

EFECTO COMBINADO DE QUITOSANOS CON DIFERENTE PESO MOLECULAR Y ENZIMAS DE HONGOS, SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Aspergillus niger*

M. Plascencia-Jatomea¹, N.A. Pacheco-López¹, G. Viniegra¹, R. Fierro² y K. Shirai¹

Universidad Autónoma Metropolitana, ¹Departamento de Biotecnología, ²Departamento de Ciencias de la Salud. Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (5)8044921. E-mail: smk@xanum.uam.mx

Palabras clave: Quitosano, Germinación de esporas, *Aspergillus niger*.

Introducción. El empleo excesivo de fungicidas químicos para controlar el desarrollo de hongos en alimentos ha dado como resultado la necesidad de buscar métodos naturales alternativos para prolongar la vida de anaquel de los alimentos. El quitosano es un biopolímero biodegradable y no tóxico, considerado como un conservador potencial natural de alimentos. Tomando en cuenta que las enzimas fúngicas degradadoras de pared celular son capaces de controlar el desarrollo de hongos,¹ la combinación de quitosano y enzimas puede actuar efectivamente sobre el crecimiento de patógenos en alimentos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto combinado de enzimas de hongos y quitosanos con diferentes pesos moleculares sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*.

Metodología. Matrices con medio de cultivo líquido Czapeck fueron adicionados con 3.5 g/L de quitosanos de diferentes pesos moleculares y grados de desacetilación (400 kDa y 85%; 255 kDa y 99%; 160 kDa y >99%). Cada matraz fue adicionado con 20% de extracto enzimático de *Verticillium lecanii*² e inoculados con 1×10^5 esporas/mL de *A. niger*. Diez mL de cada medio de cultivo fueron colocados en placas petri con cubreobjetos e incubados durante 18 horas a 30°C. Las esporas germinadas adheridas al cubreobjetos fueron fijadas en solución de formaldehído/buffer de fosfatos 50 mM/tritón X-100. Las muestras fijadas fueron colocadas sobre portaobjetos y se procedió a contar el número de esporas germinadas y/o polarizadas. Una espora se consideró germinada cuando la longitud del túbulo germinal fue igual o mayor al diámetro de la hifa; asimismo se consideró polarizada al momento de perder la esfericidad y adoptar forma de pera (Figura 1). El efecto sinérgico de quitosano y enzimas sobre la germinación se determinó por la fórmula de Limpel: $Ee = [X + Y - (XY)] / 100$, en donde *Ee* es el efecto aditivo esperado de los factores, y X y Y son los porcentajes de inhibición de cada factor por separado. La existencia de sinergismo se consideró cuando los porcentajes de inhibición de los tratamientos con quitosano y enzimas fueron mayores a *Ee*.¹ Los diámetros de las esporas y de las hifas se obtuvieron por procesamiento de imágenes.³ El número de divisiones mitóticas se realizó por microscopía de fluorescencia, mediante el conteo de núcleos (Hoechst 33258).⁴

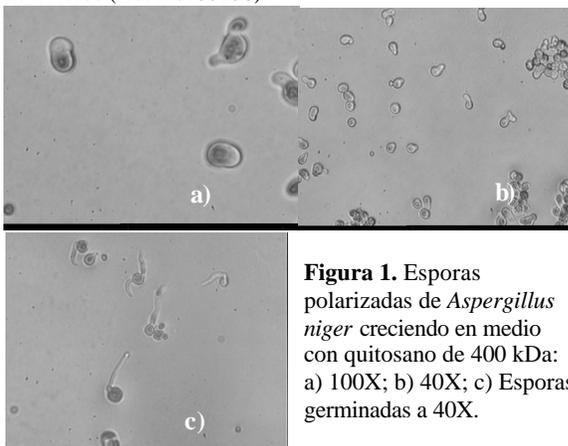


Figura 1. Esporas polarizadas de *Aspergillus niger* creciendo en medio con quitosano de 400 kDa: a) 100X; b) 40X; c) Esporas germinadas a 40X.

Resultados y discusión. La adición de quitosano retardó significativamente ($P < 0.05$) la germinación de esporas con

respecto al control (Tabla 1). En presencia del biopolímero, *A. niger* presentó un porcentaje de esporas germinadas $< 60\%$ a las 18 h, cuando los controles habían alcanzado el 100%. En medio con quitosano de 400 kDa, la germinación inició a las 8 h, mientras que en medio añadido con los biopolímeros de bajo peso molecular (160 y 255 kDa), las esporas germinaron a las 12 h.

Tabla 1. Porcentaje de esporas germinadas y polarizadas de *Aspergillus niger* en medio Czapeck, a las 18 h después de la inoculación.

Quitosano (kDa)	Extracto enzimático (U/mg proteína)	% esporas germinadas*	% Inhibición de la germinación	% esporas polarizadas*
Control	0	98.3±0.03 ^t	0	6.5±0.05 ^a
	70	85.8±0.33 ^c	12.7±3.31	3.8±0.08 ^a
400	0	15.3±0.13 ^a	84.5±1.27	36.8±0.23 ^{bc}
	70	35.3±0.38 ^b	64.1±3.82	29.5±0.15 ^b
255	0	53.8±0.23 ^{cd}	45.3±2.29	35.5±0.10 ^{bc}
	70	43.8±0.08 ^{bc}	55.5±0.76	36.0±0.20 ^{bc}
160	0	59.5±0.15 ^d	39.4±1.53	38.5±0.05 ^c
	70	49.8±0.08 ^{cd}	49.4±0.76	38.8±0.28 ^c

*Estos resultados son el promedio de dos experimentos independientes con un total de 400 observaciones ± el error estándar de la media.

Valores con letras diferentes indican grupos estadísticamente diferentes a $P < 0.05$.

La adición de quitosanos con diferentes pesos moleculares inhibió la germinación de esporas, ya sea solo o en combinación con el extracto enzimático, siendo el quitosano de 400 kDa el que presentó el mayor porcentaje de inhibición. En cuanto al porcentaje de esporas polarizadas, este fue incrementado de manera significativa ($P < 0.05$) en presencia del quitosano comparando con los controles con y sin extracto. La adición del extracto enzimático no incrementó sinérgicamente el efecto inhibitorio del quitosano sobre la germinación de esporas. Sin embargo incrementó significativamente ($P < 0.05$) el diámetro de las esporas e hifas con respecto al control, observándose mayor deformación e hinchamiento. Por otro lado se observó que la presencia de enzimas disminuyó el número de núcleos (divisiones mitóticas) a pesar del mayor porcentaje de esporas polarizadas, comparando con el control y los tratamientos con quitosano.

Agradecimientos. A CONACyT por el apoyo a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E.

Referencias.

- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K. and Harman, G.E. (1994). *Microbiology*, 140: 623-629.
- Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S. and Shirai, K. *Process Biochem.* 2003. En prensa.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo, M. y Shirai, K. (2001). *Chitin and chitosan in life science*. Editado por Urugami, T., Kurita, K. y Fukamizo, T. Editorial Kodansha Scientific LTD, Tokio. Pp: 256-259.
- Momany, M. and Tylor, I. (2000). *Microbiology*, 146: 3279-3284.