

## **BM10. Bioprospección de enzimas activas sobre carbohidratos codificadas en el genoma de *Pycnoporus sanguineus***

Garrido, M. (1,2)\*; Brunecky, R.(3); Landoni, M. (4); Campos, E. (1); Wirth, S. (2).

(1) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA, Argentina. (2) Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada, FCEN-UBA, Argentina. (3) Chemical and Biosciences Center, NREL, USA. (4) Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono, FCEN-UBA, Argentina. \*[garrido.mercedes@inta.gob.ar](mailto:garrido.mercedes@inta.gob.ar)

A medida que aumentan las preocupaciones sobre el cambio climático y la disminución de los suministros de combustibles fósiles, existe una urgencia cada vez mayor de utilizar materias primas de origen vegetal en biorrefinerías. Sin embargo, para lograrlo, es necesario superar las barreras químicas y estructurales de la lignocelulosa que convierten a la biomasa vegetal en una sustancia altamente recalcitrante. Los esquemas de conversión de biomasa a azúcares fermentables se basan en una combinación de pretratamientos químicos seguidos de pasos de hidrólisis enzimática. Entre las principales celulasas utilizadas, se encuentran las celobiohidrolasas de tipo I (CBHI, EC 3.2.1.176), exoglucanasas con alta procesividad que despolimerizan las cadenas de celulosa desde el extremo reductor. El hongo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, es un excelente degradador de la biomasa vegetal, utilizando una amplia diversidad de enzimas. Luego de realizar un análisis exhaustivo de los datos genómicos y secretómicos disponibles para este hongo, se seleccionaron dos CBHI de la familia GH7, *PsCel7A* y *PsCel7B*, para su expresión recombinante y posterior caracterización. Los genes correspondientes fueron sintetizados y clonados en un vector de expresión en *Trichoderma reesei* (*pTrE*no), fusionados a un tracto de seis histidinas en el extremo C-terminal. Las proteínas recombinantes producidas fueron purificadas a partir del sobrenadante de cultivo del hongo recombinante y se determinaron las temperaturas y el pH óptimos para cada una utilizando el sustrato comercial *pNP-β*-lactósido (*pNPL*). La actividad de *PsCel7B* sobre celulosa pretratada con ácido fosfórico (PASC, por sus siglas en inglés) se determinó cuantificando por HPAEC-PAD la celobiosa liberada. Se evaluó además el posible sinergismo de *PsCel7B* con una monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO), previamente caracterizada (*PsAA9A*) que genera nuevos extremos reductores por oxidación de las regiones cristalinas de la celulosa. También se analizó la conversión final a glucosa del rastrojo de maíz pretratado (PCS), por *PsCel7A* y *PsCel7B* en presencia de endo- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas comerciales. Para ambas enzimas CBHI, utilizadas en una concentración final de 28 mg/g de glucano, se observó una conversión de glucanos de aproximadamente un 40% luego de 5 días de incubación, respecto del 6% obtenido en ausencia de las mismas. Estos resultados muestran el

potencial de las CBHI de *P. sanguineus* para su incorporación en el desarrollo futuro de cócteles enzimáticos para la deconstrucción de celulosa.