

## INFLUENCIA DEL QUITOSANO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE *Aspergillus niger*, EN CULTIVO LÍQUIDO Y SUPERFICIAL

Pacheco-López, N.A., Plascencia-Jatomea, M. y Shirai, K\*

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (5)804 4717.

E-mail: [smk@xanum.uam.mx](mailto:smk@xanum.uam.mx)

### Introducción.

*Aspergillus niger* es considerado como uno de los principales hongos filamentosos causantes de deterioro en alimentos. Debido a que el desarrollo de tales microorganismos es controlado comúnmente por el uso de compuestos químicos que dejan residuos tóxicos y causan resistencia en los microorganismos, se han buscado nuevos métodos naturales para prolongar la vida de anaquel de los alimentos.<sup>1</sup> El quitosano es un biopolímero catiónico capaz de inducir la producción de moléculas de defensa (quitosanasas, quitinasas, glucanasas) en tejidos vegetales<sup>2</sup>, por lo que es considerado como un conservador potencial natural. No obstante, los mecanismos por los cuales el quitosano inhibe el crecimiento de hongos aún no son claros. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del quitosano sobre la producción de enzimas de *Aspergillus niger*, en medio de cultivo líquido y superficial.

### Metodología.

*Cultivo en medio líquido (CL)*. Matraces con medio Czapeck (control) y adicionado con 3.5 g/L de quitosano fueron inoculados con una suspensión de esporas de *A. niger* e incubados a 30°C, a 100 rpm.

*Cultivo superficial (CS)*. Círculos de celofán comercial de 59.45cm<sup>2</sup> de área fueron esterilizados y colocados cuidadosamente sobre placas con agar Czapeck (control) y adicionado con 3.5 g/L de quitosano, dejándose por un día a temperatura ambiente para asegurar que no exista contaminación. Posteriormente se inocularon con una suspensión de esporas de *A. niger* utilizando la técnica de inoculación por superficie, y se incubaron a 30°C. Una vez desarrollado el micelio, este fue resuspendido sumergiendo la película de celofán en una solución de tween 80 al 0.05% (v/v).

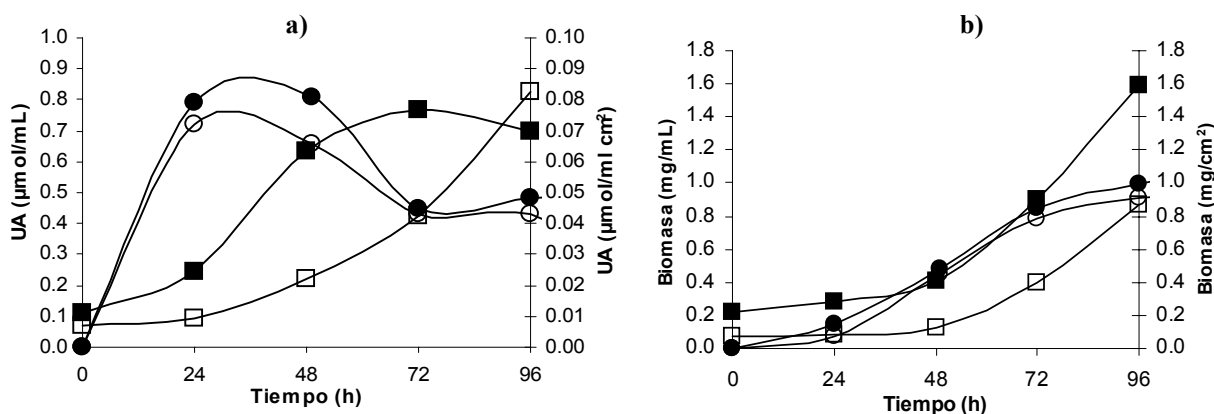
Se realizaron muestreos cada 24 horas y las soluciones con los micelios fueron centrifugadas a 4°C y 11,500 rpm. Los micelios fueron filtrados para cuantificar la biomasa producida por peso seco. Los sobrenadantes fueron analizados en cuanto a la cantidad de azúcares reductores (glucosamina) presentes. La actividad enzimática (quitosanasas) fue determinada a 30°C utilizando quitosano en buffer de acetatos 50 mM, pH 5 durante 3 h; la reacción fue detenida mediante adición de NaOH 0.02 N, centrifugada y al sobrenadante se le midieron azúcares reductores. Una unidad de quitosanasas se definió como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores, medidos como equivalentes de glucosamina por minuto.

### Resultados y discusión.

En ambos cultivos (CS y CL) se detectó la presencia de azúcares reductores durante las 96 horas de crecimiento, en las que se determinaron mayores concentraciones en CL. Comparando los resultados obtenidos con respecto a la producción en cultivo superficial, se observó que en medio líquido el quitosano incrementó 5 veces la producción de glucosamina. Esto puede ser debido a que el quitosano en CL está más disponible para el hongo que en el CS, favoreciendo la actividad enzimática.

En cultivo superficial, la máxima producción de quitosanasas se observó dentro de las primeras 48 horas, tiempo en el que el hongo se encontraba en la etapa de crecimiento apical (Figura 1a y b), lo cual corresponde al periodo en donde el quitosano retarda el crecimiento radial de *A. niger*.<sup>3</sup> Esto se puede explicar a la excreción de enzimas durante la etapa de adaptación del hongo al medio de cultivo bajo el sistema utilizado. Por otro lado, en medio líquido se encontró que la producción de quitosanasas está asociada al crecimiento del hongo, obteniendo la máxima actividad al final del experimento (96 h). Comparando la producción de quitosanasas en ambos experimentos, la máxima producción se obtuvo en medio líquido, siendo hasta 10

veces mayor. En cultivo superficial, la adición de quitosano no altera el crecimiento del hongo, observándose valores de biomasa similares al del control; esto puede ser debido a que se limita el contacto directo del hongo con el biopolímero, por lo que no hay un retardo aparente de las etapas iniciales de crecimiento a diferencia de cuando el hongo crece sin celofán.<sup>3</sup>



**Figura 1.** a) Actividad de quitosanasas en los extractos enzimáticos de los cultivos líquido y superficial de *Aspergillus niger* en medios con y sin quitosano: (■) Líquido control; (□) Líquido quitosano; (●) Superficial control; (○) Superficial quitosano. b) Producción de biomasa de *A. niger* en medio líquido (mg/mL) y en cultivo superficial (mg/cm² de placa) añadido con y sin quitosano.: (■) Líquido control; (□) Líquido quitosano; (●) Superficial control; (○) Superficial quitosano.

El crecimiento apical inicia a las 24 h y 48 h para CS y CL, respectivamente, lo que indica que existe un efecto inhibitorio del quitosano al microorganismo en cultivo líquido (Figura 1b), lo cual se puede explicar a la producción de enzimas que degraden al quitosano, como consecuencia de la adaptación del hongo al biopolímero. Por el contrario, en medio líquido el crecimiento apical del hongo inicia a partir de las 48 h, observándose que el quitosano reduce a la mitad la producción de biomasa, con respecto al control, esto se relaciona con la disponibilidad de quitosano en el medio (Figura 1b). La capacidad de los hongos para producir enzimas hidrolíticas, i.e. quitinasas y quitosanasas, en presencia de quitosano, explica la actividad fungistática que retarda la germinación de esporas y que posteriormente reduce la inhibición en crecimiento apical, debido a la adaptación del hongo al biopolímero.<sup>3</sup>

### Conclusiones.

En este estudio se compara el efecto del quitosano sobre la producción de enzimas de *Aspergillus niger* en medio líquido y en cultivo superficial. Los resultados indican que *A. niger* crece en presencia de quitosano a través del mecanismo de adaptación, que involucra la producción de enzimas que hidrolizan el biopolímero para que la glucosamina liberada sea asimilada como fuente de carbono.

### Agradecimientos.

Los autores agradecen a CONACyT por el apoyo a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E, y al M.B. Yoyi Matsumoto por sus aportaciones a este trabajo.

### Referencias.

1. Roller, S. and Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 67-77.
2. El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. y Boulet, M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J. Food Sci.* 56(6):1618-1620.
3. Plascencia, M., Olayo, R., Larralde, P., Castillo, O. y Shirai, K. (2001). Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation. En: *Chitin and Chitosan in Life Science*. Urugami, T., Kurita, K. y Fukamizo, T. (editores), Kodansha Scientific LTD. Tokio, Pp: 256-259.