización del 100%, (Figura 3). Tras terminar el proceso de colonización del micelio estos se traspasaron a la cámara de fructificación, la cual mantuvo condiciones de humedad y temperatura de 75% y 20° C respectivamente.

Una vez en la cámara de fructificación en condiciones de humedad del 75% y una temperatura de 20° C con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, se mantuvieron los micelios de prueba hasta que comenzó la fructificación de acuerdo con lo reportado (Bellettini *et al.*, 2016; Arjona *et al.*, 2009).

La cosecha de los carpóforos se realizó de manera manual en base a lo reportado (López *et al.*, 2008), teniendo cuidado de no dañar o contaminar el micelio utilizando una cuchilla estéril, los carpóforos se pesaron y midieron de manera individual, y de manera global por experimento para poder medir si existía un efecto sobre la masa, cantidad y tiempo de fructificación, a 10 repeticiones en cada una de las concentraciones de prueba.



Figura 3. Frascos de cultivo en la incubadora que se mantuvieron por 35 días.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba de ANOVA simple para comprobar el efecto de diferentes concentraciones de eritritol sobre el desarrollo de *P. ostreatus* y con esto se evaluó si existe un efecto de este sobre el crecimiento y el tiempo de fructificación todos los análisis realizados se ajustaron a un valor de significancia de 0.05.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

Los valores a evaluar en relación con la concentración de eritritol fueron:

1. Tiempo de crecimiento en placa
2. Densidad del Micelio
3. Biomasa en medio Líquido
4. Número de Carpóforos
5. Peso de Carpóforos
6. Cambios morfológicos en los Carpóforos
7. Tiempo de Maduración

12. RESULTADOS

12.1. Capacidad de metabolizar fuentes de carbono

Se buscó comprobar que la cepa de *P. ostreatus* con la que se estaba trabajando no podía metabolizar directamente el eritritol como una fuente de carbono por lo que el efecto observado sería solo osmótico o enzimático y no por el uso del eritritol como una fuente de carbono secundaria la cual estuviese siendo metabolizada una vez que las fuentes de carbono iniciales o primarias comenzarán a agotarse.

Los resultados indican que *P. ostreatus* carece de los mecanismos necesarios para metabolizar el eritritol como una fuente de carbono. Al confirmar que el hongo no era capaz de metabolizar el eritritol se aseguraba que el efecto observado en el micelio se diera por cambios en la actividad del micelio y no por un exceso de la fuente de carbono

Esto se logró al preparar medio mínimo mineral al cual se le colocó como fuente de carbono única el eritritol a modo de prueba y dextrosa en calidad de control, durante 14 días a 30° C (Figura 4).

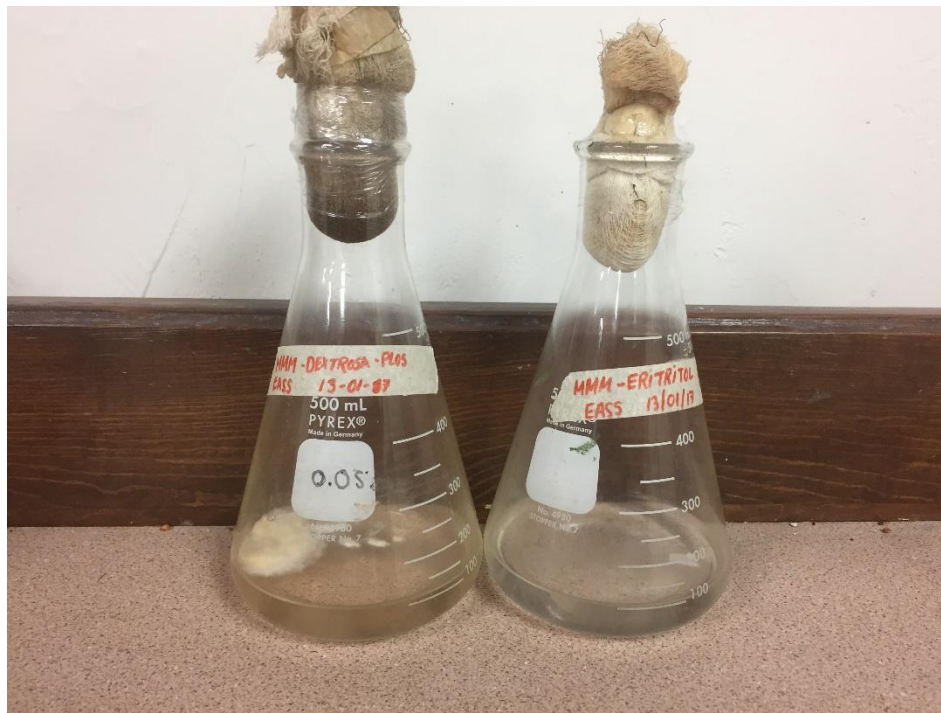


Figura 4. Prueba de metabolismo.

12.2.Crecimiento radial

En la segunda fase experimental se cultivó el micelio de *P. ostreatus* en placas de PDA a 10 repeticiones utilizando un inóculo de 1 cm² sobre placas a las cuales se adiciona el eritritol en las diferentes concentraciones de prueba respectivamente (Figura 5), en estas se observó tras 10 días de crecimiento que no había una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento en las concentraciones 0, 0.05 y 0.5%, ya que cuando se comparó el efecto del eritritol sobre el crecimiento radial de *P. ostreatus* tras 10 días de ser inoculado los resultados mostraron que en concentraciones de 0.05% y 0.5% no se presenta una diferencia significativa en el crecimiento del micelio en relación con el control sin eritritol, de acuerdo a un análisis anova al 0.05 de significancia donde la concentración control tubo un promedio de 76.4% de colonización de las placas, la concentración de 0.05% tubo un 77.6% de colonización, la concentración 0.5% obtuvo 78.5% y 5% obtuvo 50.5%, donde presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento (Figura 6).

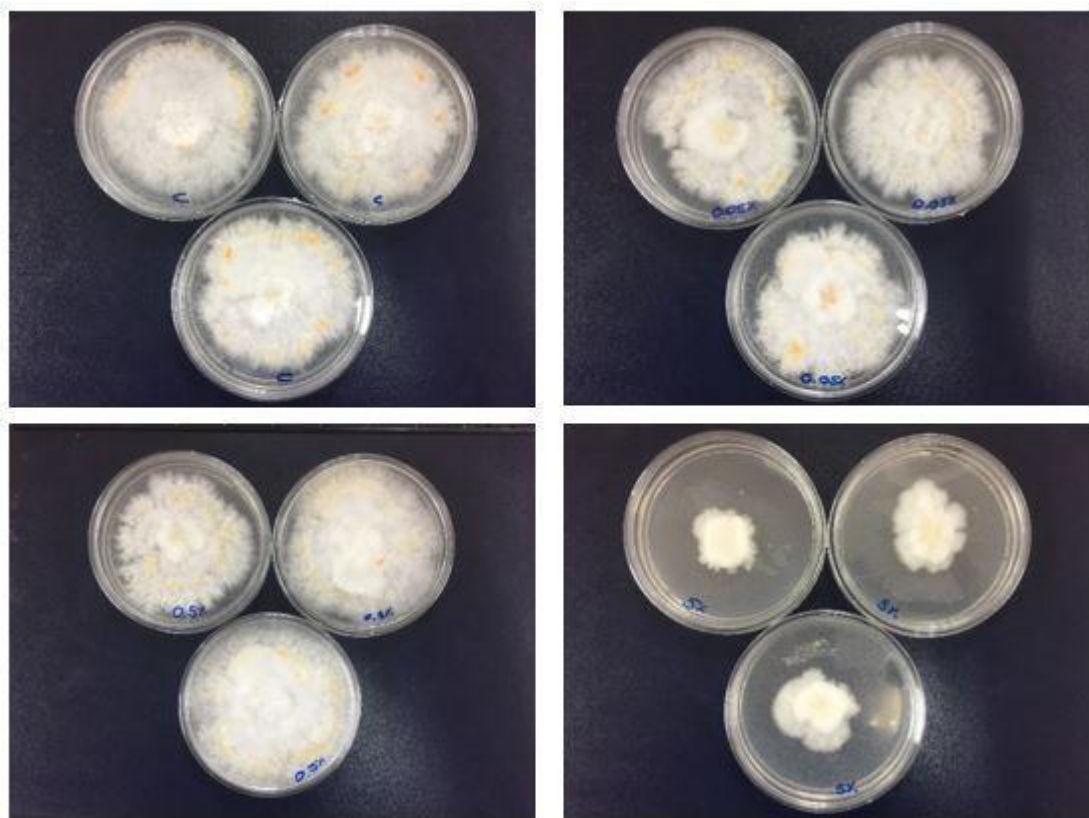


Figura 5. Crecimiento radial.

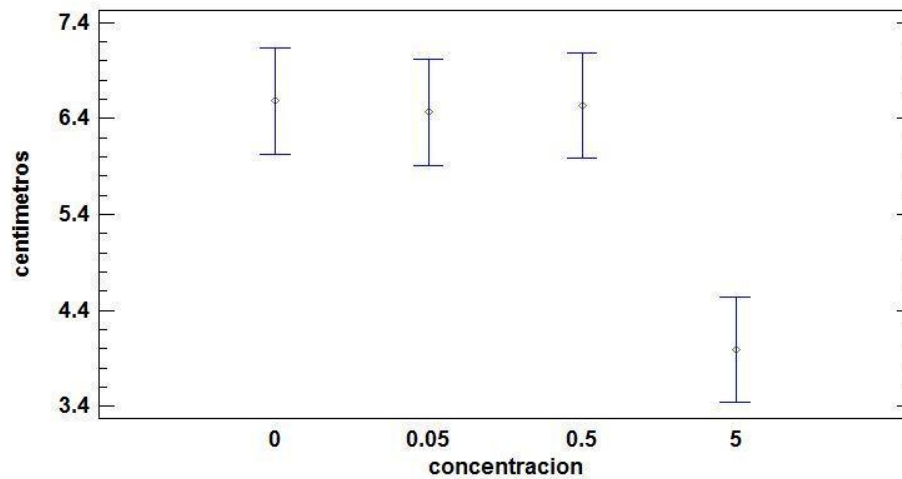


Figura 6. Crecimiento radial. La velocidad de crecimiento no se ve afectada a nivel de cultivo en placa en concentraciones de control, 0.05 y al 0.5% al no haber variación en el nivel de desarrollo alcanzado tras 10 días de cultivo, aunque en una concentración de 5% se presentó un efecto inhibitorio en el desarrollo.

12.3.Observaciones y cambios morfológicos en el micelio de *P. ostreatus*.

Las observaciones microscópicas en el micelio de *P. ostreatus* en medio PDA mostraron cambios menores con respecto a la conformación del micelio, en relación con la concentración de eritritol, aunque mostraron que conforme hay una mayor concentración de eritritol en el sustrato el micelio tiende a presentar un engrosamiento, así como también presentar una mayor afinidad por el colorante para la visualización (Figura 7). Los cambios observados en medio PDA indican que el eritritol tiene efectos en la morfología del micelio, no solo a nivel microscópico sino a nivel macroscópico como una mayor fragilidad cuando este se encuentra en elevadas concentraciones algo observado durante la manipulación de los micelios en las pruebas de crecimiento en medio líquido, creemos que esto podría indicar que el micelio ha cambiado la morfología de las hifas permitiendo que el colorante pueda penetrar con una mayor afinidad lo que indicaría que la pared celular está sufriendo un cambios.

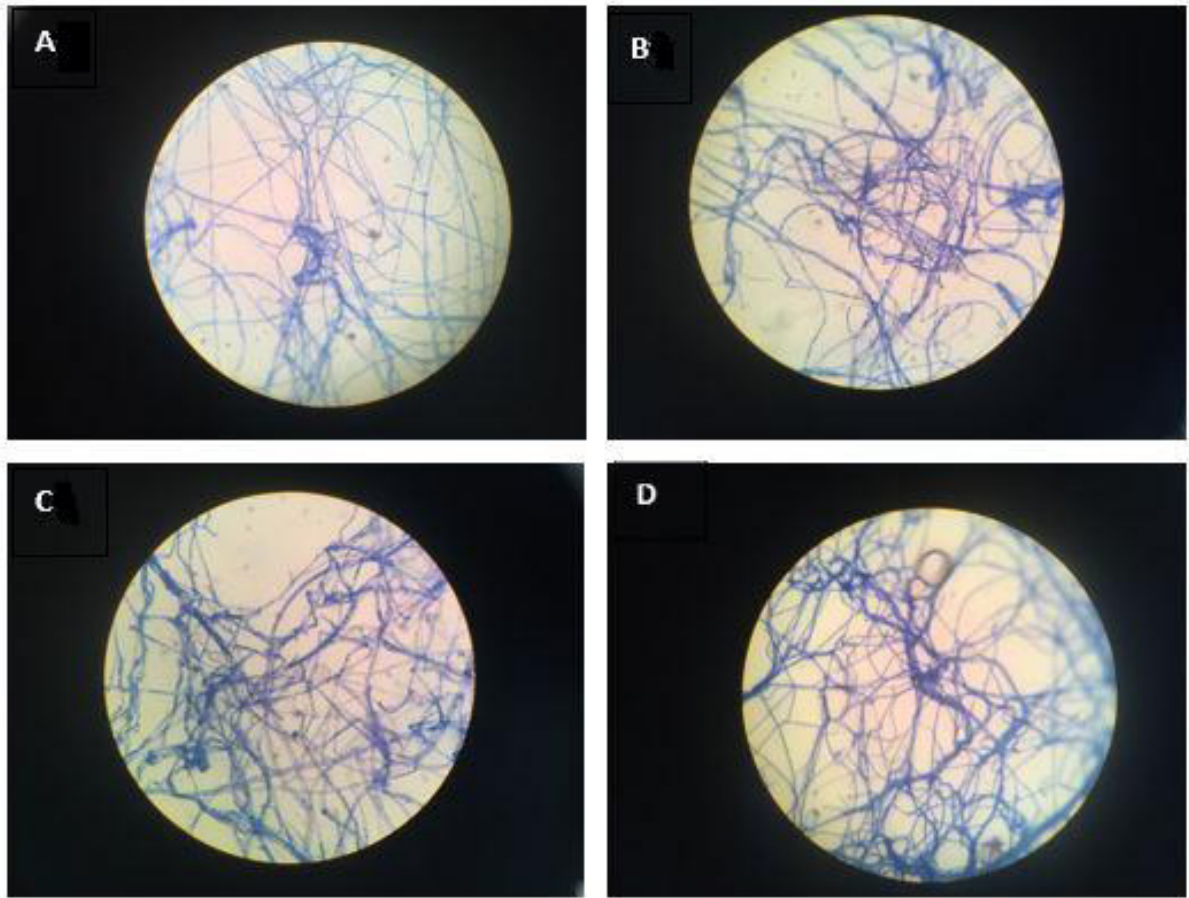


Figura 7. Microscopia en PDA. Las observaciones iniciales en medio PDA, indican que existe una relación entre la concentración de eritritol y el grosor del micelio de *P. ostreatus* Fig.: A & D una comparación entre la concentración de control contra la concentración al 5% de eritritol muestra diferencias entre el grosor y la captación del colorante.

Posteriormente las fotografías de las observaciones al microscopio del micelio en medio PDA fueron convertidas a imágenes 8 bits de 256 colores utilizando el programa Adobe Photoshop; posteriormente fueron analizadas con el programa de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health., 2016), (Figura 8) para obtener una medición numérica correspondiente al micelio y así poder comparar objetivamente la abundancia y ramificación del mismo a diferentes concentraciones de eritritol.

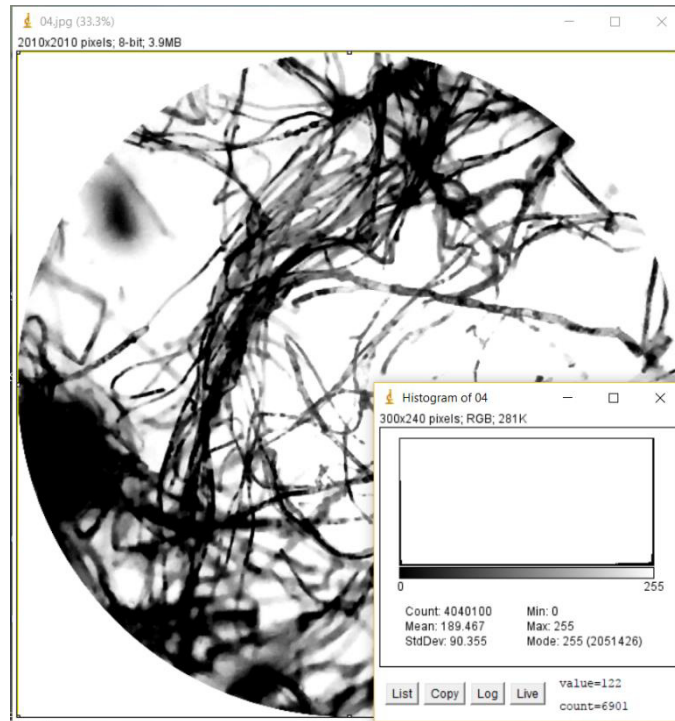


Figura 8. Programa de análisis de imágenes ImageJ.

Los resultados obtenidos por medio del programa ImageJ fueron compilados y analizados por parte de un análisis de ANOVA simple que indicaba que a la mayor concentración de eritritol de 5% el micelio alcanza una alta densidad, pero no mostraba cambios significativos en las concentraciones de 0, 0.05 y 0.5% aunque sí con respecto a la concentración de 5%, donde se aumentó la densidad micelial (Figura 9).

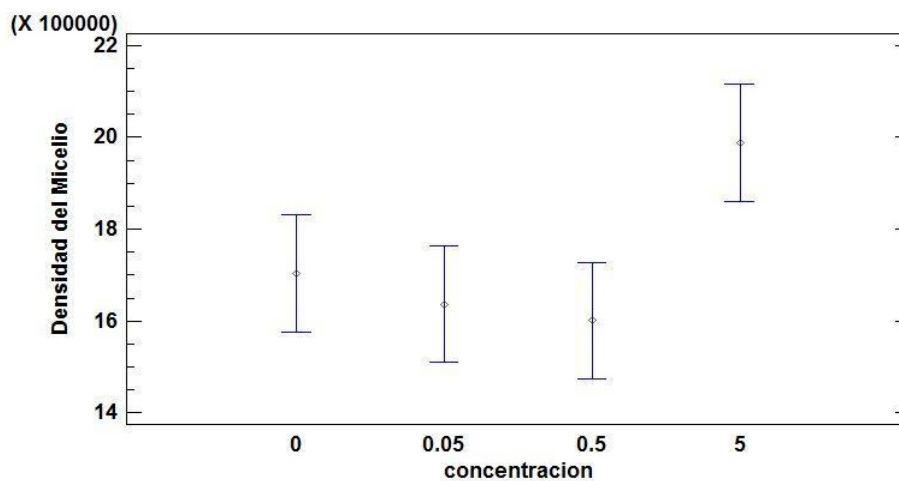


Figura 9. Análisis de los resultados realizados por el programa ImageJ indicaron que a una concentración de 5% el micelio se comporta de manera diferentes incrementando notoriamente su densidad.

En placas de agar Czapek el efecto del eritritol fue más aparente que en medio PDA esto debido a que el medio Czapek es un medio pobre en comparación con el medio PDA (Lewinsohn et al., 2000). y en este el micelio presentará de manera natural un crecimiento pobre por lo que el efecto de cualquier aditivo tenderá a ser más significativo. Esta prueba mostró un incremento en la disposición del micelio en relación con el incremento en la concentración de eritritol el cual era observable a simple vista además de un incremento del grosor de las hifas observadas al microscopio (Figura 10).

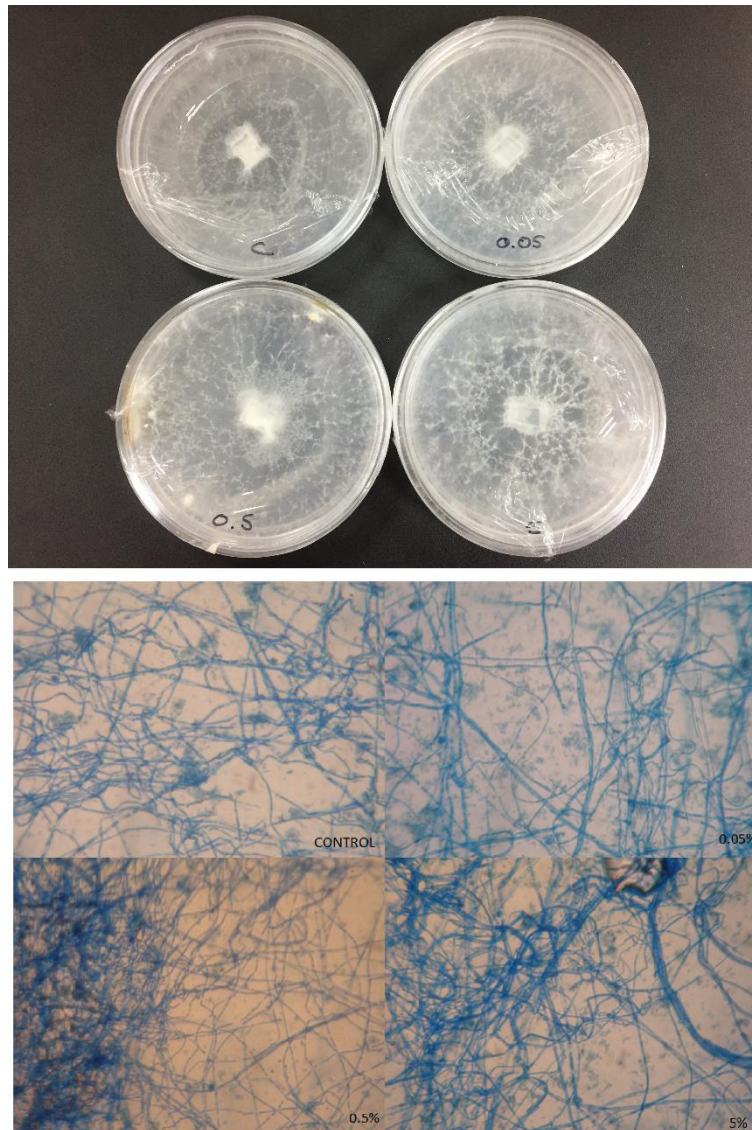


Figura 10. Microscopia en Agar Czapek. Efecto del eritritol en agar czapek a una mayor concentración de eritritol el micelio de la placa 5% presenta un micelio de mayor grosor a simple vista.

12.4. Peso seco

En la segunda etapa experimental se evaluó si existía una ganancia de peso entre diferentes concentraciones de eritritol adicionadas al medio de cultivo, esto se logró al preparar medio papa dextrosa al cual se adicionaron las concentraciones de prueba de eritritol al 0%, 0.05%, 0.5% y 5%, en matraces de 250 ml cada uno con 50 ml de medio papa dextrosa, inoculados con un cuadro de 1cm² de PDA con micelio activo de *P. ostreatus* activo, para colocarlos en la incubadora por 14 días a 30° C en condiciones de oscuridad (Figura 11). Para determinar el peso del micelio seco la biomasa se decantó y se colocó en secado durante 24 horas a 30° C se le retiró el exceso de agua por filtración con papel filtro de poro amplio para posteriormente colocarlo sobre papel encerado para evitar dañar el micelio durante el secado además de ayudar a remover el exceso de agua residual para su posterior pesado y registrado. Durante la manipulación de los micelios cultivados en medio líquido se pudo apreciar una mayor fragilidad en el micelio en las concentraciones de 0.5 y 5% de eritritol por lo que se tuvo que proceder con extrema precaución para no desgarrar la biomasa. (Figura 12).



Figura 11 Cultivo en medio líquido.



Figura 12. Peso seco. El micelio fue extraído de los matraces

Se comparó el efecto de la ganancia de peso en *P. ostreatus* en medio líquido (Figura 13). En esta se observa que no hay una diferencia significativa en la ganancia de peso tras 14 días de cultivo. Al comparar los resultados se puede observar una pequeña ganancia de peso en comparación de los controles, pero sin significancia estadística, sugiriendo un efecto neto positivo sobre la generación de micelio.

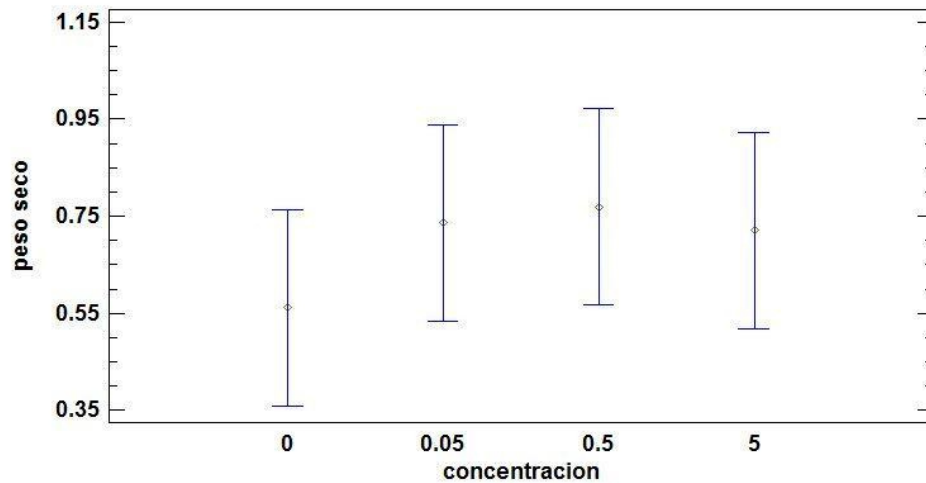


Figura 13. Análisis de peso seco del micelio. Después de su crecimiento en medio líquido con diferentes concentraciones de eritritol se aprecia un ligero incremento en comparación con el control.

En relación con los cambios en el micelio se observó que la biomasa cultivada en la concentración de eritritol al 5% se mostraba más frágil que en los otros tratamientos por lo que este era más propenso a fracturarse, lo que concuerda con los datos obtenidos en la fase de crecimiento en placa donde el eritritol en una concentración de 5% mostró una inhibición del crecimiento. Dado que a simple vista y en términos de masa no se observa diferencia, la fragilidad encontrada podría deberse a un crecimiento de hifas más cortas, generando una matriz de fibras abundante, pero con poco soporte.

12.5. Evaluación de carpóforos.

Los frascos de sorgo una vez colonizados con *P. ostreatus* se colocaron en la cámara fructificación. (Figura 14).



Figura 14 Condiciones experimentales de producción de carpóforos los frascos del experimento en la incubadora se mantuvieron por 50 días con un fotoperiodo 12 horas luz/oscuridad a 20 grados con una humedad del 75%

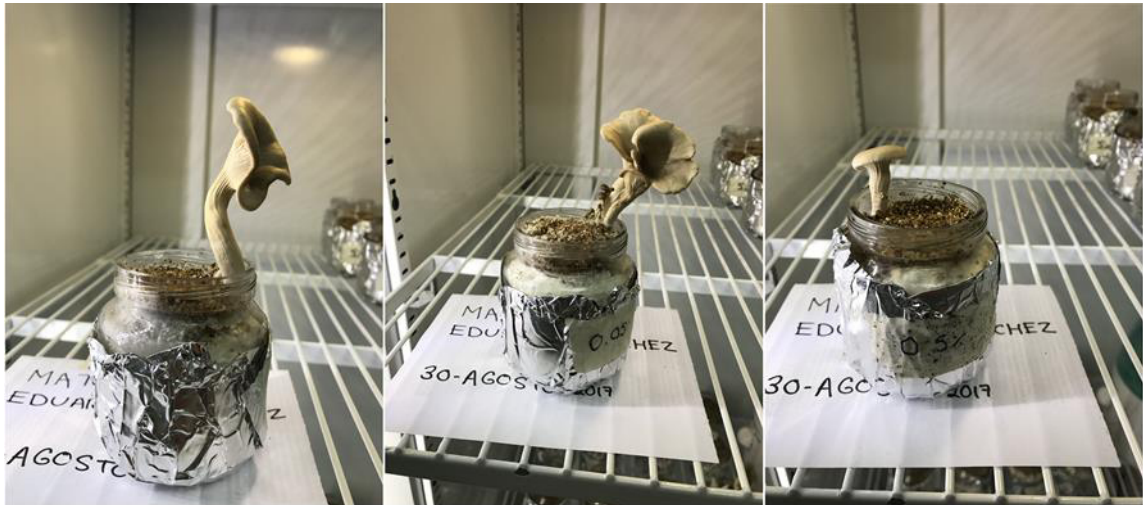


Figura 15 carpóforos en plena fructificación de las concentraciones control, 0.05 y 0.5% se excluye la concentración 5% por ausencia de resultados.

Los resultados arrojados por el experimento en etapas iniciales indicaron que el eritritol, no era metabolizado por el micelio, pero este influye aumentando la eficiencia de captar o extraer los nutrientes del sustrato al incrementar la velocidad de crecimiento en placa. Posteriormente en el experimento de fructificación no indicaron a lo largo de las mediciones un deterioro en los valores de peso. (figura 16) lo que mostraba que no se estaban generando fructíferos de menor calidad lo mismo para el tamaño promedio de los carpóforos (Figuras 17 & 18).

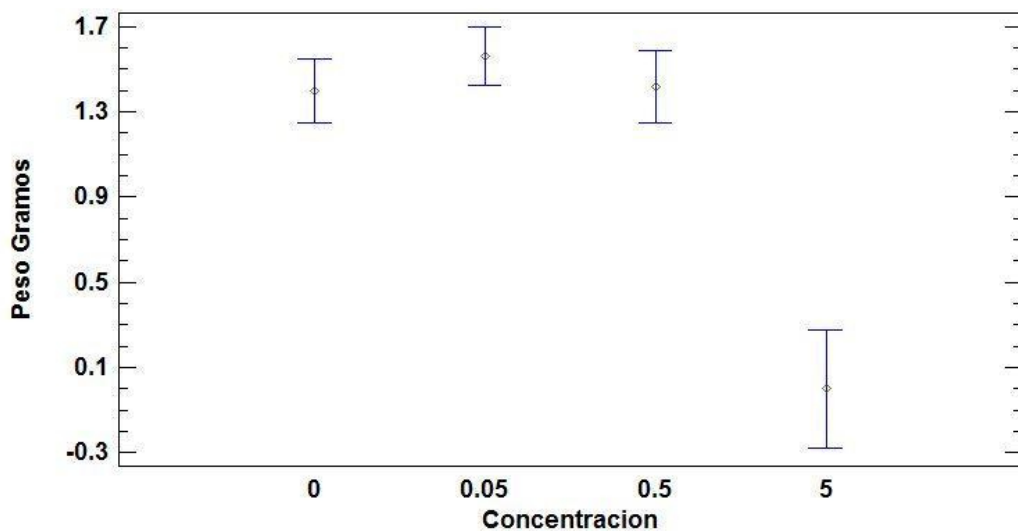


Figura 16 Análisis del peso de los carpóforos.

Con respecto a los valores de tiempo de maduración en promedio no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de prueba al momento de medir el tiempo que tomaba a los primordios desarrollarse por completo. (Figura 19) si bien este valor puede ser subjetivo ya que la medición se realizó en función de días por lo que el programa de análisis de datos podría no tomar como significativos los resultados.

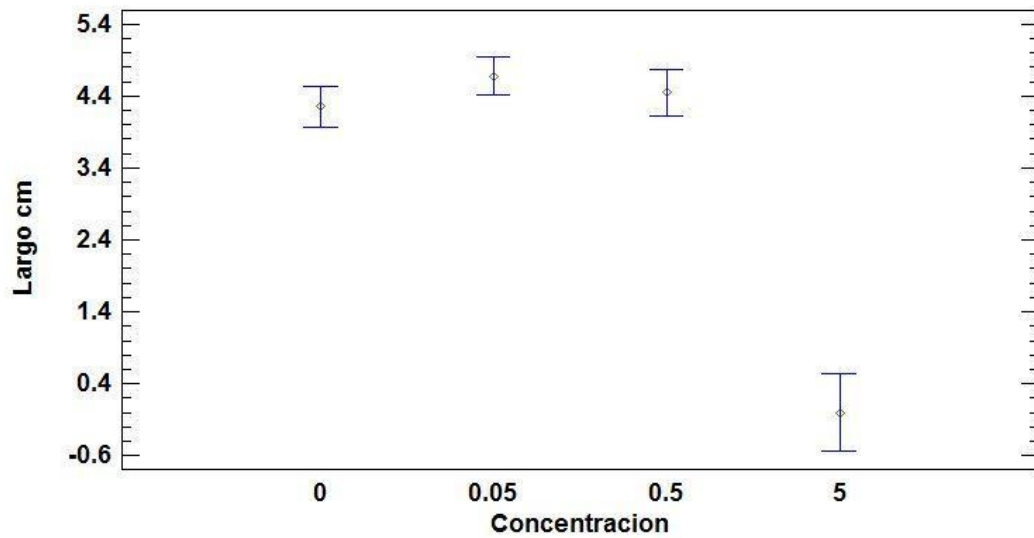


Figura 17 Análisis de longitud.

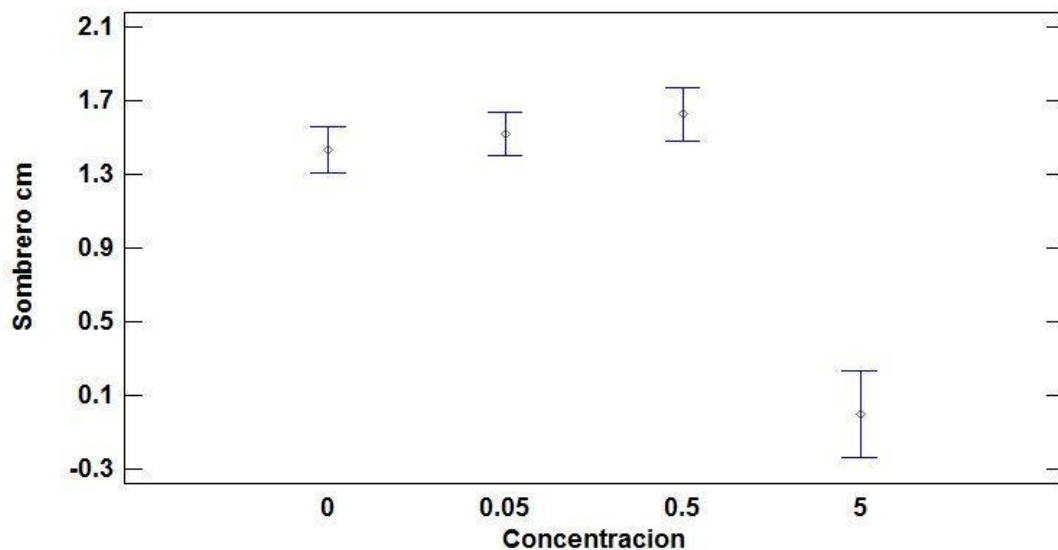


Figura 18 Análisis del diámetro del sombrero los carpóforos.

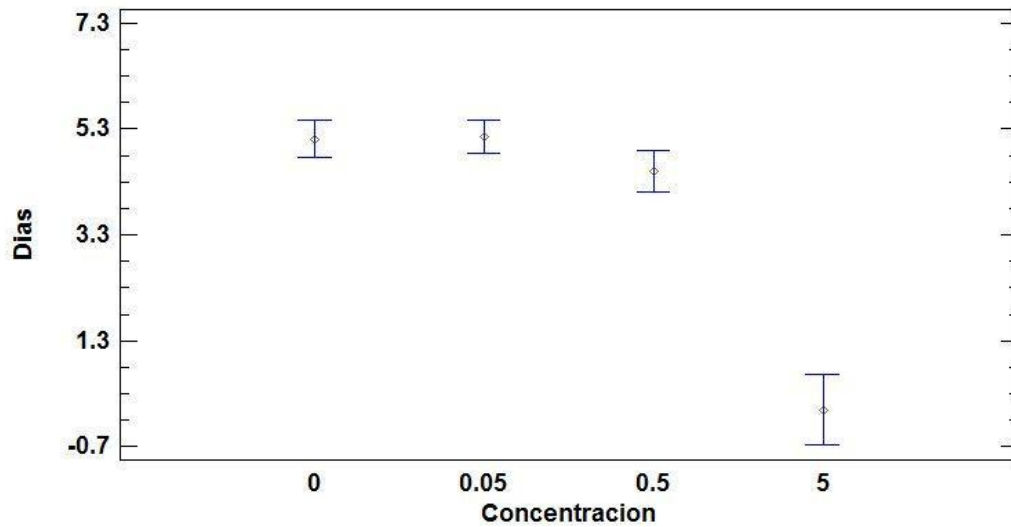


Figura 19 Tiempo de desarrollo.

Simultáneamente a la evaluación de los valores de tiempo, peso y tamaño se evaluó también la producción de cuerpos fructíferos (carpóforos). Los resultados finales fueron una producción de 74 carpóforos en condiciones de control, 103 carpóforos en el experimento a la concentración de 0.05% y una reducción en relación con el control a la concentración de 0.5% con 52 carpóforos, recolectados a lo largo de las 10 repeticiones de la producción de carpóforos. Finalmente, la concentración de 5% inhibió por completo la producción de carpóforos al terminar con 0 al acabar el experimento, estos resultados mostraron que la concentración 0.05% tuvo un incremento del 39% con respecto al control, mientras que la concentración de 0.5% tuvo una reducción del 30% con respecto al control, y en el caso de 5% una inhibición del 100%. (Figura 20).

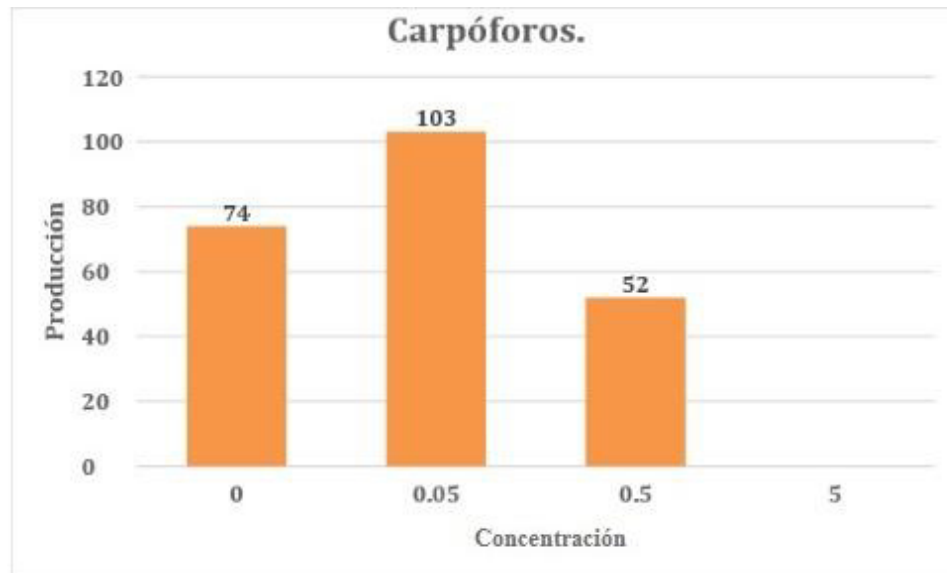


Figura 20 Valores de producción de carpóforos

La inhibición observada en las concentraciones de 0.5% tal y 5% concordó con los resultados observados en el experimento de biomasa restringiendo el crecimiento y generando biomasa de naturaleza frágil en comparación con el control lo que los volvía propensos a contaminarse a lo largo del experimento a diferencia de las demás concentraciones las cuales eran capaces de inhibir el crecimiento de contaminantes

Con respecto a cambios morfológicos en los carpóforos. las observaciones a lo largo del experimento no indicaron variación o la aparición de defectos u otras características observables tales como decoloraciones, o malformaciones que pudiesen reducir su valor comercial (Figura 21) fuera de la inhibición de la fructificación a la concentración del 5%, los carpóforos del experimento en cualquiera de las concentraciones eran indistinguibles entre sí.

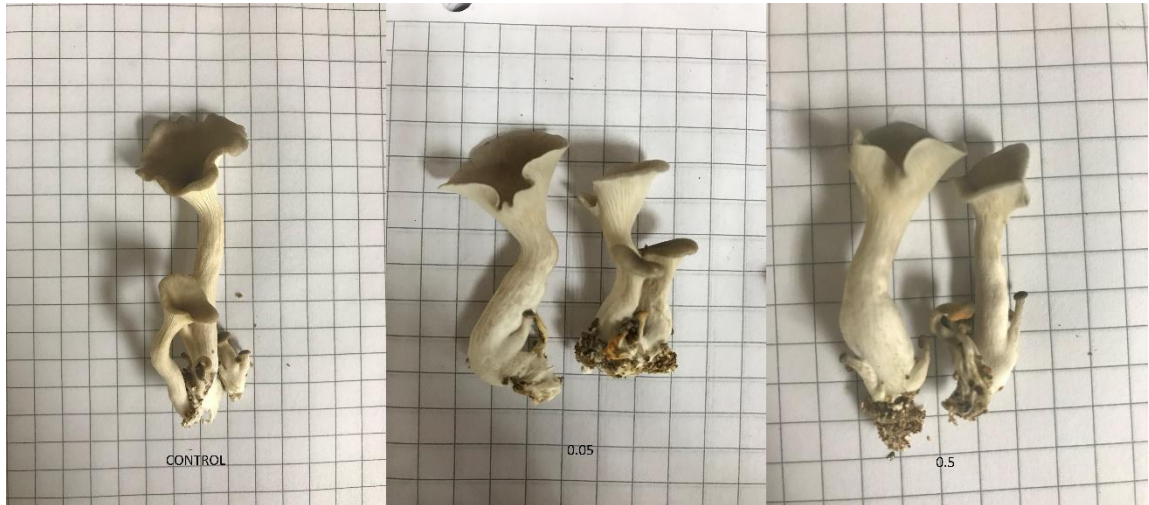


Figura 21 Comparación de carpóforos. Ejemplos de los experimentos. Carpóforos de las concentraciones de control, 0.05 y 0.5% sin cambios significativos en los valores de producción o cambios visibles en la morfología de los mismos.

13. DISCUSIÓN

La decisión de utilizar eritritol como aditivo experimental se sustenta en 3 conceptos principalmente. El primero: Se puede inferir que este posee un efecto sobre el crecimiento del hongo *L. edodes* al mejorar la velocidad de crecimiento de los cuerpos fructíferos, (Kuroda, & Hirakawa 2008). Además de múltiples artículos los cuales sustentan que el uso de polioles tales como el manitol y el xilitol pueden aumentar la velocidad de crecimiento en diversas especies de hongos como micorrizas y hongos asociados a líquenes. El segundo punto se basa en que el hongo no presenta cambios en sus propiedades organolépticas y/o nutricionales además de que los residuos que este pueda tener no generen un impacto negativo en la salud del mismo. El tercer punto en la literatura se reporta que la adición de polioles tiende a tener un efecto protector o estabilizador sobre la vida media de las enzimas al generar una protección sobre las mismas a efectos que van desde la termo tolerancia, resistencia a hidrólisis, e incremento a la tolerancia de cambios de pH aunque en algunos casos también se reporta un menor desempeño de la actividad de las enzimas ya que estos pueden bloquear el sitio activo de algunas enzimas, por lo que podría teóricamente estar influyendo en la capacidad metabólica del hongo, afectando el desempeño del mismo en el experimento.

El papel de los polioles en la estabilización enzimática se puede explicar de dos maneras.

La primera posibilidad es que estos aditivos limitan los cambios conformacionales formando enlaces hidrógeno con grupos superficiales sobre las enzimas, tales interacciones tenderían a preservar las conformaciones nativas, así como protegerán a los grupos internos de la exposición a la desamidación, oxidación, agregación u otras modificaciones. La segunda posibilidad es que los polioles se excluyen preferentemente del dominio proteico, aumentando así la energía libre del sistema. Termodinámicamente, la exclusión preferencial de los polioles conduce a la estabilización de la proteína, puesto que el estado desplegado de la proteína es termodinámicamente menos estable que en presencia de polioles (Singh & Singh. 2003).

Otra posibilidad es que la adición de eritritol al pasto además del proceso de esterilizado por autoclave pudiesen estar emulando un proceso conocido como Alkaline Poliol

Pulping o “Extracción de pulpa por polioles en condiciones alcalinas” este procedimiento se basa en un pretratamiento el cual degrada la lignina de la materia vegetal dejando la celulosa más disponible para ser procesada por la actividad enzimática esto se probó mediante sumergir diferentes tipos de aserrín ya sea maderas suaves o duras (esto se evalúa en relación con la cantidad de lignina en los diferentes tipos de madera) en una mezcla de glicerol con hidróxido de potasio al 10% donde los mejores resultados se reportaron a una temperatura de 230° C durante 25 minutos lo que redujo la cantidad de lignina en la madera dura hasta solo un 33% del contenido original y un 16% en la madera suave lo que en teoría debería mejorar la capacidad de procesado de la materia vegetal por actividad enzimática de acuerdo con (Hundt *et al.*, 2013).

En la primera fase experimental la prueba de metabolismo del eritritol, no había evidencia que indicara que indicara que *P. ostreatus* tuviese capacidad para metabolizar eritritol el hongo no obtenía energía de este por lo que cualquier efecto posible que este estuviera generando sobre el crecimiento del hongo se debería a cambios en la captación de nutrientes o en el desarrollo de las hifas en relación con la presión osmótica.

La segunda fase experimental inicialmente mostró un ligero incremento en la velocidad de crecimiento en concentraciones de eritritol del 0.5% lo que concordaba con los resultados obtenidos en *L. edodes* de acuerdo con lo reportado por (Kuroda, & Hirakawa 2008), pero conforme se compararon los resultados, las repeticiones mostraron que este no era un incremento significativo, aunque sí se observó que el eritritol generaba un efecto inhibitorio a una concentración del 5%, esto se podría deber a que la alta concentración del poliol genere un diferencial de presión osmótico lo que limite la captación de agua por parte del micelio. En observaciones microscópicas en medio de cultivo PDA se pudo ver que no había cambios significativos en la disposición y conformación del micelio a concentraciones de control, 0.05 %, y 0.5 %. aunque hubo un incremento significativo del grosor a la concentración de 5% estos cambios en el grosor del micelio pueden correlacionarse con los cambios vistos en *M. perniciosus* (Alvim *et al.*, 2009) en que cambios en la fuente de carbono generaron modificaciones en la estructura del micelio a causa del estrés por la falta de una fuente de carbono adecuada. Posteriormente las observaciones microscópicas se repitieron esta vez en

medio Czapek el cual es un medio con un menor valor nutricional para *P. ostreatus* en comparación al PDA, en este los cambios fueron más aparentes donde a una mayor concentración de eritritol el micelio tendía a adquirir una conformación más gruesa, esto podría deberse a que en este medio la presencia de un aditivo como el eritritol tendría a ser más aparente al no tener el resto de los nutrientes de PDA que amortiguaron el impacto del eritritol sobre el micelio.

En la tercera fase experimental se evaluó si había un efecto en la ganancia de peso causada por el eritritol, mediante un análisis de 10 repeticiones por concentración, esto mostró que no había una ganancia de peso significativa en relación con la concentración de eritritol que se adicionara al medio de cultivo, aunque sí se observó que en presencia de eritritol había una ligera diferencia en compactación y resistencia del micelio al compararse con el control, posiblemente el efecto del eritritol sobre la presión osmótica esté cambios conformacionales en las hifas. Esta explicación indica que conforme el eritritol aumento en concentración en las pruebas así mismo la retención de agua alterando las características del micelio lo que indica que no estaba metabolizando el eritritol, aunque este se incorporaba al mismo y que este no estaba afectando en la captación de nutrientes del medio de cultivo el cual se preparó a partir de un concentrado de papa al 2% y dextrosa al 2%, lo que generaba el mismo peso, pero una menor densidad. Alternativamente otra posible explicación es que en el micelio pudo haber metabolizado todos los nutrientes por lo que todas las pruebas generarían el mismo resultado en el peso al no poder generar más biomasa a partir del medio de cultivo sin importar los aditivos, pero generando el efecto de una disminución en la turgencia de la biomasa del micelio la cual se volvía mucho más frágil en relación con el incremento de la concentración de eritritol. Esto se correlaciona con pequeños cambios en la morfología del micelio vistos en la segunda etapa experimental, donde el micelio cultivado en PDA tendía a tener una menor resistencia lo cual indicaba que el micelio que era cultivado a una concentración de eritritol del 5% tendía a ser ligeramente más grueso y con una mayor disposición para la captación de colorante lo que indicaba que este tenía una estructura diferente la cual es menos resistente posiblemente por micro fracturas en la pared celular. Por lo que si bien no se detectaron cambios importantes en

el peso de los micelios en medio líquido este sí tenía una conformación más frágil que sus contrapartes de menor concentración de eritritol

Cuarta la fructificación: El tiempo que toma el crecimiento de *P. ostreatus* en sustrato en la incubadora ronda los 30 días que es el tiempo estimado para que el micelio agote los nutrientes del sustrato y la fructificación comenzó en promedio alrededor de los 20 días semejante a lo reportado por (Arjona *et al.* 2009) en la cual se indicaba que la fructificación en condiciones óptimas iniciaba a partir de 5 a 10 días, desde que el micelio se colocó en la cámara de fructificación. En contraste con lo observado durante el experimento en que el tiempo promedio para iniciar la fructificación ronda los 20 días, al observar los valores de peso así como tamaño no se mostró que el eritritol tuviese algún efecto en el desarrollo de los cuerpos fructíferos lo que inicialmente podría indicar que este no tenía ningún efecto sobre el hongo, pero que cuando se contabilizó el número de fructíferos mostró un incremento de producción del 39% y que debido a los datos previamente observados mostraba que la producción se incrementó sin reducir la calidad del producto “*A grandes rasgos aumentó la producción, sin bajar la calidad del producto*” lo cual presenta un gran interés para los productores del hongo ostra. En el caso de la concentración 0.5% el efecto inhibitorio puede ser causado por cambios conformacionales en el micelio que a concentraciones menores incrementan la captación de nutrientes, pero que al incrementarse se convierte en un detrimento para el hongo. Tales como cambios conformacionales, los cuales permiten que el micelio actúe con una mayor eficiencia en el sustrato.

El efecto deletéreo observado a lo largo del experimento está estrechamente relacionado con la concentración de eritritol, y dado que las concentraciones de prueba que se estudiaron se fueron incrementado 10 veces en relación con la anterior, queda a discusión la posible búsqueda del efecto que tendrían diferentes concentraciones de eritritol sobre el crecimiento del hongo *P. ostreatus*, en posteriores estudios sería posible investigar concentraciones diferentes hasta encontrar una que obtenga el mejor resultado en relación coste/producción, dado que la concentración ideal se encuentra en 0.05 en el experimento probar el efecto que tendrían concentraciones entre 0 y 0.5 tales como 0.01, 0.02, 0.07, 0.1, 0.25 que podrían generar mejores resultados así como el efecto de otros

polioles sobre *P. ostreatus*. Otro punto a mencionar es el volumen de sustrato que por fines de tiempo de colonización, espacio y manejabilidad se limitó a 70 gramos de sorgo por frasco dado que de esta manera se podían obtener resultados fiables y con múltiples repeticiones en un corto lapso de tiempo, es posible que realizando cultivos de mayor volumen se obtengan resultados mejores en el campo de tamaño y peso que si bien durante el experimento no mostraron valores significativamente diferentes pudo observar una ligera tendencia a un incremento en el tamaño y peso en la concentración de 0.05%.

14. CONCLUSIONES

1. El eritritol no es utilizado como fuente de carbono por *P. ostreatus*. Esto se confirma por la incapacidad del hongo de crecer en medio de cultivo con eritritol como única fuente de carbono, además de no generar cambios apreciables en el peso del micelio cuando este se encuentra adicionado al medio, lo que indica que este no es metabolizado por el hongo de manera total o parcial, sin embargo el hecho de los cambios en la densidad del micelio indica que el eritritol si bien no es metabolizado se incorpora al micelio y su efecto se relaciona con la concentración del mismo.
2. A nivel de crecimiento en placa, el eritritol no genera una mejora en el tiempo de crecimiento, aunque a elevadas concentraciones mostró un claro efecto inhibitorio.
3. El eritritol no genero un aumento en la biomasa del micelio en cultivo líquido, debido a que ninguna de las concentraciones mostró un efecto significativo.
4. El eritritol genera cambios de naturaleza estructural en el desarrollo del micelio observado, así como la resistencia del micelio al ser manipulado lo que indica, que concentraciones elevadas de eritritol causan cambios en la forma que el micelio se desarrolla estos cambios se asemejan a los que se dan en condiciones de estrés donde se generó un micelio de tipo aéreo o floculante mucho más activo y frágil en presencia de fuentes de carbono no fermentables ya que está aprovechando sus reservas con el fin en encontrar recursos de acuerdo con lo reportado por (Alvim *et al.*, 2009).
5. La adición de eritritol a una concentración de 0.05% incrementa la producción de carpóforos alrededor de un 39% sin bajar la calidad de la producción o alterar las características de estos lo que lo vuelve un interesante aditivo para incrementar la producción de *P. ostreatus* a escala industrial y continuar la investigación para observar su efecto en otras especies de hongos.

15. PERSPECTIVAS

1. Es posible optimizar el cultivo y producción de diferentes especies de hongos mediante la adición de diversos polioles u otros compuestos por lo que el presente estudio puede servir como una base de protocolo para seleccionar diferentes aditivos, así como las concentraciones en función de si se busca mejorar crecimiento, tiempos de desarrollo o producción.
2. El efecto que la administración de polioles sobre el desarrollo de hongos podría dar como resultado estrategias para la degradación de compuestos tóxicos como hidrocarburos o compuestos de la industria textil en concentraciones mucho mayores que las que se manejan actualmente o llevar a cabo la degradación de los mismos en un tiempo menor o con un mejor rendimiento al mejorar la capacidad de los hongos para degradar estos compuestos.
3. Otras posibles aplicaciones se podrían dar en el ámbito de la preservación comercial ya que con forme los polioles naturales en un hongo se agotan tras la cosecha la adición o suplementación de los mismos podría incrementar la vida de anaquel de estos productos.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvim, F. C., Mattos, E. M., Pirovani, C. P., Gramacho, K., Pungartnik, C., Brendel, M. & Vincentz, M. (2009). Carbon source-induced changes in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and secretion of necrosis-inducing proteins. *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 1035-1050.
2. Arakaki, R. L., Monteiro, D. A., Boscolo, M., Dasilva, R., & Gomes, E. (2013). Halotolerance, ligninase production and herbicide degradation ability of basidiomycetes strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1207-1214.
3. Arjona, D., Aragón, C., Aguilera, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2009). Reproducible and controllable light induction of in vitro fruiting of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycological research*, 113(5), 552-558.
4. Bari, E., Nazarnezhad, N., Kazemi, S. M., Ghanbary, M. A. T., Mohebbi, B., Schmidt, O., & Clausen, C. A. (2015). Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 231-237.
5. Beecher, T. M., Magan, N., & Burton, K. S. (2001). Water potentials and soluble carbohydrate concentrations in tissues of freshly harvested and stored mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest biology and technology*, 22(2), 121-131.
6. Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2007). Optimization of culture conditions for lichen *Usnea ghattensis* G. Awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production. *Food Technology & Biotechnology*, 47(1).
7. Behera, B. C., & Makhija, U. (2001). Effect of various culture conditions on growth and production of salazinic acid in *Bulbothrix setschwanensis* (lichenized ascomycetes) in vitro. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-*, 80(11), 1424-1427.
8. Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., & Ribani, R. H. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

9. Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H. M., & Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food chemistry*, 88(3), 425-428.
10. Davis, D. J., Burlak, C., & Nicholas, P. (2000). Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research*, 104(07), 800-804.
11. Daza, A., Manjón, J. L., Camacho, M., De La Osa, L. R., Aguilar, A., & Santamaría, C. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. *Mycorrhiza*, 16(2), 133-136.
12. Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100(1), 356-361.
13. Elshobary, M. E., OSMAN, M. E., Aboshady, A., Komatsu, E., Perreault, H., & Piercey-Normore, M. (2016). Algal carbohydrates affect polyketide synthesis of the lichen-forming fungus *Cladonia rangiferina*. *Mycologia*, 15-263.
14. Escobedo R. (2014). Producción de hongo seta (*Pleutorus ostreatus*). SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL PESCA Y ALIMENTACION, 8, 1-8. 2017, Agosto, 28, De SAGARPA
15. Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D., & Hernández, J. L. M. (2006). Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 235-240.
16. FDA (septiembre de 2011) Erythritol Food Usage Conditions for General Recognition of Safety 9 de.
17. Gaitán, R. (2016). La importancia nutricional y medicinal de los hongos cultivados. octubre 02, 2016, de INECOL Sitio web: <http://www.ecologia.edu.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/234-la-importancia-nutricional-y-medicinal-de-los-hongos-cultivados>
18. García, J. L., Troncoso, J., Sarmiento, R., & Troncoso, A. (2002). Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(1), 95-100.

19. Ghosh, S., & Sudha, M. L. (2012). A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(3), 372-379.
20. Girmay, Z., Gorems, W., Birhanu, G., & Zewdie, S. (2016). Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express*, 6(1), 87.
21. Guimarães, A. J., Frases, S., Cordero, R. J., Nimrichter, L., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2010). *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. *Cellular microbiology*, 12(6), 740-753.
22. Jennings, D. B., Daub, M. E., Pharr, D. M., & Williamson, J. D. (2002). Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *The Plant Journal*, 32(1), 41-49.
23. Jonathan, S. G., & Fasidi, I. O. (2001). Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry*, 72(4), 479-483.
24. John E. Hallsworth, Naresh Magan. (1995) Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability *Microbiology* 141, 1109-1115.
25. Hammond, J. B. W., & Nichols, R. (1976). Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Microbiology*, 93(2), 309-320.
26. Hundt, M., Schnitzlein, K., & Schnitzlein, M. G. (2013). Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of softwood: Effect of pulping severity and pulp properties on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource technology*, 134, 307-315.
27. Hundt, M., Schnitzlein, K., & Schnitzlein, M. G. (2013). Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of hardwood: effect of pulping severity and pulp composition on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource technology*, 136, 672-679.

28. Hood, I. A. (2006, February). The mycology of the Basidiomycetes. In ACIAR proceedings (Vol. 124, p. 34). ACIAR; 1998.
29. Itoo, Z. A., & Reshi, Z. A. (2014). Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under in-vitro conditions. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29(7), 619-628.
30. Kibar, B., & Pekşen, A. (2011). Mycelial growth requirements of *Lactarius pyrogalus* and *Lactarius controversus*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), 5107-5114.
31. Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M. Z., Agnihotri, A., & Varma, A. (2017). Endophytic root fungus *Piriformospora indica* affects transcription of steviol biosynthesis genes and enhances production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 97, 40-48.
32. Kitamoto, Y., Kikuchi, A., Mori, N., & Ohga, S. (2000). Pogliol metabolism in the mycelium and fruit-bodies during development of *Flammulina velutipes*. *Mycoscience*, 41(5), 461-465.
33. Kobayashi, Y., Iwata, H., Yoshida, J., Ogihara, J., Kato, J., & Kasumi, T. (2015). Metabolic correlation between pogliol and energy-storing carbohydrate under osmotic and oxidative stress condition in *Moniliella megachiliensis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(4), 405-410.
34. Kouichi Kuroda, Shuji Hirakawa. (2008). Growth acceleration of plants and mushroom by erythritol *Plant Biotechnology* 25, 489–492.
35. Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I., Shibata, Y., & Ishii, T. (2005). Effect of mannitol from *Laminaria japonica*, other sugar alcohols, and marine alga polysaccharides on in vitro hyphal growth of *Gigaspora margarita* and root colonization of trifoliolate orange. *Plant and soil*, 276(1-2), 279-286.
36. Lazarević, J., Stojičić, D., & Keča, N. (2016). Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of in vitro cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. *Forest Systems*, 25(1), 048.

37. Lewinsohn, D., Nevo, E., Hadar, Y., Wasser, S. P., & Beharav, A. (2000). Ecogeographical variation in the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. *Mycological Research*, 104(10), 1184-1190.
38. López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C., & Borrero, M. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 128-137.
39. Matsumoto, M., Kida, K., & Kondo, K. (1997). Effects of poliols and organic solvents on thermostability of lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 70(2), 188-192.
40. National Institutes of Health. ImageJ. (Versión 1.50) [Software]. (2016). Obtenido de: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
41. Nyunoya, H., Takemaru, T., & Ishikawa, T. (1984). Effects of sugars and poliols on basidiocarp formation in a phosphoglucose isomerase mutant of *Coprinus cinereus*. *Canadian journal of microbiology*, 30(1), 45-51.
42. Pal, A., & Khanum, F. (2011). Characterizing and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grown on solid-state-medium. *Journal of Biochemical Technology*, 2(4), 203-209.
43. Papinutti, L., Dimitriu, P., & Forchiassin, F. (2008). Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. *Bioresource Technology*, 99(2), 419-424.
44. Patriarca, A., Larumbe, G., Buera, M. P., & Vaamonde, G. (2011). Stimulating effect of sorbitol and xylitol on germination and growth of some xerophilic fungi. *Food microbiology*, 28(8), 1463-1467.
45. Peksen, A., Kibar, B., & Yakupoglu, G. (2013). Favourable culture conditions for mycelial growth of *Hydnum repandum*, a medicinal mushroom. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(6), 431-434.
46. Price, N. P., Bischoff, K. M., Leathers, T. D., Cossé, A. A., & Manitchotpisit, P. (2016). Poliols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *The Journal of Antibiotics*.

47. Rangel, D. E., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2006). Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of invertebrate pathology*, 93(2), 127-134.
48. Sengupta, S., Mukherjee, M., Das, N., Chakraborty, T. K., & Basu, D. (2004). The mannitol cycle in *Pleurotus ostreatus* (Florida).
49. Singh, S., & Singh, J. (2003). Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme. *Aaps Pharmscitech*, 4(3), 101-109.
50. Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press.
51. Strange, R. N., & Smith, H. (1971). A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology*, 1(2), 141IN5145-144150.
52. Strange, R. N., Majer, J. R., & Smith, H. (1974). The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological Plant Pathology*, 4(2), 277-290.
53. United States Department of Agriculture. (2016) *Mushrooms*.
54. Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A. R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., & Vassileva, M. (2016). Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1-9.
55. Vega, R. R., & Le Tourneau, D. (1971). Trehalose and polyols as carbon sources for *Verticillium* spp. *Phytopathology*.
56. Villaescusa, R., & Gil, M. I. (2003). Quality improvement of *Pleurotus* mushrooms by modified atmosphere packaging and moisture absorbers. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), 169-179.
57. Yamamoto, Y., Ryuzo, M., Sachiko, T. and Yasuyuki, Y. 1987. Effects of culture conditions on the growth of *Usneaceae* lichen tissue cultures. *Plant Cell Physiol.* 28:1421-1426.

58. Wang, Y., Han, K. S., Wang, X. Y., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2009). Effect of Ribitol and Plant Hormones on Aposymbiotical Growth of the Lichen-forming Fungi of *Ramalina farinacea* and *Ramalina fastigiata*. *Mycobiology*, 37(1), 28-30.
59. Zapata-Morín, P. A., Fuentes-Dávila, G., Adame-Rodríguez, J. M., & Aréchiga-Carvajal, E. T. (2010). Effect of pH and carbon source on the vegetative growth of *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn. in a solid and liquid culture medium. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 159-161.
60. Zhou, S., Ma, F., Zhang, X., & Zhang, J. (2016). Carbohydrate changes during growth and fruiting in *Pleurotus ostreatus*. *Fungal biology*, 120(6), 852-861.

17. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Eduardo Alain Sánchez Saldívar

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: Efecto del eritritol sobre el desarrollo y fructificación de *Pleurotus ostreatus*

Campo de estudio: Microbiología

Datos personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 27 de enero de 1990.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas con el grado de Licenciado en Biotecnología Genómica en 2014

Experiencia: Profesional: Asistente de laboratorio de fitopatología de 2013 a 2014.
Ejecutivo técnico en la implementación de un laboratorio de diagnóstico ambiental de 2014 a 2016.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Micología en el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la supervisión del Doctor Efrén Ricardo Robledo Leal. Declaramos que no existen conflictos de intereses con otros trabajos al momento de ser realizado.