

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE QUITOSANA. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL POLÍMERO Y SUS HIDROLIZADOS

A. Falcón✉, D. Díaz y M. A. Ramírez

ABSTRACT. Chitosan is a chitin-derived desacetylato, a polymer of N-acetil-Glucosamina that is extracted from the exoskeleton of the crustaceans. Both polymers as well as their oligomers have proved to protect several species of plants against fungal diseases by means of the induction of defensive mechanisms that stop the advance of the pathogen in the vegetable and by direct action of pathogenic fungi growth inhibition. In this work, the hydrolysis of chitosan with Pectinex Ultra SPL (Novozymes) was carried out and the course of the reaction was monitored by determining the intrinsic viscosity of the solution as well as the increment of reducing sugars during the reaction time. The analysis of hydrolysis results allowed to suggest a remarkable endo-chitosanase character for the Pectinex enzymatic pool. Additionally, the activity of *in vitro* growth inhibition of the pathogen *Phytophthora parasitica* and the inducing chitinase activity in soybean plants was comparatively studied, using the native chitosan and their enzymatic hydrolysates of two and 10 hours. A bigger growth inhibition of *P. parasitica* was observed in the case of hydrolysates regarding the native chitosan, as well as a higher induction of chitinase activity in soybean plants previously treated with the 10 hour-hydrolysate. Results are discussed concerning the importance of GP in the antifungal activity and signal perception that induces soybean plant defense response, taking into account the increment of the number of fragments by means of the hydrolysis.

Key words: chitosan, enzymatic hydrolysis, *Phytophthora parasitica*, fungal diseases, chitinase activity

RESUMEN. La quitosana es el derivado desacetilado de la quitina, un polímero de N-acetil-Glucosamina que se extrae del exoesqueleto de los crustáceos. Ambos polímeros así como sus oligómeros han demostrado que protegen varias especies de plantas contra enfermedades fúngicas mediante la inducción de mecanismos defensivos que detienen el avance del patógeno en el vegetal y por acción directa de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos. En este trabajo se llevó a cabo la hidrólisis de quitosana con Pectinex Ultra SPL (Novozymes) y el transcurso de la reacción se monitoreó mediante la determinación de la viscosidad intrínseca de la solución así como el incremento de azúcares reductores en el tiempo. El análisis de los resultados de la hidrólisis permitió sugerir un marcado carácter endo-quitosanaso para el Pectinex. Se estudió comparativamente la actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* del patógeno *Phytophthora parasitica* y la inducción de actividad quitinasa en plantas de soja, de la quitosana nativa y sus hidrolizados enzimáticos de dos y 10 horas. Se observó una mayor inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. parasitica* en el caso de los hidrolizados en relación con la quitosana nativa, así como una mayor inducción de actividad quitinasa en plantas de soja previamente tratadas con el hidrolizado de 10 horas. Se discute a partir de los resultados la importancia del GP, tomando en cuenta el incremento del número de fragmentos mediante la hidrólisis en la actividad antifúngica *in vitro* y para la percepción de la señal que induce la respuesta defensiva en plantas de soja.

Palabras clave: quitosana, hidrólisis enzimática, *Phytophthora parasitica*, enfermedades fúngicas, actividad quitinasa

INTRODUCCIÓN

La quitina es un polisacárido lineal compuesto por uniones de residuos (1→4) -2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido. Su producción a partir del exoesqueleto de crustáceos se ha incrementado sustancialmente en los últimos 20 años, como resultado de la versatilidad y las múltiples aplicaciones de este polímero y sus deriva-

dos en los campos de la medicina, nutrición, industria, cosmética y agricultura (1, 2). La quitina es, además, el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y resulta fácilmente obtenible y renovable.

La quitosana es el principal derivado de la quitina y se obtiene por parcial o total desacetilación de esta, lo cual incrementa la capacidad de disolución del polímero en agua. Entre las ventajas de la quitosana que señalan la importancia de su uso en la agricultura están su solubilidad en agua o ácidos débiles diluidos a diferencia de la quitina, su actividad inhibidora del crecimiento de un importante número de hongos fitopatógenos (3, 4), la

Ms.C. A. Falcón, Investigador Auxiliar del Grupo de Productos Bioactivos, Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal; Ms.C. M. A. Ramírez, Investigador Agregado de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; D. Díaz, Profesor del Departamento de Bioquímica, Escuela Latinoamericana de Medicina, La Habana, Cuba.

✉ alfalcon@inca.edu.cu

Abreviaciones: H₂O d: Agua destilada; GP: Grado de polimerización; GA: Grado de acetilación, PAL: actividad Fenil-alanina amonioliasa, PDA: Papa-Dextrosa-Agar

inducción de respuestas defensivas y protección contra patógenos en plantas (5, 6, 7) y la elevación de los rendimientos agrícolas en varios cultivos (8).

Los grados de acetilación (GA) y polimerización (GP) de las quitosanas son de vital importancia tanto en la actividad antifúngica directa contra fitopatógenos como en la inducción de respuestas defensivas en la planta. Así, varios autores han demostrado el incremento de la inducción de varias respuestas defensivas como la actividad peroxidasa, PAL, y el incremento de H_2O_2 cuando se elevan los valores de acetilación de las quitosanas, lográndose valores máximos de dichas actividades con GA por encima del 20 % en el polímero de quitosana (5, 9). Sin embargo, la actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos se incrementa en la medida que decrece el grado de acetilación en el polímero (3). Por otra parte, el GP de la quitosana influye notablemente en su actividad biológica, relacionada tanto con la inhibición directa del crecimiento de patógenos (3) como en la inducción de respuestas defensivas (5) y la protección contra patógenos (6, 7).

Por lo anterior la degradación, sea química o enzimática, del polímero de quitosana libera fragmentos, que en dependencia de los parámetros antes mencionados (GP y GA) y del patógeno o variedad de planta sobre la cual se trabaje provocan una amplia gama de respuestas que se encuentra en la actualidad como una importante línea de estudio de esta temática (5, 6, 9). La degradación enzimática por ser específica resulta más ventajosa para controlar la preparación de oligómeros bioactivos y se ha demostrado la susceptibilidad del polímero de quitosana al ser hidrolizado por gran número de enzimas, entre las que se destacan celulasas, lisozimas, pectinasas e incluso proteasas (10, 11, 12, 13, 14).

A partir de lo anterior, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar las posibilidades de un *pool* comercial de enzimas para la degradación del polímero de quitosana y comparar la actividad biológica del polímero y sus hidrolizados enzimáticos, como inhibidores del crecimiento del fitopatógeno *Phytophthora parasitica* e inductores de actividad quitinasa en plantas de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la quitosana de trabajo. La quitosana de trabajo (Q-5) se preparó mediante desacetilación básica de quitina de langosta, calidad farmacéutica, en condiciones homogéneas, siguiendo la metodología descrita (15). La determinación del grado de acetilación y polimerización de la quitosana obtenida se realizó mediante potenciometría y viscosimetría respectivamente, siguiendo protocolos descritos en nuestro laboratorio (15, 16), con la realización de al menos cinco repeticiones en cada caso y utilizando para ello quitosana previamente purificada por una metodología de rutina. El GP se calculó mediante la fórmula $GP = Mv/m$, donde M es la masa molar promedio y m es la masa molar equivalente.

Hidrólisis de la quitosana con Pectinex Ultra SPL. La quitosana se disolvió al 1 % en ácido láctico 130 mM y se ajustó el pH a 5.6 con KOH. Se adicionó un volumen del preparado enzimático equivalente a la relación 1 mL de enzima por 100 mL de solución de quitosana sustrato. La hidrólisis se permitió proceder entre 0 y 10 horas a 37°C con agitación magnética continua. Para estudiar el curso de la reacción se extrajeron alícuotas de 20 mL en los siguientes tiempos de hidrólisis: 15 min., 1, 2, 4, 6, 8 y 10 h. La reacción enzimática fue detenida en cada alícuota mediante esterilización de la solución por 15 minutos a 121°C en autoclave. El curso de la reacción fue seguida por determinación de la viscosidad y los azúcares reductores liberados en el tiempo, este último mediante la técnica de Nelson (17). Las muestras de mayor viscosidad se determinaron en un viscosímetro Ostwald de constante viscosimétrica $k = 0.1$ (muestras 0, 15 min., 1 h), las demás en un viscosímetro Ubbelohde de volumen variable de $k = 0.01$, realizándose en todos los casos cuatro lecturas por muestra. Los resultados de viscosidad se presentaron como viscosidad relativa, que se calcula comparando el tiempo de caída de la muestra en el viscosímetro con el tiempo de caída del *buffer* de la muestra. Cada punto del gráfico es la media de dos experimentos de hidrólisis independientes. Se calculó el porcentaje de hidrólisis (16).

Actividad antifúngica in vitro contra un aislado de *Phytophthora parasitica*. Se llevó a cabo un experimento con las siguientes condiciones. Se utilizaron placas de petri de 90 mm de diámetro que contenían 20 mL de Papadextrosa-Agar (PDA) conteniendo los tratamientos a las concentraciones de 250, 500 y 1000 mg.L⁻¹ para cada caso. El control consistió en medio de cultivo conteniendo el disolvente de los tratamientos (acetato de potasio 20 mM). En cada caso se sembró un ponchete de 8 mm de diámetro, de micelio *P. parasitica* aislado de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Amalia), previamente crecido en PDA y se determinó el crecimiento midiendo el diámetro de cada colonia por placa al cabo de siete días. Se utilizaron cinco réplicas por tratamiento.

Los resultados se procesaron estadísticamente mediante un análisis bifactorial, cuyos niveles fueron producto y concentración, y las medias se compararon mediante una prueba de rangos múltiples de Duncan al 1 % de significación.

Inducción de actividad quitinasa en plantas de soya. Semillas de soya de la variedad Fosca Rim fueron embebidas durante cuatro horas en soluciones conteniendo los tratamientos (quitosana e hidrolizados de quitosana de dos y 10 horas, a las concentraciones de 250, 500 y 1000 mg.L⁻¹) y el control, este último consistente en el disolvente usado para los tratamientos: acetato de potasio 20 mM, pH 5.5. Posteriormente, las semillas se germinaron en placas de Petri y finalmente se sembraron en un sustrato de suelo-materia orgánica 50:50 v/v.

Después de 17 días de aplicados los tratamientos, se colectó el primer par de hojas verdaderas de las plan-

tas y se maceraron en presencia de nitrógeno líquido. El polvo fue extraído en *buffer* acetato de sodio 50 mmol.L⁻¹, pH 5.2 conteniendo 5 mmol.L⁻¹ de EDTA, 5 mmol.L⁻¹ β-mercapto-etanol y 1.0 mol.L⁻¹ de NaCl en una relación de un gramo de masa fresca por cada 2 mL de *buffer*. El extracto se centrifugó a 12 000 gravedades en una centrífuga Sigma 2-15 por 10 minutos. La actividad quitinasa se determinó en el sobrenadante de acuerdo a la metodología descrita (18), usando quitina coloidal como sustrato. La actividad enzimática fue expresada como nmol.L⁻¹ de N-acetil-glucosamina liberada por minuto por gramo de masa fresca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de conocer las características distintivas de la quitosana de partida, se decidió determinar su GP y GA debido a la importancia de ambos parámetros en la actividad biológica en plantas, para lo cual fue necesario purificar la quitosana Q-5. En la Tabla I se muestra un resumen de los resultados de caracterización obtenidos.

Tabla I. Características químicas de la Q-5

Quitosana	M _v (10 ⁻⁵ Da) ⁽¹⁾	GP ⁽²⁾	GA ⁽³⁾
Q-5	1.27	720	36.5 ± 0.91

⁽¹⁾Masa molecular promedio determinada viscosimétricamente

⁽²⁾Grado de polimerización determinado por la fórmula GP=Mv/m;

⁽³⁾Porcentaje de acetilación (GA) determinado potenciométricamente.

La quitosana obtenida presenta un GA de 36.5 %, valor que se encuentra dentro del rango informado por varios autores como el de mayor potencialidad de inducción de marcadores defensivos en familias de plantas como las Cucurbitáceas, Solanáceas, Leguminosas y Poáceas (5, 9).

Estudio de la hidrólisis de la quitosana con el Pectinex Ultra SPL. El Pectinex Ultra SPL es un preparado enzimático comercial de la empresa *Novozymes*, obtenido a partir de microorganismos del género *Streptomyces* y que se vende fundamentalmente para la clarificación de jugos y vinos de manzanas y peras. Dicho preparado consiste en un *pool* de enzimas Pectinasas y de ellas casi esencialmente Poligalacturonasas con una actividad de estas de 26 000 u.mL⁻¹, aunque tiene en menor medida otras actividades enzimáticas.

En la Figura 1 se representa el comportamiento de la viscosidad relativa y la concentración de grupos reductores generados en el transcurso de la reacción. Se observa una marcada acción endo-quitosanasa, ya que la viscosidad disminuye bruscamente (alrededor de un 80 %), en la primera hora de hidrólisis, siendo el incremento de grupos reductores poco significativo. Sin embargo, a partir de las dos horas la viscosidad permanece prácticamente constante y el incremento de los grupos reductores es considerable.

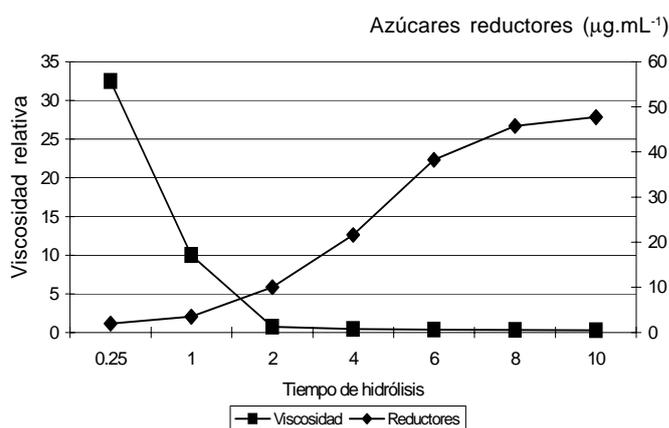


Figura 1. Estudio de la dinámica de hidrólisis de la quitosana con el Pectinex Ultra SPL

Lo anterior puede explicarse por dos hipótesis alternativas:

- ◆ Es posible que con la disminución de la masa molar como consecuencia de la hidrólisis, las enzimas de acción endo-quitosanasa pierdan afinidad por los productos de la hidrólisis. Esto justificaría que la viscosidad no siga disminuyendo bruscamente a partir de una hora. Por otro lado, la hidrólisis conlleva al aumento de la concentración de sustrato para la acción de enzimas de tipo exo-quitosanasa, actividad que tampoco se puede descartar dentro del preparado. Esto justificaría entonces el incremento de la concentración de extremos reductores liberados con poca variación de la viscosidad a partir de una hora de incubación.
- ◆ Otra explicación podría ser que a medida que transcurre la hidrólisis, el tamaño molecular de los oligómeros obtenidos no contribuye apreciablemente a detectar los cambios de viscosidad. Según la ecuación de Mark-Houwink (2), la viscosidad no presenta una dependencia lineal con el peso molecular, siendo para la quitosana el valor de $a < 1$. Lo anterior indica que la contribución a la viscosidad se hará menor mientras menor sea el tamaño molecular.

En adición, el cálculo del porcentaje de enlaces hidrolizados (Figura 2) muestra que no ha sido sobrepasado el 1 % a las 10 horas de hidrólisis; esto unido al elevado decrecimiento de la viscosidad sin un alto incremento de la aparición de azúcares reductores hasta las dos primeras horas de hidrólisis, indica un carácter endo-quitosanasa de la mezcla enzimática. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores¹, quienes comparando la actividad quitosanasa de varios preparados enzimáticos concluyeron que el Pectinex Ultra SPL presenta un elevado carácter endo-quitosanasa (datos no publicados).

¹Hernández y Cabrera, 2002 (comunicación personal)

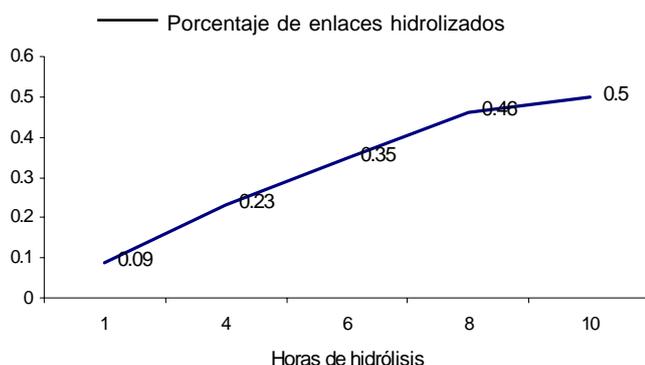


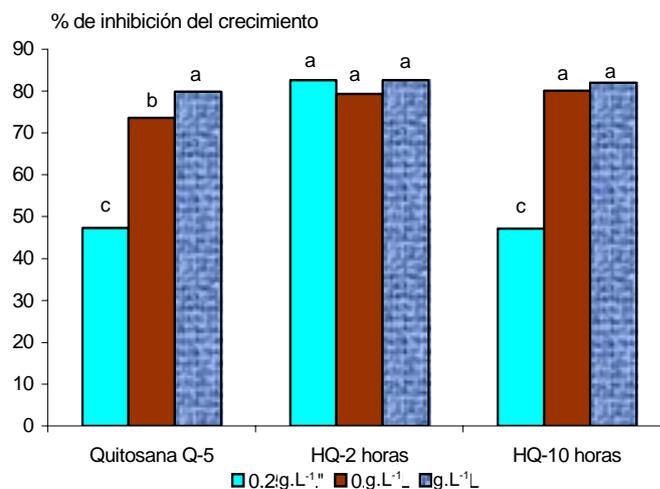
Figura 2. Variación del porcentaje de enlaces hidrolizados por el Pectinex Ultra SPL en 10 horas de reacción

Sin embargo, debido a que el Pectinex es una mezcla enzimática con predominio de diferentes actividades Poligalacturonasas, no se pueden descartar cambios de afinidad de las enzimas en relación con los cambios de tamaño molecular del sustrato en el tiempo, ni a la posible aparición de afinidad para actividad exo-quitosanasa. Por otra parte, el aumento exponencial de reductores a partir de una hora de la hidrólisis, disminuye su incremento a partir de las ocho horas, donde el comportamiento comienza a tornarse en meseta; se puede pensar que a partir de este tiempo, las enzimas pierden afinidad por los fragmentos de menor masa molar que se han formado en el medio como producto de la hidrólisis o que está ocurriendo una inhibición por el incremento de la cantidad de sustrato como resultado de la degradación de los polímeros de mayor tamaño. Resultados coherentes con la explicación anterior fueron obtenidos (19) al degradar quitosana con una pectinasa de *Aspergillus niger*. Estos autores demostraron que incrementos de sustrato por encima de 12 g.L^{-1} reducían la velocidad de hidrólisis de la quitosana empleada.

Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de las moléculas de Q-5 en los diferentes momentos de la hidrólisis se decidió comparar, en los análisis de actividad biológica, el polímero de quitosana Q-5 con los hidrolizados de dos horas (baja viscosidad y baja cantidad de grupos reductores, lo que indica una masa molar intermedia) y de 10 horas (baja viscosidad y alta cantidad de reductores, indicativo de masas molares menores).

Actividad antifúngica del polímero de quitosana Q-5. En la última década varios autores han informado la capacidad antifúngica *in vitro* de las quitosanas (3, 4, 20, 21, 22). Aunque no ha sido elucidado el mecanismo exacto mediante el cual la quitosana ejerce su actividad antifúngica, ha sido informado por varios autores que la quitosana ejerce su efecto anti-patogénico *in vitro* por diferentes mecanismos que incluyen el debilitamiento y la delgadez de la pared celular del patógeno, pérdida de aminoácidos y proteínas, incremento de la vacuolación, alteración de la membrana plasmática, distorsión de la hifa y agregación citoplasmática (3, 4, 21), y acumulación de fragmentos dentro de la pared que podrían alterar la replicación del material nuclear (23).

Para determinar las posibles diferencias entre la quitosana Q-5 y sus hidrolizados, se realizó un experimento utilizando una cepa de *Phytophthora parasitica* aislada de tomate (*Lycopersicon esculentum*, variedad Amalia). Los resultados se muestran en la Figura 3.



Medias con letras iguales no difieren para un nivel de 0.01 en la prueba de Rangos Múltiples de Duncan

Figura 3. Comparación de la actividad inhibidora del crecimiento de una cepa de *Phytophthora parasitica*, aislada de tomate por quitosana y sus hidrolizados

De forma general, se observa que tanto la Q-5 como sus hidrolizados presentan efectos antifúngicos a las concentraciones utilizadas. Esto sugiere que la hidrólisis de la Q-5 resulta en un incremento de la cantidad de moléculas con actividad antifúngica. Algunos autores (24) demostraron que para exhibir actividad antifúngica las moléculas de quitosana debían tener al menos siete residuos de glucosamina. Esto sugiere entonces que todavía a las 10 horas de hidrólisis no se ha sobrepasado este límite si es que se ha llegado a él.

No se obtuvieron diferencias significativas entre los tres productos a 1 g.L^{-1} , mientras que a 0.5 g.L^{-1} los dos hidrolizados inhiben significativamente mejor al patógeno que la quitosana polímero. En el caso del hidrolizado de dos horas, se observa que es el de mayor actividad antifúngica al inhibir sin diferencias significativas en las tres concentraciones probadas y además inhibir el crecimiento del patógeno un 35 % más que la quitosana polímero y el hidrolizado de 10 horas a la concentración de 250 mg.L^{-1} , por lo que puede pensarse que presenta una adecuada concentración molar y distribución de pesos molares al respecto.

Este resultado sugiere estudiar la actividad anti-patogénica de hidrolizados de mayores tiempos que 10 horas, tomando en cuenta que los dos hidrolizados presentaron mejores resultados de inhibición que la quitosana polímero.

Inducción de actividad quitinasa en plantas de soya. En la literatura científica ha sido informado que el tratamiento de semillas con quitosana resulta en altos rendimien-

tos en la producción (8). No obstante, aparecen muy pocos estudios relacionados con el efecto que ejerce dicho tratamiento sobre la inducción de marcadores defensivos y resistencia. A continuación se relacionan los resultados obtenidos al tratar semillas de soya variedad Fosca Rim con quitosana nativa y sus hidrolizados de dos y 10 horas durante un tiempo de imbibición de cuatro horas.

En la Figura 4 se muestran los valores de actividad enzimática de quitinasa en extractos de hojas, medida a los 17 días después de tratadas las semillas. Se observa que a medida que se incrementa la hidrólisis es mayor la inducción de actividad quitinolítica, siendo el hidrolizado de 10 horas el más efectivo. Esto apoya la idea de que existen diferencias en el reconocimiento de la molécula señal (quitosana u oligómeros). El mayor tamaño de la molécula de quitosana pudiera constituir un impedimento estérico que evite en cierta forma alcanzar el sitio receptor y por tanto el reconocimiento.

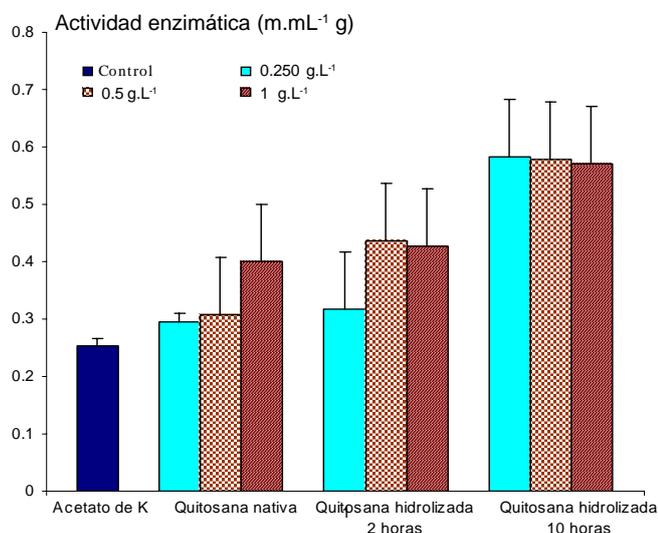


Figura 4. Actividad enzimática de quitinasa en plantas de soya tratadas con quitosana nativa y sus hidrolizados enzimáticos

Al respecto, algunos autores han demostrado que en los bioensayos se necesita un período de acondicionamiento y el empleo, por ejemplo, de abrasivos para lograr tanto inducción de respuestas defensivas (9) como protección (6), con moléculas de quitosana. No obstante, aquellas moléculas grandes que lleguen a la membrana plasmática pudieran interactuar con varios receptores y así potenciar su efecto inductor (9). Otros autores (9) también demostraron que no existían diferencias apreciables en cuanto a la inducción de marcadores moleculares de resistencia, entre quitosanas con GP= 3420 y GA= 22.3 % y un hidrolizado de GP= 26.2 y GA= 22.3 %, a iguales concentraciones, en las condiciones de bioensayo empleadas por ellos; es decir, trabajando con hipocotilos previamente tratados con abrasivos. Resulta obvio destacar que el grado de percepción de estas macromoléculas depende mucho del ensayo biológico que se diseñe y los propósitos del trabajo. En nues-

tro caso, el tratamiento directo de semillas de soya sin un tratamiento previo para facilitar la penetración del polímero de quitosana permitió percibir las diferencias de percepción del polímero y sus hidrolizados por los receptores celulares en la semilla que desatan la respuesta defensiva.

Tomando de conjunto los resultados obtenidos, se puede concluir que la utilización del preparado enzimático Pectinex Ultra SPL para la degradación del polímero de quitosana ofrece la ventaja de una actividad endoquitosanasa marcada que provoca la obtención de fragmentos de quitosana de menor tamaño. Estos a su vez permiten mantener una actividad antifúngica *in vitro* combinada con un incremento en la percepción de las señales que inducen marcadores de resistencia contra patógenos.

Aunque trabajos recientes (13, 19) han demostrado la posibilidad de degradar polímeros de quitosana con enzimas pectinasas, hasta donde se sabe por la literatura consultada, el preparado enzimático Pectinex Ultra SPL no había sido utilizado en la degradación de polímeros de glucosamina parcialmente N-acetilados.

REFERENCIAS

1. Leffler, M. *Chitin Breakdown: The Bacterial Way*, Volume 15, Number 2 • March-April 1997. [Consulta: Marzo del 2002] <<http://www.mdsg.umd.edu/MarineNotes/Mar-Apr97/side1.html>>
2. Cabrerías, G. Estudio del complejo polielectrolito entre la quitosana y el ácido poligalacturónico. [Tesis de Maestría]. Universidad de La Habana, 1998.
3. El Gaouth, A.; Arul, J.; Asselin, A. y Benhamou, N. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycol. Res.*, 1992, vol. 9, p. 769-779.
4. Laflamme, P.; Benhamou, N.; Bussiéres, A. y Dessureault, P. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.*, 1999, vol. 77, p. 1460-1468.
5. Kauss, H.; Jeblick, W.; Domard, A. y Siegrist, J. Partial acetylation of chitosan and a conditioning period are essential for elicitation of H₂O₂ in surface-abraded tissues from various plants. *Advances in Chitin Sciences*, 1997, vol. 2, p. 94-101.
6. Struszczyk, H.; Schanzenbach, D.; Peter, M. G. y Pospieszny, H. Biodegradation of chitosan. En: *Chitin and Chitosan. Polish and Russian monograph. Polish Chitin Society, Serie 1*, 1999, pag. 59-75.
7. Pospieszny, H. Potential use of chitosan in plant protection. En: *Chitin and Chitosan. Polish and Russian monograph. Polish Chitin Society, Serie 1*, 1999, p. 115-130.
8. Freepons, D. Plant growth regulators derived from chitin. US Patent 4964894, 1990.
9. Vander, P.; Varum, K. M.; Domard, A.; El Gueddari, N. E. y Moerschbacher, B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, p. 1353-1359.

10. Pantaleone, D.; Yalpani, M. y Scollar, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.* 1992, vol. 237, p. 325-332.
11. Aiba, S. Preparation of N-Acetyl-oligosaccharides by hydrolysis of chitosan and chitinase followed by N-acetylation. *Carbohydr. Res.*, 1994, vol. 265, p. 323-328.
12. Jeon, Y. y Kim, S. Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polymers*, 2000, vol. 41, p. 133-141.
13. Shin-Yaa, Y.; Lee, M. Y.; Hinode, H. y Kajuchi, T. Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially available and modified pectinases. *Bioch. Engin. Journal*, 2001, vol. 7, p. 85-88.
14. Aiba, S. y Muraki, E. Preparation of higher N-acetylchitoooligosaccharides in high yields. Proceeding of the Third Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Feelung, Taiwan, 1998, p. 89-96.
15. Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Gutiérrez, A. y Rodríguez, T. Metodología de obtención de quitosana a partir de quitina de langosta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 1, p. 81-84.
16. Cabrera, J. C. Obtención de (1→4)-a-D-Oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria cítrica. [Tesis de Doctorado], INCA, UNAH, 1999.
17. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
18. Boudart, G.; Lafitte, C.; Barthe, J. P.; Frasez, D. y Esquerré-Tugayé, M. T. Differential elicitation of defense responses by pectin fragments in bean seedlings. *Planta*, 1998, vol. 206, p. 86-94.
19. Kittur, F. S.; Kumar, V.; Gowda, L. R. y Tharanathan, R. N. Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger*. A non-specific activity. *Carbohydr. Polym.*, 2003, vol. 53, p. 191-196.
20. Roller, S. y Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, vol. 47, p. 67-77.
21. Rhoades, J. y Roller, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *App. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 1, p. 80-86.
22. Park, R.; Kyu-Jong, J.; You-Young, J.; Yu-Lan, J.; Kil-Yong, K.; Jae-Han, S. y Yong-Woong, K. Variation of anti-fungal activities of chitosans on plant pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, p. 84-88.
23. Hadwiger, L. A. y Loschke, D. C. Molecular communication in host-parasite interactions: Hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds in race-specific and other interactions. *Phytopathology*, 1981, vol. 71, p. 756-762.
24. Kendra, D. F. y Hadwiger, L. A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 1984, vol. 8, p. 276-281.

Recibido: 4 de septiembre de 2002

Aceptado: 4 de septiembre de 2003

CURSOS DE POSGRADO

Precio: 250 USD

Producción de hortalizas en condiciones de organopónicos y huertos con bajos insumos

Coordinador: Dr.C. Martín P. Bertolí Herrera

Fecha: a la medida

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu