

EXTRACCIÓN DE PROTOPLASTOS EN *Pleurotus ostreatus* MEDIANTE LISIS ENZIMÁTICA. Baronetti, Guillermo¹

¹Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral.

Director: Cabeza, Matías
Codirectora: Sacripanti Olalla, Paula

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Protoplastos, Enzimas, Hongos.

INTRODUCCION

El cultivo y la comercialización de hongos comestibles, entre ellos las gírgolas, ha crecido rápidamente no sólo con fines alimenticios sino también como fuente de compuestos de interés como vitaminas, fibras y aminoácidos esenciales. También han surgido otros usos novedosos como la producción de antibióticos, enzimas o hasta reemplazo de materiales de packaging.

A través de técnicas como la selección artificial, mutagénesis dirigida, transgénesis o hibridación de protoplastos se puede potenciar los rasgos deseables de algunas cepas seleccionadas. La obtención de protoplastos se realiza eliminando la pared celular con métodos enzimáticos.

OBJETIVOS

- Producir protoplastos de *Pleurotus ostreatus* empleando la enzima comercial VinoTaste de Novozyme.

Título del proyecto: Desarrollo de biocompuestos fibra-polímero basados en hongos agaricomycetes y restos agrícolas de la región centro-norte de Santa Fe.

Instrumento: CAI+D Orientado

Año de la convocatoria: 2021

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Cabeza, Matías

METODOLOGÍA

El objetivo de este estudio es producir protoplastos de *Pleurotus ostreatus* empleando la enzima comercial VinoTaste de Novozyme. Con este fin se adquirió una cepa de "hongo ostra" de un proveedor local y se corroboró la identidad del mismo mediante técnicas moleculares. Para esto se amplificó la secuencia nucleotídica de la región ITS mediante PCR con los cebadores universales ITS1 e ITS4. El producto de la reacción se ligó al vector *pGEM-T Easy* y se utilizó para transformar la cepa de *Escherichia coli* TOP10. Finalmente se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico y se enviaron a secuenciar (MacroGen-Corea). Utilizando la herramienta BLAST del NCBI se observó que las secuencias obtenidas presentaban un 100 % de identidad con *P. ostreatus*.

En el paso siguiente se creció la cepa en medio YPD líquido (figura 1) y posteriormente se utilizó la enzima comercial VinoTaste para digerir las paredes celulares y liberar los protoplastos (figura2). Esta enzima es utilizada industrialmente para la clarificación de vinos ya que posee actividades pectinasa y beta-glucanasa. Se realizaron distintas pruebas variando el tiempo de contacto (1-3 horas), la concentración de enzima (3, 6 y 10 %) y el buffer (PBS ph 7, Citrato ph 5,8). Además, se probaron diferentes medios osmóticos protectores (manitol y sorbitol).

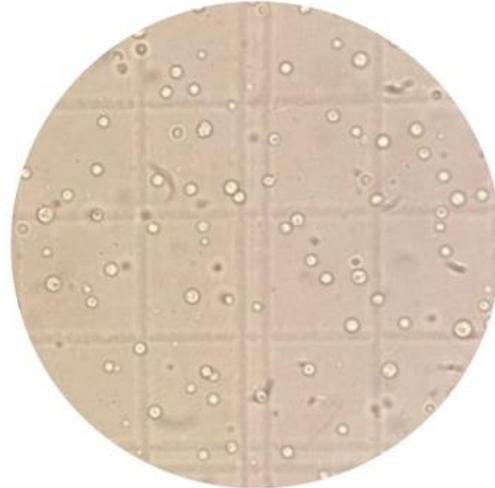


Figura 1: Crecimiento de la cepa en YPD.

Figura 2: Protoplastos al microscopio.

En las mejores condiciones encontradas (3 horas de incubación, 10% enzima, buffer citrato pH 5,8 y manitol como osmoprotector) un gramo en base húmeda de micelio generó 3×10^8 protoplastos totales, al ser contados en cámara de Neubauer (figura3).

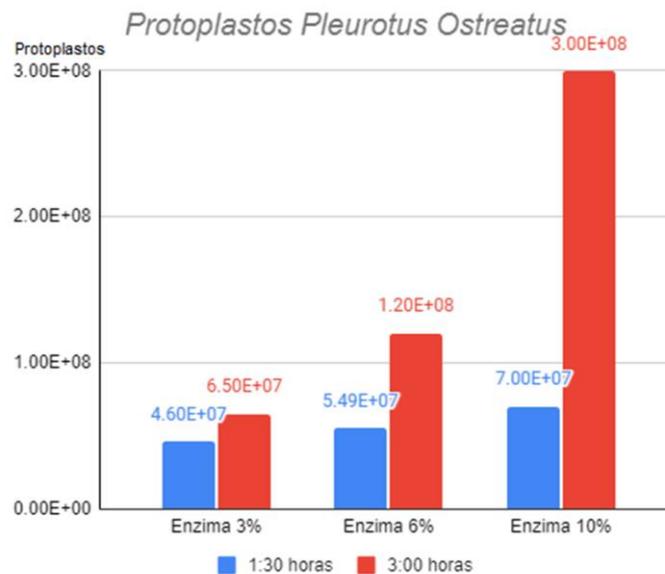


Figura 3: Protoplastos totales según la concentración de enzima en buffer citrato manitol pH 5,8.

CONCLUSIONES

En resumen, hemos logrado optimizar el proceso de obtención de protoplastos en *P. ostreatus* empleando la formulación enzimática comercial (técnica) VINO TASTE. El rendimiento obtenido está dentro del rango reportado previamente, la ventaja significativa radica en que la enzima utilizada en este estudio se encuentra fácilmente disponible y a un precio considerablemente más bajo que otras alternativas de uso habitual.

BIBLIOGRAFÍA

Ohmasa M, Abe Y, Furukawa H, Taniguchi M and Neda H. 1987. Preparation and culture of protoplasts of some Japanese cultivated mushrooms. Bull. For. & For. Prod. Res. Inst. No. 343, 155-170

Wahab AB, Zairun M, Daud K, Bakar F, Bharudin I and Murad A. 2002. Evaluation and improvement of protocols for *Ganoderma boninense* protoplast isolation and regeneration. Malaysian Applied Biology, 51(5), 43–57.

Zhang Q, Zhao L, Shen M, Liu J, Li Y, Xu S, Chen L, Shi G and Ding Z. 2002. Establishment of an efficient polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation system in *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* using comprehensive optimization and multiple endogenous promoters. J. Fungi 2022, 8, 186