



---

## **AISLAMIENTO DE CLONES CON ACTIVIDAD ENDO- $\beta$ -1,4-GLUCANASA A PARTIR DE UN SEGMENTO DE ADN DE 13KB DE *Clostridium sp* IBUN22A**

**I. Roncancio-Sánchez, Z. Suárez-Moreno, D. Montoya-Castaño, F. Aristizábal-Gutiérrez**

*Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá*

[iaroncancios@unal.edu.co](mailto:iaroncancios@unal.edu.co), [iaroncancio@unipamplona.edu.co](mailto:iaroncancio@unipamplona.edu.co), [zrsuarezm@unal.edu.co](mailto:zrsuarezm@unal.edu.co),  
[dmontoyac@unal.edu.co](mailto:dmontoyac@unal.edu.co), [faaristizabalg@unal.edu.co](mailto:faaristizabalg@unal.edu.co)

### RESUMEN

La producción de combustibles, solventes y algunos productos químicos a partir de sustratos celulósicos usando microorganismos ofrece una ventaja frente a los de origen fósil. Un acercamiento prometedor ha sido la implementación de ingeniería genética utilizando genes de enzimas involucradas en la degradación de desechos celulósicos. En la última década se han generado bibliotecas genéticas para proveer enzimas celulolíticas, que hagan el proceso más rentable, lo cual permitiría aprovechar mejor residuos celulósicos disponibles. Este trabajo describe el aislamiento de dos fragmentos de ADN que expresan actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, a partir de un segmento ADN de 13Kb (clon 02080-25) aislado de una biblioteca genómica de la cepa nativa *Clostridium sp* IBUN22A. El aislamiento de la región codificadora se realizó a través de pruebas de inducción de la actividad, análisis por restricción del segmento y construcción de una sub-biblioteca con la enzima *Sau3A* I. 325 clones fueron obtenidos, de los cuales 271 tenían inserto. El tamizaje molecular de estos últimos mostró que siete clones presentaron tamaños entre 3500pb y 7000pb y el tamizaje enzimático con carboximetilcelulosa como sustrato permitió el aislamiento de los clones pBSh-37 y pBSh-26 con la actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa original, de tamaños de inserto de 627pb y 879pb respectivamente. Este trabajo es el punto de partida para el aislamiento de enzimas de alto potencial biotecnológico.

**Palabras clave:** Celulasas, endoglucanasas, genes, mapas de restricción, subclonaje.

### ABSTRACT

The use of microorganisms to produce fuel, solvents and some chemicals from cellulose substrates represents an advantage compared to fossil fuel products. Genetic engineering using the genes of enzymes involved in degrading cellulose waste offers a promising approach. In the last decade, efforts have therefore been directed towards generating gene libraries providing such cellulolytic enzymes in order to make the process profitable, thus permitting the efficient use of the copious amounts of cellulose waste available. We describe the isolation of two DNA fragments expressing endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity from a 13kb DNA fragment (clone 02080-25) isolated from a gene library from the native strain, *Clostridium sp* IBUN22A. Activity induction assays were carried out to isolate the coding region. Restriction analysis of the segment led to the construction of a sub-library by digesting the inserted clone with *Sau3A* I. Of the 325 clones obtained, 271 had the insert. Molecular screening of these clones showed that only seven of them had sizes ranging from 500 bp to 4,000 bp, and enzyme screening led to the isolation of clones pBSh-37 and pBSh-26, which had insert sizes of around 627 bp and 879 bp, respectively. These clones retained the original endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity. This work is a starting point for the isolation of enzymes with a high potential in biotechnology.

**Key words:** Cellulase, endoglucanase genes, restriction maps, subcloning, sub library.

## INTRODUCCIÓN

La celulosa es un polímero distribuido ampliamente en la naturaleza; su conversión es uno de los procesos más atractivos debido a su gran potencial como fuente segura y renovable de combustibles (Doi Roy H. *et al.*, 2003). La barrera principal para su explotación ha sido la ausencia de tecnología de bajo costo que permita convertir un compuesto recalcitrante como la celulosa en biomasa disponible. Una estrategia promisoriosa involucra la producción de enzimas celulolíticas, hidrólisis de biomasa y fermentación en una misma vía para generar azúcares o productos deseados por medio de microorganismos celulolíticos individuales o por medio de un consorcio de éstos (Lynd Lee R *et al.*, 2002).

Los clostridios celulolíticos son bacterias anaerobias, esporoformadoras que producen celulasas, ya sea independientemente o en complejos enzimáticos conocidos como “celulosomas” (Bayer *et al.*, 1998). En los últimos años se ha trabajado en el aislamiento y clonación de genes celulolíticos, mediante la construcción de bibliotecas genómicas, en las cuales el ADN cromosomal de *Clostridium* es digerido con *Sau3A I* y recombinado con vectores digeridos en el sitio *BamH I* (Peterson *et al.*, 1991).

Bajo esta perspectiva, se construyó una biblioteca genómica de la cepa nativa colombiana *Clostridium* sp. IBUN22A, proceso que permitió aislar ocho clones con actividad celulolítica contra sustratos celulósicos de diferentes grados de cristalinidad (Vargas *et al.*, 2001). En uno de los clones (02080-25, en adelante pBS-25), se detectó actividad endo  $\beta$ -1,4-glucanasa, y un tamaño de inserto de ~13 kb, el cual es demasiado grande si se considera que los genes reportados en bacterias para esta actividad se hallan en un rango

de 477 a 4000 pb (Bayer *et al.*, 1998, García-Valve *et al.*, 2000), hecho que motivó un estudio más profundo del fragmento. En este trabajo se describe el análisis molecular del inserto del clon pBS-25 mediante la generación de una sub-biblioteca, que permitió determinar el segmento responsable de la actividad endo  $\beta$ -1,4-glucanasa expresada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepa bacteriana y plásmidos:** se usó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  como receptora de los plásmidos 02080-25 (pBS-25) y del vector receptor pBluescript II KS (+/-) phagemid (en adelante pBS) utilizado para el subclonaje. *E. coli* DH5 $\alpha$  y cada uno de sus transformantes se crecieron con agitación 150 rpm a 37°C, en medio Luria Bertani (LB) pH 7.0 y ampicilina (50  $\mu$ g/ml) como sistema de selección (Sambrook *et al.*, 1989) cuando fue necesario.

**Pruebas de inducción:** se emplearon dos estrategias, para determinar indirectamente la localización del segmento codificante de la actividad celulolítica con respecto al operon *Lac*, con miras a establecer si la actividad expresada era o no inducible. En ambas se expuso a las células a cuatro concentraciones diferentes (0.0 mM, 0.1 mM, 0.5 mM y 10.0 mM) de Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en el medio. En el primer ensayo se evaluó indirectamente la expresión diferencial de la proteína recombinante mediante perfiles electroforéticos de SDS/PAGE frente a la expresión basal de las proteínas del microorganismo, y en el segundo se evaluó la expresión de la proteína de interés usando una prueba cualitativa en placa selectiva de la actividad celulolítica de interés (Cornet *et al.*, 1983; Teather and Wood, 1982).

**ADN plasmídico:** se aisló de la cepa receptora por el método de lisis alcalina

(Sambrook *et al.*, 1989). La concentración de ADN se midió a 260/280 nm mediante el equipo SmartSpec300 (TM) BioRad Laboratories®.

**Análisis de restricción del plásmido pBS-25:** para la caracterización por perfil de restricción del fragmento se usaron 19 enzimas de restricción diferentes (Figura 1). Un microgramo de ADN plasmídico fue digerido completamente con 1U de cada enzima de restricción por 12h a 37°C independientemente y luego con mezclas convenientes de éstas. Las enzimas fueron

clasificadas en cuatro subgrupos de acuerdo al número y ubicación de los sitios de corte en el vector pBS: las de corte único en el sitio de múltiple clonaje de acuerdo a su proximidad a las regiones de los promotores T7 y T3 del vector (grupos 1 y 2 respectivamente), las de corte múltiple en el grupo 3 y las de ausencia de corte en el grupo 4. Se visualizaron mediante electroforesis 500 ng de ADN digerido y se usó como marcador de tamaño ADN del fago lambda digerido con *Hind* III en geles de agarosa al 1% p/v, en tampón TBE 0.5X corrido a 3.57 V/cm durante 2 ½ h.

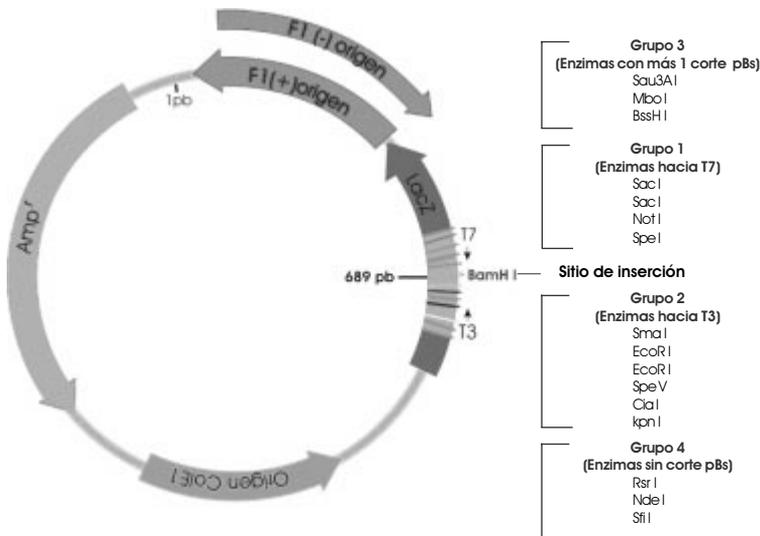


FIGURA 1. Enzimas de restricción usadas y clasificación de acuerdo a la posición de sus sitios de corte en el vector pBS con respecto al sitio de clonación *Bam* HI del inserto de ADN de *Clostridium sp* IBUN22A. La numeración en el pBS-25 se reacomodó utilizando la original del pBS y adicionándole los aproximadamente 13 Kb del inserto a partir del sitio de clonación *Bam*HI

**Adquisición de imágenes y análisis de datos:** los geles se revelaron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con luz UV; las imágenes fueron capturadas y las bandas detectadas mediante el software Quantity One (BIO-RAD®). Se determinó

el tamaño de los fragmentos a través de una curva de calibración del logaritmo del tamaño de los fragmentos del marcador de tamaño en pares de bases (pb), contra el recorrido en centímetros (cm) de cada fragmento e interpolación del recorrido de los

fragmentos originados en las digestiones del plásmido pBS-25, según lo establecido por Sambrook *et al.*, (1989).

**Liberación y aislamiento del inserto:** una vez determinado el perfil de restricción de pBS-25 se eligieron dos enzimas de restricción sin sitio de corte al interior del inserto clonado, permitiendo liberar intacto el fragmento de *Clostridium sp.* IBUN22A (13kb). Se utilizaron 5U de estas enzimas para obtener una digestión completa de aproximadamente 5 µg de pBS-25. Los fragmentos de ADN resultantes fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0% p/v en tampón TBE y el fragmento de mayor tamaño fue electroeluido desde la agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

**Evaluación del tiempo de digestión con Sau3AI.** Quinientos nanogramos del fragmento liberado de *Clostridium sp* IBUN22A (13 Kpb) fueron digeridos parcialmente con 0.5 U de la enzima Sau3A I (Promega) a seis tiempos diferentes (0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 7 minutos). La reacción fue inactivada por choque térmico calentando a 92°C y enfriando inmediatamente a -20°C. Las digestiones fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% p/v en tampón 1.0X TBE corrido a 7,14 V/cm durante 2 horas.

**Construcción de la sub-biblioteca pBS-25:** los fragmentos obtenidos del perfil seleccionado y el vector plasmídico linealizado con *BamH* I (Promega®), se ligaron en una relación 1:1 molar con T4 DNA ligasa a 16°C durante 24 h para obtener plásmidos recombinantes. Células de *E. coli DH5α* fueron transformadas de acuerdo al método de  $\text{CaCl}_2$  (Sambrook *et al.*, 1989). Para tal efecto, a 200 µL de células competentes se adicionaron 100 ng de la ligación vector-digestión seleccionada. Las células transformadas fueron diluidas a 1 mL de caldo LB e incubadas a 37°C con agitación 150 rpm por 1.5 h, luego fueron fraccionadas

en alícuotas de 200 µL para su posterior plaqueo en cajas con LB-Agar-Amp 100 µg/mL, e incubadas 12h a 37°C. Las colonias obtenidas en la sub-biblioteca fueron transferidas una a una a cajas de LB-agar con ampicilina (50 µg/mL) para seleccionar aquellas transformantes con plásmidos recombinantes mediante la estrategia de alfa complementación con IPTG y X-gal descrita por Sambrook *et al.* (1989) y seguidamente fueron eliminados de la sub-biblioteca los clones que presentaron coloración azul.

## SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE CLONES

**Tamizaje enzimático:** los clones recombinantes fueron repicados e incubados a 37°C uno a uno en cajas de LB-Amp-IPTG de manera que cada caja presentara 30 colonias. Posteriormente cada caja fue cubierta con 5 mL de tampón PC (50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12mM ácido cítrico pH 6.3) que contenía 0.5% p/v de agar y 0.5% p/v de sustrato CMC, al final de un período de incubación de 12 horas a 37°C las cajas fueron cubiertas con una solución de rojo congo al 1% durante 15 minutos, y se lavaron con solución de NaCl 1M. Los clones con actividad celulasa se evidenciaron por la visualización de halos de hidrólisis incoloros sobre un fondo rojo (Cornet *et al.*, 1983; Teather and Wood, 1982).

**Tamizaje molecular:** el ADN plasmídico de cada uno de los clones de la sub-biblioteca fue obtenido por electroforesis de agarosa al 1% p/v en TBE a 0.34 V/cm y se discriminaron los plásmidos con tamaños moleculares entre 3.5 Kpb y 7 Kpb.

**Análisis de los clones con actividad:** el ADN plasmídico de los clones con actividad fue digerido con las enzimas *SacI*, *BamHI*, *EcoRV* y *EcoRI* como marcadores de posición y con la mezcla *NotI* y *ClaI* para determinar el tamaño del fragmento clonado, los fragmentos generados fueron

visualizados mediante electrofóresis de agarosa al 1.0% y 1,43 V/cm.

## RESULTADOS

### Pruebas de inducción de la expresión de la actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa en el clon 02080-25

Las pruebas de inducción de la producción de la proteína recombinante a cambios de concentraciones del inductor IPTG, y la evaluación de las muestras mediante electrofóresis SDS-PAGE y en placa con la prueba de rojo congo, pretendían determi-

nar la localización de la región codificante de la actividad endoglucanasa en fase de lectura frente al promotor del operon *lac*. Los resultados no reflejan diferencia alguna en los ensayos entre el perfil electroforético o halos de las proteínas del hospedero transformado, y del hospedero transformado expuesto a concentraciones crecientes de IPTG (Figura 2) hecho que sugiere que la actividad de interés no está regulada directamente por el promotor del operon *lac*, lo que significa que su expresión es basal, al estar codificada en cualquier lugar del inserto del clon pBS-25.

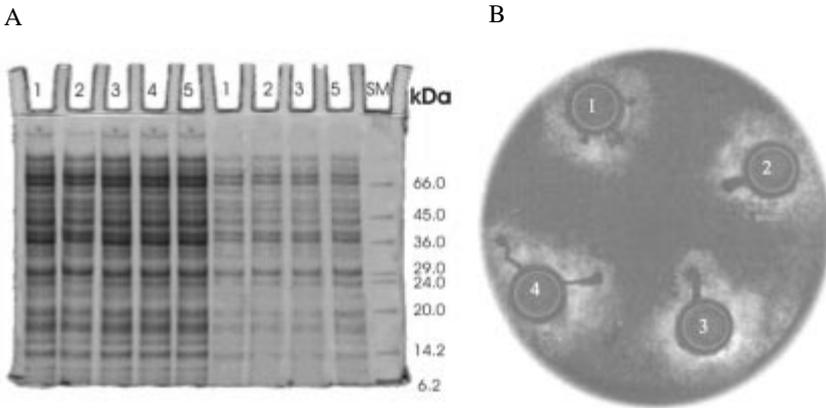


FIGURA 2A. Perfil electroforético en SDS-PAGE para extractos celulares de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBS-25, inducida con diferentes concentraciones de IPTG. Pozos 1, 2, 3, 4 y 5 con concentraciones de 0, 0.1, 0.25, 0.5 y 10.0 mM respectivamente. Nótese que no existe diferencia en la intensidad de ninguna banda con concentraciones crecientes de IPTG. **B.** Prueba de rojo congo en placa para transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con pBS-25 inducidos así: 1. Sin IPTG, 2, 3, 4, con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM, respectivamente. Nótese que no existe diferencia cualitativa de la expresión de la actividad celular.

### Análisis de restricción del pBS-25

El análisis de restricción fue orientado a determinar un perfil de restricción que permitiera subclonar fragmentos del inserto y aislar en alguno la región que codifica la actividad y a su vez caracterizarla. Las restricciones independientes de cada una de

las enzimas mostró que 8 de las 19 enzimas probadas cortaron dentro del inserto a saber: *SacI* y *SacII* del grupo 1; *Hind III*, *EcoRI* y *EcoRV* del grupo 2; *Sau3A I* y *Mbo II* del grupo 3 y *BamH I* de la cual se pensó que reconocería uno de los sitios inserto/vector regenerado en la ligación, hecho que se reevaluó al comparar la digestión de esta

enzima con la mezcla de una de las enzimas del sitio múltiple de clonación en T3 ó T7 que no reconocen sitio de restricción en el inserto *Spe* I y *Cla* I (figura 3A carriles 7 y 14) donde no se detectó la liberación de una banda del tamaño del vector como se observaría si se encontrara flanqueando al-

guno de los extremos del inserto. En ambos casos se originaron bandas de 11860 pb, 3992 pb para la restricción con *Cla* I y de 8972 pb, 6881 pb con *Spe* I, que son debidas a la restricción de *Bam*H I en el interior del inserto aproximadamente en el sitio 9992 pb del pBS-25 (Figura 3).

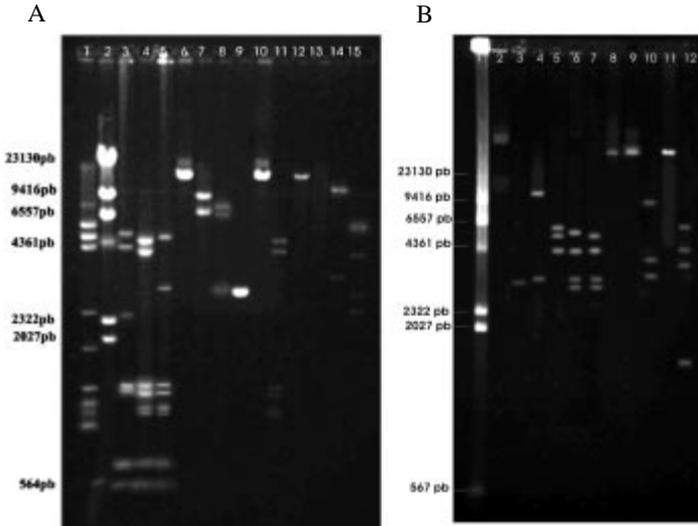


FIGURA 3A. Restricciones Mezcla A Carriles 1.pBS-25/ *Hind* III 2.DNA  $\lambda$  *Hind*III 3.pBS-25/ *Eco*R V 4.pBS/ *Eco*R V / *Eco* I 5.pBS-25/ *Eco*R V / *Eco* I / *Not* I 6.pBS-25/ *Spe* I 7.pBS-25/ *Bam*H I / *Spe* I 8. pBS-25 B/ *Cla*I / *Not* I 9.pBS lineal 10.pBS-25/ *Not* I 12.pBS-25/ *Cla* I 14.pBS-25/ *Cla* I /B 15.pBS-25 *Eco*R I /*Sac*II. **B.** Restricciones Mezcla B Carriles 1. DNA  $\lambda$  /*Hind*III 2. pBS-25 3. pBS lineal 4. pBS-25/ *Sac* I 5. pBS-25/ *Eco*R I 6. pBS-25/ *Eco*R V / *Sac* II 7. pBS-25/ *Eco*R V / *Sac* I 8. pBS-25/ *Cla* I 9. pBS-25/ *Bam*H I 10. pBS-25 / *Sac* I / *Bam*HI 11. pBS-25/ *Spe* I 12. pBS-25/ *Eco*R I / *Bam*H I.

Teniendo como referencia el sitio de restricción de *Bam*H I, se determinaron los sitios de restricción de enzimas con patrones sencillos que a la vez sirvieron para hallar los sitios de corte de enzimas con patrones más complejos. La restricción con la mezcla *Sac*I/*Bam*H I permitió establecer que los sitios de restricción aproximados de *Sac*I se hallaban en 657 pb y 13494 pb en pBS-25. Con esta misma estrategia y mediante la comparación de perfiles, se determinó que los sitios de reconocimiento de *Sac*II

se encuentran a 348pb de los de *Sac*I, lo cual se confirmó con los perfiles obtenidos con *Eco*RV /*Sac*II y *Eco*RV/*Sac*I (Figura 3B, carriles 6 y 7). De lo anterior, se deduce que los sitios de reconocimiento de *Sac*II se encuentran aproximadamente en los sitios 664 pb y 13494 pb. Para localizar los sitios de restricción de la enzima *Eco*RV se compararon las bandas generadas por ésta (5916, 5678 y 4258 pb) y las bandas generadas en la mezcla con *Bam*H I (5678, 4258, 3981 y 1951 pb, figura 4B carril 12), las

cuales permiten apreciar que una de las bandas de mayor tamaño de *EcoRV* es cortada por *BamHI* en dos, indicando que aproximadamente a 1951 pb del sitio *BamHI* se halla un sitio de restricción de *EcoR V*.

Para complementar esta información se compararon las bandas generadas por mezcla de enzimas de restricción *EcoRV* y *Sac I* (5790, 4258, 2957 y 2721 pb) donde se ve la liberación del vector con la aparición de una banda de 2957 pb, lo cual permitió localizar otro sitio de restricción de *EcoRV*, a aproximadamente 2721 pb del sitio original de *SacI* en el sitio múltiple de clonación del pBS. Comparada esta información con las bandas generadas en la mezcla de las tres enzimas (4258, 3839 2957, 2721 y 1829 pb) se determinó que *EcoRV* corta a pBS-25 aproximadamente en los sitios 13636, 8056 y 3461 pb.

Para el análisis del perfil de *EcoRI* se tomaron las bandas que produjo en pBS-25

(5087, 4385, 2533, 1377, 1308, 678 y 533 pb); y se compararon con las generadas en la mezcla de restricción de las enzimas *EcoRV*/*EcoR I* (5087, 4066, 1377, 1308, 1124, 1083, 678 y 567 pb). Como resultado se vio la pérdida de un fragmento en las bandas de mayor tamaño, la desaparición de la banda de 2533 pb y formación de dos bandas 1124 pb y 1083 pb, debidas a la restricción con *EcoRV*. La comparación con la restricción de la mezcla *Not I/EcoR I/EcoRV* (mezcla B, carriles 3, 4 y 5) indicó que la segunda banda de mayor tamaño es la correspondiente al segmento que contiene el vector y cuando se compara con las bandas generadas en la digestión de *EcoRV*, es posible sugerir los siguientes sitios de restricción para *EcoRI* en pBS-25 13628, 9498, 7291, 5914, 5236, 4669 y 3361 pb. Con los resultados de las mezclas y tomando como referencia sitios de restricción conocidos en el vector pBS, se logró construir un esquema de cortes con las enzimas *SacI*, *SacII*, *EcoRV*, *EcoR I* y *BamHI* (Figura 4).

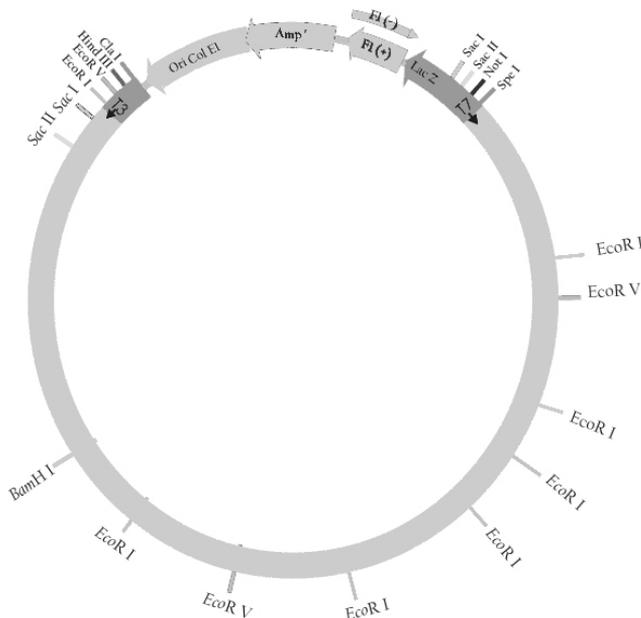


FIGURA 4. Perfil deducido a partir de los análisis de restricción al pBS-25.

Las restricciones con las enzimas *Sau3A I* y *Mbo I* muestran perfiles con un alto número de bandas en la región de tamaños moleculares bajos (por debajo de 2 Kpb), por lo que no fue de interés abordar el análisis de sus posibles sitios de restricción en el inserto, pero sirvieron de partida para abandonar la idea de realizar un subclonaje dirigido ya que las pruebas de inducción con IPTG, mostraron que el marco de lectura correcto no puede ser asegurado con un subclonaje dirigido usando las enzimas del esquema de restricciones del pBS-25, pues en el clon original ésta es completamente incierta. Teóricamente podría ser mejor para el subclonaje emplear una enzima de alta frecuencia de corte en el pBS-25, es decir, abordando una estrategia de subclonaje al azar como la empleada en la construcción de la genoteca de *Clostridium sp* IBUN22A por Vargas *et al.* (2002) usando la enzima *Sau3A I*.

### Construcción de la sub-biblioteca

Por la alta frecuencia de corte de la enzima *Sau3A I* en el vector pBS, para el subclonaje se aisló el inserto del pBS-25, usando las enzimas *Cla I* y *Not I*, cuyas posiciones de corte se encuentran localizadas en el sitio de restricción 670 pb para *Not I* y 13647 pb para *Cla I*, flanqueando al inserto (Figura 4).

Se realizaron pruebas de restricción parciales con la enzima *Sau3A I* sobre el inserto aislado en los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 min y se evaluó el tipo de fragmentos generados. Se determinó que en los tiempos de digestión 2 y 3 min había una mayor proporción de fragmentos entre 1 y 4 Kpb, del tamaño reportado en bacterias para genes de endoglucanasas (García *et al.*, 2000), por lo que se utilizó la mezcla de estas reacciones para realizar el subclonaje (Figura 5 carriles 5 y 6).

100 ng de mezcla de ligación-inserto (mezcla de reacción tiempos 2 y 3 min) y vector

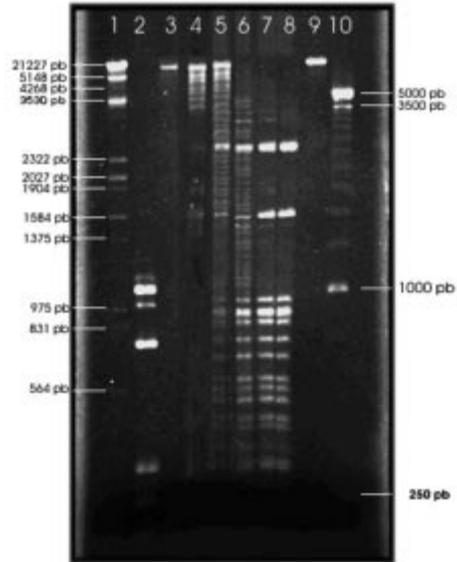


FIGURA 5. Ensayo de digestión parcial con *Sau3A I* del inserto del pBS-25. Carriles 1. ADN I digerido con *HindIII* y *EcoRI* 2. pBS digerido con *Sau3AI* control; Digestión del inserto del pBS-25 a diferentes tiempos 3, 30 seg; 4, 1.0 min; 5, 2.0 min; 6, 3.0 min; 7, 5.0 min; 8, 7.0 min; 9, Inserto; 10, Escalera de 250 pb (INVITROGEN®). Las flechas arriba muestran los productos de reacción usados para la construcción de la sub-biblioteca.

(linealizado con *BamHI*) en proporción molar 1:1 fueron usados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  preparadas por el método de CaCl<sub>2</sub> (Sambrook *et al.*, 1989), obteniéndose una sub-biblioteca con 325 clones, de los cuales se excluyeron 53 clones por dar positiva las pruebas de alfa complementación, para terminar con 271 colonias de transformantes reales.

### Tamizaje molecular y enzimático de la sub-biblioteca

Se repicaron uno a uno los 271 clones recombinantes en grupos de 30 colonias por caja; y se determinó cuáles colonias presentaban actividad de interés mediante

la prueba de rojo congo con la presencia de halo de hidrólisis en la mayoría de las colonias de la sub-biblioteca (~113), por lo cual se hizo necesario tamizar la sub-biblioteca de acuerdo al tamaño de los insertos, mediante la selección de clones de tamaño de inserto, entre 1 y 5 Kpb.

Se aislaron los plásmidos de 271 clones por lisis alcalina, y se observó que 151 clones tenían tamaños muy cercanos al pBS, equivalentes a los plásmidos que clonaron fragmentos muy pequeños por debajo de 300 pb que se descartaron pues no eran de interés. 113 recombinantes presentaron tamaños muy cercanos al pBS-25 original, lo cual explica por qué gran parte de la sub-biblioteca presentaba actividad. Estos clones se descartaron y finalmente quedaron únicamente 7 clones (10, 26, 37, 35, 17, 22, 62) (véase Figura 6) que presentaron tamaños entre 4.5 – 3 Kpb. Usando *E. coli* XL1-Blue se retransformó con los 7 plásmidos aislados y se verificó la actividad de cada uno de ellos (véase Figura 7).

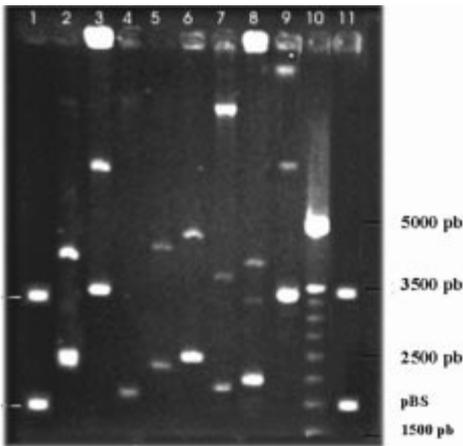


FIGURA 6. Clones aislados en el tamizaje molecular. 1. pBS 2. pBS 71 control 3. Clon pBS10. 4. Clon pBS17 5. Clon pBS26 6. Clon pBS35 7. Clon pBS37 8. Clon pBS22. 9. Clon pBS62 10. Ladder de 250pb (INVITROGEN®) 11. pBS.



FIGURA 7. Prueba de Actividad CMCasa por el método rojo congo contrastado con solución de HCl 1.0 M; clones seleccionados de la sub-biblioteca por su tamaño pBS26 y pBS37(+) control positivo. Nótese que los halos de los clones de la sub-biblioteca y el pBS-25 no son cualitativamente diferentes.

Durante la prueba de rojo congo sólo presentaron halos de actividad los clones pBS37 y pBS26, por lo que se eliminaron los clones sin hidrólisis y se prosiguió con el análisis de restricción de los clones con actividad.

Usando el recorrido de los fragmentos de los patrones moleculares se estimó el tamaño aproximado del fragmento liberado por la restricción con las enzimas *Not I* y *Cla I*; para el plásmido pBS37 alrededor de 657 pb y para el pBS26 cerca de 891 pb. Los resultados sugieren que ninguna de las enzimas usadas como marcadores de posición reconoce el fragmento, hecho que impide determinar su posición en el plásmido pBS-25 original (Figura 8).

## DISCUSIÓN

Hasta la fecha, cerca de 5548 genes de celulasas tanto celulosomales como libres

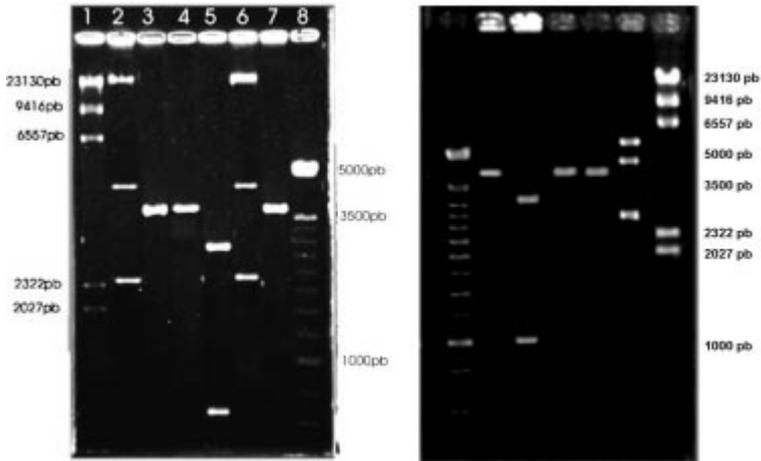


FIGURA 8. Análisis por restricción de los clones que presentaron actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa: restricción del pBSH-37 (A) carriles 4, 6 y 7 y restricción del pBSH-26 (B) carriles 4, 6 y 5. Nótese que ninguna de las enzimas de restricción usadas selectivamente *Sac* I, *Bam* HI y *Eco*R V, están reconociendo sitio de restricción dentro de los insertos.

han sido reportados en bases de datos públicas y han sido clasificadas de acuerdo a su secuencia en 89 familias, distribuidas a su vez en 13 clanes diferentes, reflejando la multifuncionalidad y eficiencia de los procesos evolutivos que han dotado a bacterias del género *Clostridium* y de otros géneros con mecanismos que permiten a la célula obtener energía desde sustratos abundantes pero intrínsecamente recalcitrantes como la celulosa (García-Valve *et al.*, 2000). Actualmente la investigación en este campo ha sido dirigida a comprender la organización genética de los genes de celulasas, así como información concerniente al número de genes, regulación transcripcional, expresión coordinada y relación evolutiva de éstos, utilizando procedimientos convencionales como construcción de genotecas, subclonaje, mapeo, secuenciación, mutagénesis de sitio dirigido, hibridación y perfiles de transcripción (Schwarz, 2001, Zappe *et al.*, 1986).

Durante el desarrollo de este trabajo se generó un mapa de restricción para el inserto

del plásmido pBS-25 con el ánimo de determinar qué región era responsable de la actividad celulolítica que éste exhibe. El tamaño de los segmentos aislados se encuentran dentro del rango reportado para genes de endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, permitiendo establecer la región que codifica los elementos necesarios (sitio catalítico) para llevar a cabo la hidrólisis de sustrato (CMC), y determinar como único marco de lectura a cada segmento aislado. Éstos coinciden con los tamaños reportados para núcleos catalíticos de celulasas (250-300 residuos). Estudios de delección de genes de glicosil hidrolasas y truncamiento proteolítico de éstas, han mostrado que los núcleos catalíticos pueden actuar independientemente de la presencia de módulos accesorios (Beguin P., 1990).

En el género *Clostridium* los genes de celulasas se han encontrado distribuidos al azar en termófilos (*C. thermocellum*) o agrupadas en el genoma de especies mesófilas (*C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*) (Lynd Lee R *et al.*, 2002).

Los resultados arrojados en los análisis de restricción con los marcadores de posición de los insertos aislados (657 y 891pb), parecen estar mostrando que estos segmentos pertenecen a la misma región. Es de notar que inicialmente se estimó que no había muchas enzimas que reconocieran sitio de restricción en el inserto de pBS-25. Este hecho puede sugerir que los genes están agrupados si se tiene en cuenta que estos fragmentos son similares a bandas presentes en la restricción total de fragmento del pBS-25 con Sau3A I, asumiéndolas como dos regiones independientes del inserto, lo que es consistente con lo reportado hasta la fecha para las bacterias mesófilas (Schwarz WH., 2001). Aunque esta suposición no se respalda al comparar la actividad del clon original pBS-25, y la de los clones pBSh-26 y pBSh-37 (cualitativamente indistinguible) sí refuerza la idea de que son el mismo fragmento clonado, y que originalmente el inserto del pBS-25, no contenía una organización ordenada y regular de varios segmentos que codificaran la actividad celulolítica.

Los insertos de los clones seleccionados son pequeños, si se tiene en cuenta que la actividad codificada por éstos no es inducible, ni en el clon original, ni en los insertos finales; a pesar de que la actividad es expresada basalmente, es suficiente para ser detectada por una técnica cualitativa, lo cual hace muy interesante las secuencias de los fragmentos para estudios de ingeniería genética, ya que con tan pocos elementos estructurales hay una hidrólisis apreciable del sustrato a una concentración baja de enzima, constituyéndose en una posibilidad eficiente de hidrólisis de celulosa bajo condiciones óptimas.

En cuanto a la organización genética, los datos obtenidos no permiten llegar a conclusiones. Sólo un análisis de la secuencia de los segmentos podrá validar alguno de estos argumentos, permitiendo un análisis

más detallado del fragmento y la búsqueda de regiones accesorias como *Dockerin* (o regiones de andamiaje) que permitan predecir si se está ante la presencia de una agrupación de genes celulolíticos o sólo ante una unidad catalítica del celulosoma o una enzima libre.

## CONCLUSIONES

A partir de esta sub-biblioteca construida con el inserto del clon pBS-25, se aislaron 2 clones pBSh-26, pBSh-37 con tamaños apreciablemente pequeños de inserto de aproximadamente 657 y 890 pb, respectivamente, que presentaron actividad endoglucanasa y, aunque los análisis de restricción con ellos fueron insuficientes para determinar la existencia de un posible cluster de genes de actividad celulolítica en el inserto del plásmido pBS-25, sí permitieron una caracterización rápida de éstos. La secuenciación y el posterior análisis computacional de las secuencias contribuirán a determinar los genes responsables de la actividad, así como a predecir la secuencia de las proteínas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado dentro del marco del proyecto “*Anaerobic Solvent Producing Bacteria: fermentation of biomass and isolation of cellulolytic strains*” financiado por el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS) y la Universidad Nacional.

## LITERATURA CITADA

- BAYER, E.; SHIMON, L.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. 1998. Cellulosomes—Structure and ultrastructure. *Journal of Structural Biology* 124: 221-234.
- BÉGUIN, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Reviews Microbiology* 44: 219-248.

- CARY, J.; PETERSEN D.; PAPOUTSAKIS, E.; BENETT, G. 1990. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *E. coli*; *Journal of Bacteriology* 170: 4616-4618.
- CORNET, P.; MILLET, J.; BÉGUIN, P.; AUBERT J.P. 1983. Characterization of two *cel* genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases. *Biotechnology* 1: 589-594.
- DOI-ROY, H.; HAN-SUNG, O.; YUKAWA, H.; MASAYUKI, I. 2003. Transcription of *Clostridium cellulovorans* cellulosomal cellulase and hemicellulase genes. *Journal of Bacteriology* 185: 2520-2527.
- GARCIA-VALVE, J.; ROMEU, A.; PALAU, J. 2000. Horizontal transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 352-361.
- LYND LEE, R., WEIMER, P.J.; VAN ZYL W.H.; PRETORIUS I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 506-577.
- MONTOYA, D.; ARÉVALO, C.; ARISTIZÁBAL F., SCHWARZ W.H. 2001. New solvent-producing *Clostridium sp.* strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharide, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 329-335.
- MONTOYA, D.; SPITIA, S.; SILVA, E.; SCHWARZ, W.H. 2000. Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology* 79: 117-126.
- PETERSON, D.; WELCH, R.; FEDERICK, R.; BENETT, G. 1991. Molecular cloning of an alcohol (butanol) deshydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* 173 (5): 1831-1834.
- SCHWARZ., W.H. The cellulose degradation by anaerobic bacteria. 2001. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25: 1-34.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Segunda edición. New York USA, 1989.
- TEATHER, M.; WOOD, P.J. 1982. Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 43; 4: 777-780.
- VARGAS, L.C.; MONTOYA, D.; ARISTIZÁBAL, F. 2002. Clonación y expresión en *E. coli* de genes de celulasas de *Clostridium sp* IBUN22A. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4 (1): 29-35.
- VERHASSELT, P.; POCELET, P.; VITS, K.; VAN GOOL, A.; VANDERLEYDEN J. 1989. Cloning and expression of a *Clostridium acetobutylicum* a-amylase gene in *E. coli*. *Journal of General Microbiology* 132: 1367-1372.
- ZAPPE, H.; JONES, D.T.; WOODS, D.R. 1986. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* endoglucanase, cellobiase and aminoacid biosynthesis genes in *E. coli*. *Journal General Microbiology* 132: 1367-1372.

Recibido: 13.06.2005

Aprobado: 14.03.2006