

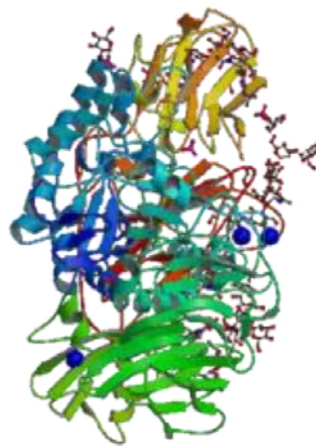
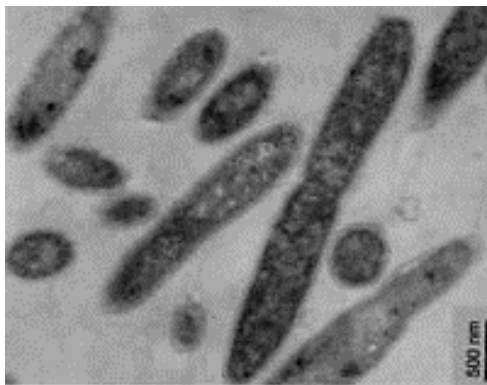
Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Búsqueda de enzimas de interés en una metagenoteca de aguas termales. Beta-galactosidasas.

Procura de enzimas de interese nunha metaxenoteca de augas termais. Beta-galactosidasas.

Search for enzymes of interest in a library of metagenomics of hot spring. Beta-galactosidasas.



Natalí García Marnotes

Junio, 2016



FACULTADE DE CIENCIAS

TRABALLO FIN DE GRAO

Dna M^a Eugenia de Castro de Antonio e Dna M^a Esther Rodríguez Belmonte autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao "*Búsqueda de enzimas de interés en una metagenoteca de aguas termales. Beta-Galactosidasas*" presentado por Natalí García Marnotes para a súa defensa ante o tribunal calificador.

En A Coruña, a 21 de Junio de 2016

Asdo,: M^a Eugenia de Castro Antonio

Asdo,: M^a Esther Rodríguez Belmonte

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	2
1 INTRODUCCIÓN	3
2 OBJETIVOS	5
3 MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 Crecimiento en diferentes aguas	5
3.1.1 Material biológico y medios de cultivo	5
3.1.2 Cuantificación de crecimiento	6
3.1.3 Medidas de pH	6
3.1.4 Análisis estadístico	6
3.2 Transformación a <i>T. thermophilus</i> y búsqueda de actividad β-galactosidasa	6
3.2.1 Material biológico y medios de cultivo	6
3.2.2 Extracción del ADN	7
3.2.3 Cuantificación del ADN	8
3.2.4 Extracción del fósido	8
3.2.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	8
3.2.6 Transformación en <i>T. thermophilus</i> MD158	8
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1 Ensayo de crecimiento de <i>T. thermophilus</i> HB27 en diferentes aguas	8
4.2 Extracción del ADN plasmídico	11
4.3 Optimización del proceso de transformación de <i>T. thermophilus</i> MD158	12
4.4 Búsqueda de actividad β-galactosidasa	13
5 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	16
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
7 ANEXO I: ABREVIATURAS	20

RESUMEN

La obtención de β -galactosidasas a partir de metagenotecas de aguas termales, es de especial interés debido a que conservan su actividad a altas temperaturas y son más resistentes que sus homólogas mesófilas, permitiendo llevar a cabo la hidrólisis de la lactosa en diversos procesos de la industria alimentaria. *T. thermophilus* MD158 es una cepa mutante que no posee los genes que codifican β -galactosidasas y carece de pigmentación, por tanto, se trata de un sistema ideal para identificar las colonias transformadas que incorporaron los genes que codifican para β -galactosidasas; capaces de hidrolizar el sustrato X-Gal proporcionando coloración azul. *T. thermophilus* requiere una composición mineral característica para su crecimiento y eficiencia enzimática. La actividad de sus enzimas disminuye incluso con aguas minerales suplementadas con iones. En el presente estudio se ha extraído el ADN de una librería metagenómica de aguas termales del Río Caldo para la transformación y búsqueda funcional de actividad β -galactosidasa en *T. thermophilus* MD158. Asimismo, se han estudiado las diferencias de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 en diversas aguas. Los resultados obtenidos en el crecimiento de *T. thermophilus* indican que el pH es el factor más influyente, así como la composición mineral no es significativamente importante. En la extracción de ADN de la librería metagenómica se obtuvieron eficiencias muy elevadas con unas concentraciones que abarcan desde los 10 a los 6000 ng/ μ L. Asimismo, los resultados obtenidos de la transformación y búsqueda de actividad β -galactosidasa ponen de manifiesto la necesidad de utilizar otro huésped y el requerimiento de un método de doble selección para optimizar el método y poder aislar adecuadamente los candidatos positivos.

Palabras clave: β -galactosidasas, metagenoteca, *T. thermophilus*, pH.

SUMMARY

Obtaining β -galactosidases from hot spring metagenomic libraries, is of special interest because they retain their activity at high temperatures and they are more resistant than their mesophilic counterparts, allowing to perform the hydrolysis of lactose in different food industry processes. *T. thermophilus* MD158 is a mutant strain which lacks the genes encoding β -galactosidase and pigmentation, therefore it is ideal to identify the transformed colonies that have incorporated genes that codify β -galactosidase; which are able to hydrolyze the substrate X-Gal providing blue colour. *T. thermophilus* requires a characteristic mineral composition for growth and enzyme efficiency. The activity of its enzymes decreases even in mineral water supplemented with ions. In the present study, the DNA from a metagenomic library of Río Caldo hot spring has been extracted for the further transformation and functional β -galactosidase search activity in *T. thermophilus* MD158. The differences in growth of *T. thermophilus* HB27 in different waters have also been studied. The results in the growth of *T. thermophilus* indicate that pH is the most influential factor as well as the mineral composition is not significantly important. In the DNA extraction of the metagenomic library very high efficiencies were obtained, with concentrations ranging from 10-6000 ng/ μ L. Also, the results of the transformation and the β -galactosidase activity search demonstrate the need for another guest and that it would require a double selection method to optimize the method and to properly isolate the positive candidates.

Keywords: β -galactosidases, metagenomic library, *T. thermophilus*, pH.

1. INTRODUCCIÓN

Más del 99% de los procariotas presentes en el entorno no pueden crecer en condiciones de laboratorio, lo que ha hecho que se ignore su existencia durante muchos años, dificultando la comprensión de su fisiología, su genética y, en general, la ecología microbiana de estos microorganismos. La metagenómica surge como herramienta ante este problema (Hugenholtz y Tyson, 2008).

La metagenómica es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de las muestras de un ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar dichas especies (Handelsman *et al.*, 1998). Esta aproximación no sólo hace posible saber qué microorganismos están presentes en dicho hábitat o ambiente, sino que también puede responder a cuestiones ecológicas clave, permitiendo conocer qué funciones desempeñan esos microorganismos dentro de la comunidad de estudio (Schmeisser *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de enfoque en metagenómica; la de secuenciación, cuyo objetivo es secuenciar el ADN extraído, para después poder buscar linajes evolutivos, transcripción de proteínas, etc; y la funcional, basada en la búsqueda de una función mediante la expresión del material genético en vectores de clonación y la detección de su actividad. Es decir, “es el estudio del genoma colectivo de una comunidad microbiana mediante su expresión en un huésped” (Ekkers *et al.*, 2012) (Figura 1).

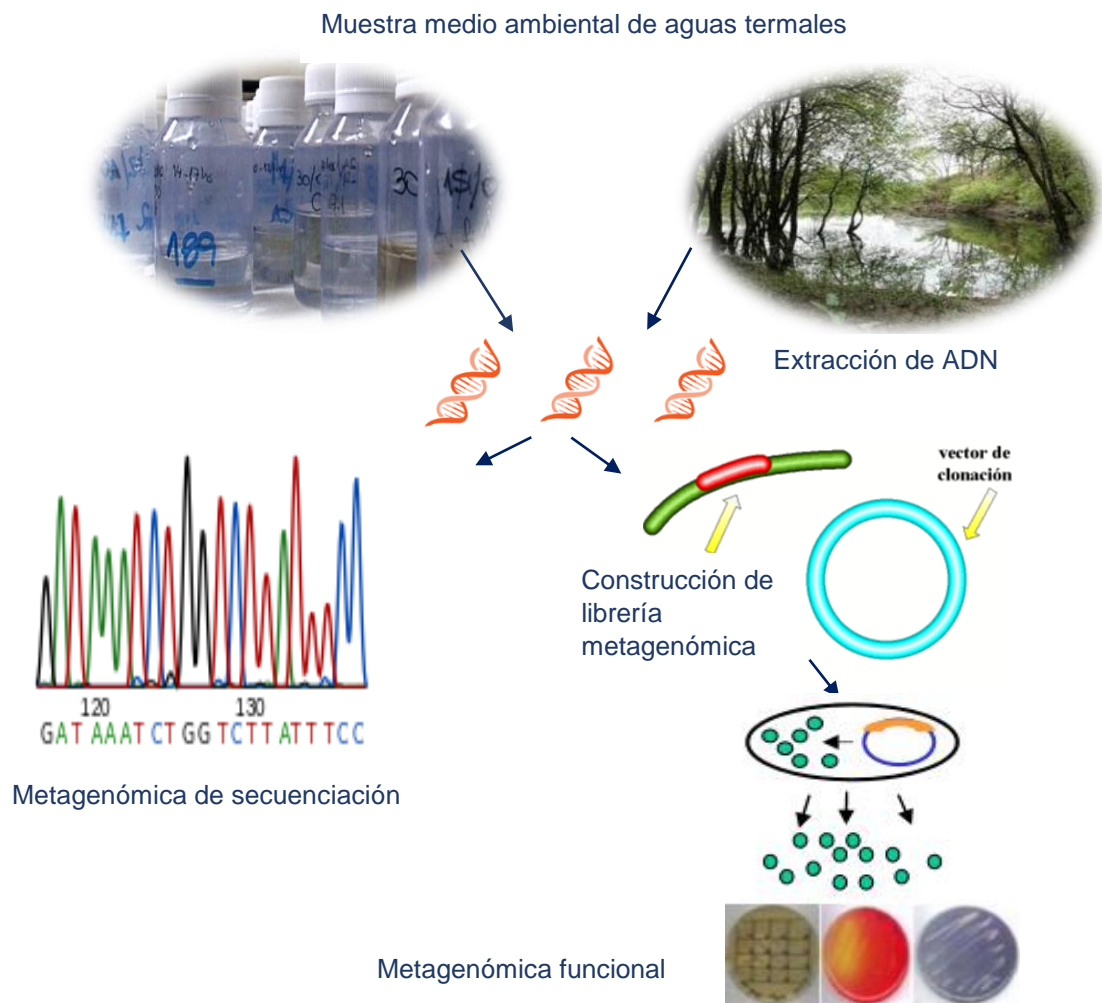


Figura 1. Esquema del proceso que se lleva a cabo en metagenómica funcional y de secuenciación

Se han construido librerías metagenómicas de un amplio rango de ambientes para poder acceder al potencial genético de los microorganismos presentes, dando lugar a estudios de suelos (Jiang *et al.*, 2011; Zhang, X *et al.*, 2012), ambientes marinos (Venter *et al.*, 2004) y de especial interés son los ambientes extremos, como el Ártico (Jeon *et al.*, 2009), hielo de glaciales y aguas termales (López-López *et al.*, 2015; Rhee *et al.*, 2005), que proporcionan una herramienta de acceso a los microorganismos extremófilos y a sus mecanismos enzimáticos especialmente adaptados a dichos ambientes.

El interés de obtener enzimas a partir de metagenotecas de aguas termales, reside en que proceden de microorganismos termófilos. Las enzimas termófilas conservan su actividad a altas temperaturas y son más resistentes que sus homólogas mesófilas, tanto a cambios de pH, como detergentes, metabolitos tóxicos o corrosivos, haciéndolas idóneas para aplicaciones industriales. Se ha demostrado que las β -galactosidasas termófilas son capaces de soportar un rango de pH de 4.3 a 6.6 y que tienen una alta termoestabilidad (Frock and Kelly, 2013; Sinowieky *et al.*, 2006).

Las β -galactosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. El β -galactósido más común es la lactosa, un disacárido formado por galactosa y glucosa. Las β -galactosidasas mesófilas han sido extensamente comercializadas por hidrolizar la lactosa a galactosa y glucosa, sin embargo presentan limitaciones como su temperatura óptima por debajo de los 58°C, una baja estabilidad a altas temperaturas (65°C-85°C), y su inhibición por los productos de la reacción. Esto hace que los avances en biotecnología estén asociados a la identificación de nuevas β -galactosidasas que no presenten dichos problemas (Erich *et al.*, 2015) o a la manipulación génica que permita la expresión de proteínas con propiedades mejoradas para su uso industrial (Pereira *et al.*, 2006).

La mayoría de estudios de metagenómica funcional utiliza como huéspedes microorganismos mesófilos. La bacteria *Escherichia coli* es idónea para la expresión heteróloga del ADN por su versatilidad genética y otros factores. Sin embargo, también es limitante para la expresión de algún tipo de proteína que requiera de ciertos factores metabólicos, genéticos o ambientales, como altas temperaturas. Por eso la necesidad de buscar otro tipo de huéspedes (Erich *et al.*, 2015; Schröder *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2000).

Thermus thermophilus es una bacteria aerobia heterótrofa Gram-negativa con una temperatura óptima de crecimiento por encima de 75°C. Proporciona así un sistema de experimentación ideal por su propiedad natural de transformación, especialmente eficaz en la cepa HB27 (Carr *et al.*, 2015; Henne *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 1986). *T. thermophilus* MD158 es una cepa mutante que no posee los genes que codifican algunas hidrolasas, incluyendo dos β -galactosidasas, dos α -galactosidasas y una β -glucosidasa, por lo tanto es un sistema ideal para la búsqueda funcional de β -galactosidasas a partir de metagenotecas. Además, esta cepa carece de la ruta de síntesis de pigmentos carotenoides (Carr *et al.*, 2015), lo que facilita el aislamiento de colonias transformadas que inserten y expresen genes que codifican hidrolasas. Esto es debido a que el sistema utilizado para la identificación de dichas colonias se basa en la capacidad que tienen las β -galactosidasas de hidrolizar el sustrato X-Gal, proporcionando una pigmentación azul, que podría ser enmascarado por los carotenoides sintetizados por la cepa silvestre visualizando una coloración verde-azulada cuando los niveles de expresión y/o de actividad de estos enzimas es bajo en las condiciones utilizadas.

T. thermophilus requiere una composición mineral característica para su crecimiento y eficiencia enzimática. La actividad de sus enzimas disminuye incluso con aguas minerales suplementadas con iones (Fuciños *et al.*, 2008). En consecuencia se emplean

Búsqueda de enzimas de interés en una metagenoteca de aguas termales

medios de cultivo con una alta concentración de carbonatos y composición mineral similar a aguas termales (Angelov *et al.*, 2009).

En el presente estudio se ha utilizado una librería metagenómica de aguas termales del Río Caldo, Ourense (Galicia) (Figura 2), proporcionada por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC; para transformar la cepa de *T. thermophilus* MD158 y realizar una búsqueda de actividad β -galactosidasa. Asimismo, con el objetivo de optimizar la transformación, se han estudiado las diferencias de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 en diversas aguas.

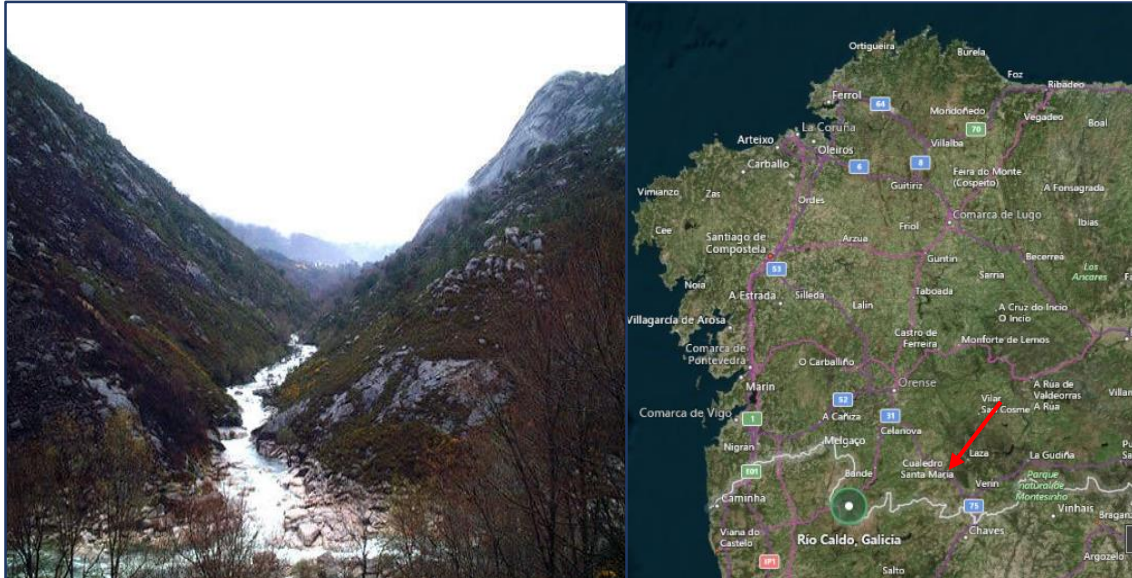


Figura 2. Fotografía del valle de Río Caldo y localización en el mapa. Tomado de: <http://guias.masmar.net/R%C3%ADos-y-Lagos/Galicia/R%C3%ADo-Caldo-Ourense/Valle-del-r%C3%ADo-Caldo>

2. OBJETIVOS

- 1) Estudio de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 en diferentes aguas comerciales y en aguas termales (As Burgas)
- 2) Extracción del ADN plasmídico de la librería metagenómica construida por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC
- 3) Optimización del proceso de transformación de *T. thermophilus* MD158 con el ADN metagenómico
- 4) Búsqueda de actividad β -galactosidasa en *T. thermophilus* MD158 transformado

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Crecimiento en diferentes aguas

3.1.1 Material biológico y medios de cultivo

T. thermophilus HB27 se ha crecido en el medio TB (Thermus Broth) (Tabla 1), con agua destilada, agua de las Burgas, y aguas comerciales: Evián, Lanjarón, Mondariz, Fontecelta, Sierra Cazorla, Fuente Primavera y Nestlé Aquarel; a 70°C con agitación (150 rpm) durante 24 h.

Tabla 1. Composición del medio Thermus Broth (TB)

Bactotripton	1,0%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%

3.1.2 Medidas de pH

La medición del pH se realiza en un pH-metro (Crison), determinando el pH de las botellas de agua comerciales y el agua de las Burgas.

3.1.3 Cuantificación de crecimiento

El análisis de crecimiento se realiza en un espectrofotómetro (Biospectrometer de Eppendorf) con la cuantificación de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}).

3.1.4 Análisis estadístico

Para asegurar que no existen diferencias de crecimiento entre aguas se lleva a cabo un análisis de la varianza multifactorial con el programa IBM SPSS Statistics 24, utilizando un nivel de significación $\alpha=0,05$.

3.2. Transformación a *T. thermophilus* y búsqueda de actividad β -galactosidasa

3.2.1 Material biológico y medios de cultivo

T. thermophilus MD 158 se incubó en medio TB con agua de As Burgas suplementado con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-Gal (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabla 2). Este medio permite la selección de los clones transformados con el vector de clonación y la detección de aquellos que presenten actividad β -galactosidasa. Se incubó a 65°C en atmósfera húmeda 48 h.

Tabla 2. Composición del medio TB suplementado con kanamicina, IPTG y X-Gal

Bactotripton	1,0%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%
Kanamicina	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
IPTG	24 $\mu\text{g}/\text{mL}$
X-Gal	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

El vector de clonación empleado es el fósido pCT3FK (Figura 3) (Angelov *et al.*, 2009), derivado del pCC1FOS. Permite insertos de ADN de gran tamaño (hasta 40 kb aproximadamente), posee dos regiones homólogas de *T. thermophilus* HB27 donde se integra y genes que codifican para la resistencia al antibiótico kanamicina. Además, se trata de un vector lanzadera que posibilita la expresión tanto en *E. coli* como en *T. thermophilus*.

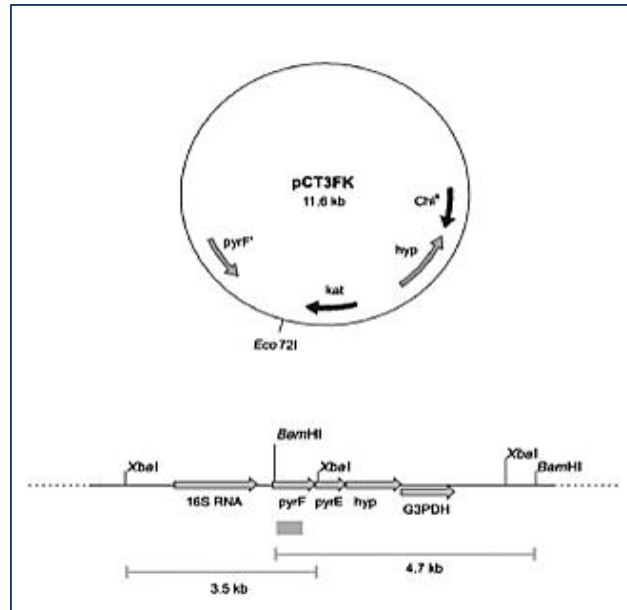


Figura 3. Construcción del fósforo pCT3FK. Tomado de Angelov *et al.*, 2009

3.2.2 Extracción del ADN

La metagenoteca facilitada por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC, está construida a partir de la recogida del material biológico presente en el agua del Río Caldo filtrada con un tamaño de poro de 0.22 μm . El ADN se escinde en fragmentos que se integran en el fósforo pCT3FK (Angelov *et al.*, 2009) para transfectarlos en *E. coli* EPI300 T1R y sembrarlos en medio sólido LBC. La metagenoteca estaba conservada a -80°C en una placa de 96 pocillos, correspondiendo cada pocillo a una placa de medio sólido con aproximadamente 1000 clones.

Las minipreps se realizan mediante el método de lisis alcalina (Tabla 3). Para ello, se inoculan 10 μL de células de cada pocillo en 200 μL de LB suplementado con 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol. A continuación, 1 μL del pre-inóculo se crece en tubos Falcon estériles con 5 mL de LB suplementado con 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol y solución de inducción o arabinosa al 0.02%.

Tabla 3. Composición de las soluciones para la extracción de ADN por el método de lisis alcalina

SOLUCIÓN 1	SOLUCIÓN 2	SOLUCIÓN 3
50 mM glucosa	0.2 N NaOH	Acetato potásico, pH 4.8
10 mM EDTA	SDS 1%	(3M de potasio-5M de acético)
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)		

Tras centrifugar las células a 5000 rpm, el inóculo se somete a la acción de 150 μL de solución 1 (previamente enfriada en hielo) que resuspende las células. Posteriormente, se añade 200 μL de solución 2, lo cual produce la lisis celular. Al añadir 300 μL de solución 3, se detiene la lisis. La precipitación del ADN se consigue mediante el uso de 1 mL de etanol al 95 % frío. La purificación se realiza con 1 mL de etanol al 70% frío y se eluye con 50 μL de agua destilada autoclavada.

3.2.3 Cuantificación del ADN

El ADN plasmídico se cuantifica mediante el análisis de absorbancia de las muestras a 260 nm en espectrofotómetro (Biospectrometer de Eppendorf).

3.2.4 Extracción del fósido

La extracción del fósido pCC1FOS vacío se realizó mediante uso del kit comercial Thermo Scientific, GeneJET Plasmid Minipreps Kit.

3.2.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

El ADN extraído en las minipreps de la librería se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,6% (p/V) en tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM) de las muestras A5, C1, C5, G8, F9 y E10, lo que permite la separación de los diferentes tamaños moleculares (Sambrook *et al.* 1989). Se emplea como referencia un marcador de tamaños de peso molecular y se usa GelGreen (Biotium) como compuesto fluorescente. La electroforesis se lleva a cabo a 65 V durante 45 min y su visualización se realiza mediante el uso de un transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad).

3.2.6 Transformación en *T. thermophilus* MD158

Se lleva a cabo siguiendo el método propuesto por Angelov *et al.*, 2009, con leves modificaciones. Brevemente; *T. thermophilus* MD158 se crece a 70°C en 500 mL de TB hasta que alcanza una DO₆₀₀ 0.8 para comenzar la transformación. A continuación, se añaden 5 µL del ADN extraído a 2 mL del cultivo para cada pocillo. Se mantiene en agitación (250 rpm) a 70°C durante 3-4 h. Finalmente se siembran 100 µL de cada tubo en medio sólido TB suplementado con kanamicina (30µg/mL), IPTG (24µg/mL) y X-Gal (20µg/mL) (Tabla 2). Las placas se dejan a 65°C en atmósfera húmeda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 en diferentes aguas

La respuesta de *T. thermophilus* HB27 a diversas condiciones de crecimiento es objeto de estudio ya que se encuentra naturalmente en aguas termales con alta concentración de sales, lo cual supone una base ecológica y razón evolutiva (Fuciños *et al.* 2008). Determinar el tipo de agua más conveniente para su crecimiento *in vitro* es uno de los parámetros que permitirá optimizar las condiciones para su cultivo y posterior transformación con la metagenoteca. Por este motivo se realizaron ensayos de crecimiento, tanto en medio líquido como en placa, utilizando varios tipos de aguas minerales, así como del agua extraída del propio manantial de As Burgas.

La composición de bicarbonatos, sodio y calcio es muy diferente entre las aguas estudiadas (Tabla 4). El agua del manantial termal de As Burgas es la que presenta una mayor concentración de bicarbonatos y de sodio, mientras que el agua comercial Aquarel tiene el contenido más bajo en bicarbonatos, Na⁺ y Ca²⁺. Por el contrario, el pH presenta pocas oscilaciones entre las distintas aguas, siendo el agua de As Burgas la de pH más alcalino.

Tabla 4. Medidas de pH tras 15 días de la apertura de las botellas, bicarbonatos, sodio y calcio

Aguas	pH	Bicarbonatos (mg/L)	Sodio (Na ⁺)(mg/L)	Calcio (Ca ²⁺)(mg/L)
As Burgas	6.94	649,2	102,2	11,2
Evián	6.39	360	6.5	80
Lanjarón	6.47	131	5.5	26.6
Mondariz	6.43	160	47.7	6.6
Fontecelta	6.67	257	91.4	17.6
Sierra Cazorla	6.38	408.7	1.26	78.6
Fuente Primavera	6.39	297.2	18.6	88.7
Aquarel	6.58	13.2	4.7	2.2
Agua Destilada	6.57	0	0	0

En relación al crecimiento en medio sólido, se observa que la media de ufc es ligeramente superior cuando se emplea el agua comercial Fuente Primavera (Figura 4). Sin embargo, en medio líquido, el crecimiento de *T. thermophilus* es muy similar en todas las aguas estudiadas (Figuras 5 y 6). El análisis estadístico pone de manifiesto que no existen diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en el crecimiento (Tabla 5).

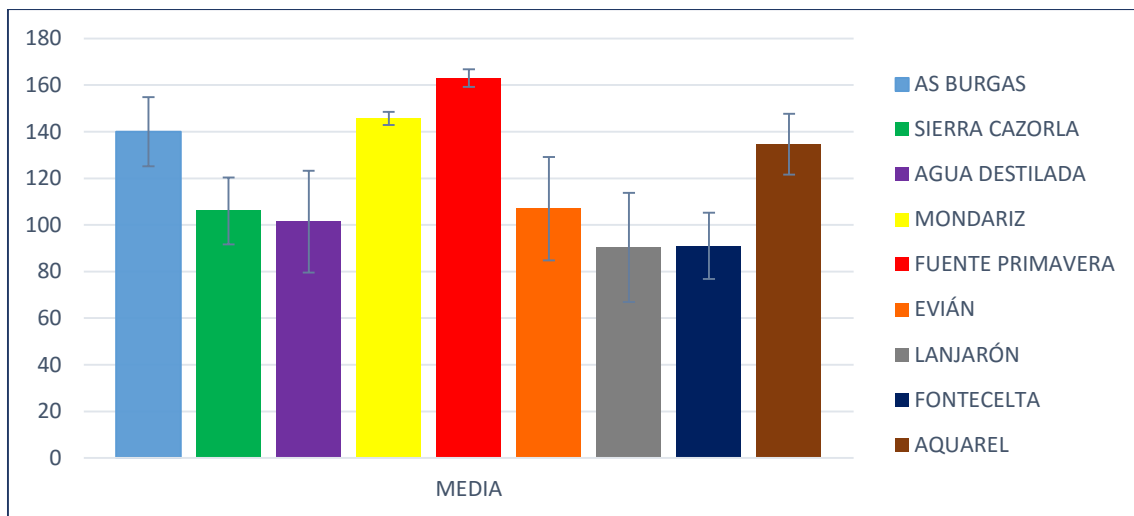


Figura 4. Media de ufc de *T. thermophilus* HB27 en diferentes aguas tras 24 h (n=3)

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico de los datos de crecimiento de *T. thermophilus* en las diferentes aguas

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: DO

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	329,185 ^a	23	14,312	91,856	,000
Intersección	402,580	1	402,580	2583,724	,000
Agua	2,261	7	,323	2,073	,065
Tiempo	325,091	2	162,546	1043,204	,000
Agua * Tiempo	1,833	14	,131	,840	,624
Error	7,479	48	,156		
Total	739,243	72			
Total corregido	336,664	71			

a. R al cuadrado = ,978 (R al cuadrado ajustada = ,967)

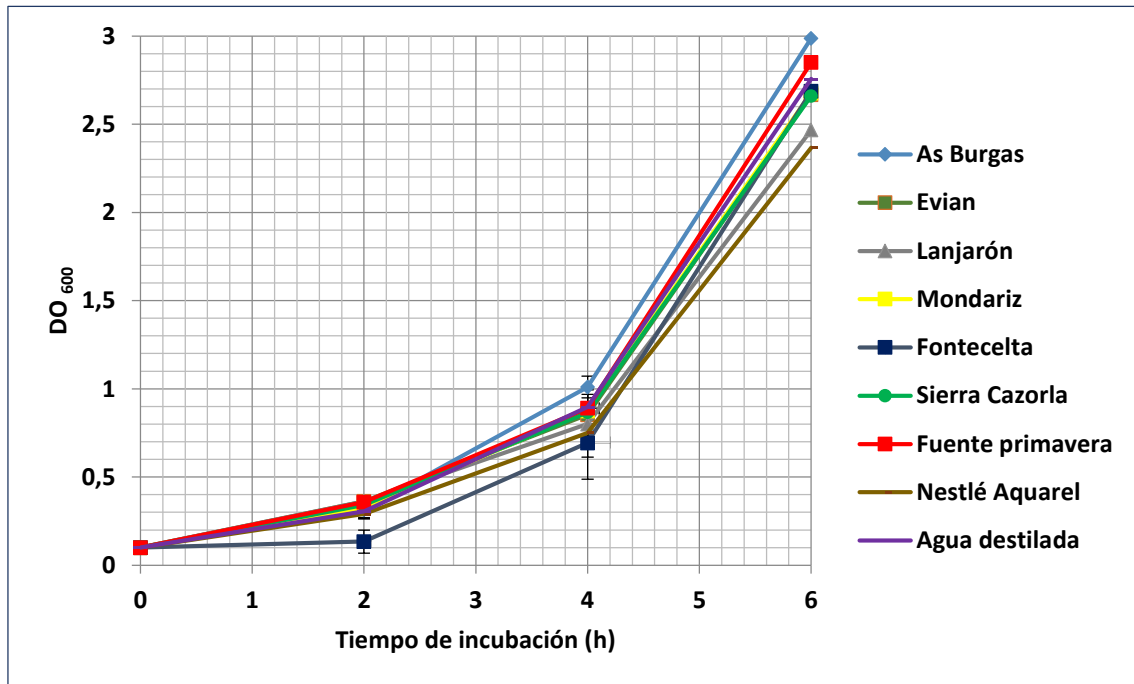


Figura 5. Crecimiento medio de *T. thermophilus* HB27 a lo largo de 6 h en las diferentes aguas (n=3)

Debido a que el único factor semejante entre las aguas es el pH (Tabla 4), se propone que este pueda ser el factor más influyente en el crecimiento de *T. thermophilus*. Estos resultados confirman que la composición mineral del agua no influye significativamente en el crecimiento, si bien es fundamental para incrementar la actividad de algunas enzimas como las lipasas (Fuciños *et al.*, 2008) y para mejorar el rendimiento de la transformación como puso de manifiesto De Grado *et al.*, 1999, en uno de los primeros estudios sobre los factores de crecimiento de *T. thermophilus*. Dicho estudio demuestra la obtención de un mayor rendimiento de transformación en un medio que posee un

agua mineral rica en carbonato (267 mg/L de bicarbonato, 25 mg/L de sulfato, un 80% de calcio y 0,8 mg/L de sodio). Por ello, se selecciona el agua del manantial termal de As Burgas para elaborar los medios de cultivo, dado que tiene un mayor contenido en carbonatos y presenta menor coste, además de ser el agua dónde naturalmente se encuentra *T.thermophilus*.

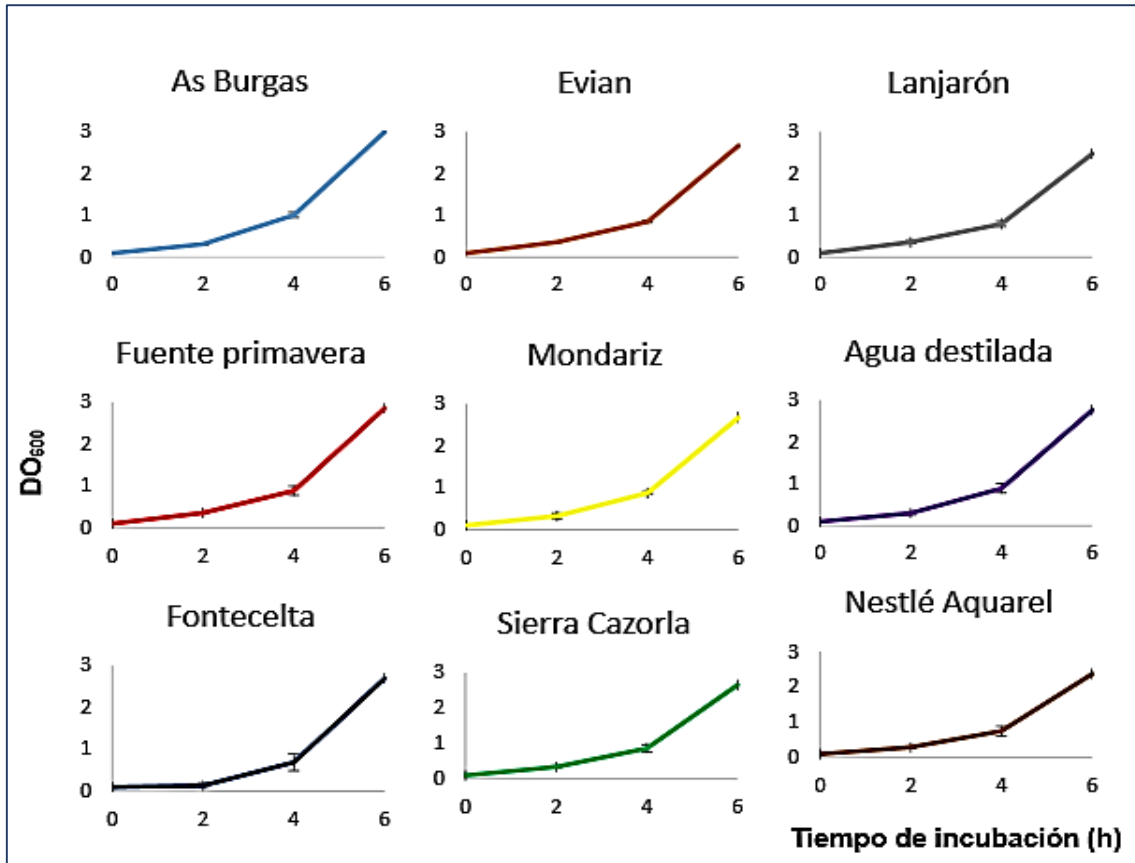


Figura 6. Comparativa del crecimiento medio de *T.thermophilus* HB27 a lo largo de 6 h en cada agua (n=3)

4.2. Extracción del ADN plasmídico

La cuantificación del ADN extraído de cada pocillo muestra una concentración mínima de 10 ng/μL y máxima de aproximadamente 6000 ng/μL. La visualización de algunas extracciones en gel (pocillos A5, C1, C5, G8, F9, E10) indica la integridad del ADN en todas ellas (Figura 7), si bien sus concentraciones son diferentes (3677ng/μL, 23 ng/μL, 17,7 ng/μL, 1758 ng/μL, 529 ng/μL y 392 ng/μL, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto que todas las muestras presentan una concentración óptima para llevar a cabo la transformación ya que en estudios previamente realizados por Angelov *et al.*, (2009) se utiliza con éxito una concentración de ADN para la transformación entre 40 y 1000 ng/μL.

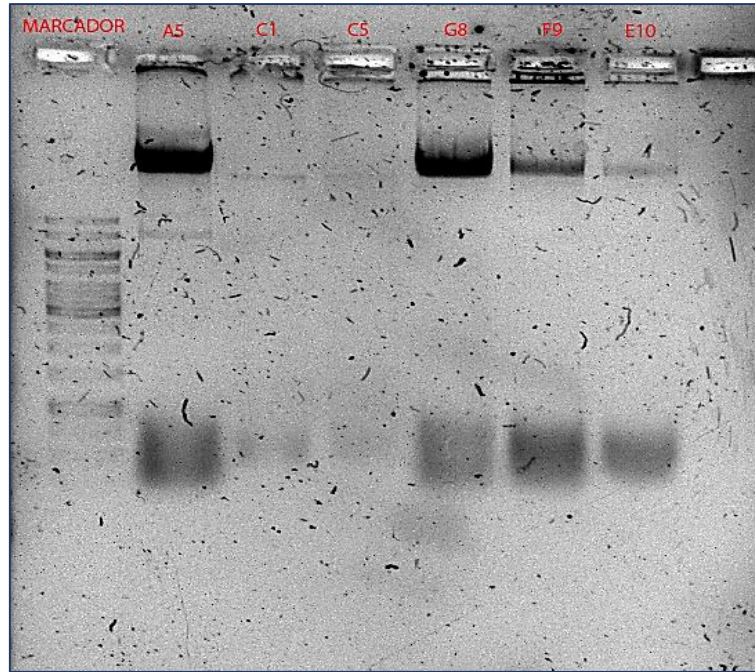


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de las minipreps A5, C1, C5, G8, F9, E10

4.3. Optimización del proceso de transformación de *T. thermophilus* MD158

El proceso de transformación y búsqueda de actividad β -galactosidasa se realiza con la cepa *T. thermophilus* MD158. Esta cepa presenta varias deleciones entre las que cabe destacar la eliminación del gen crtB (TT_ P0057), codificante para la enzima fitoeno sintetasa, que participa en la síntesis de pigmentos carotenoides responsables de la coloración naranja-amarilla característica de *T. thermophilus* (Carr *et al.*, 2015). Asimismo, se encuentran delecionados los genes TT_ P0220 y TT_ P0222, bga que codifican para β -galactosidasas. Estas características hacen a esta cepa idónea para la búsqueda de posibles candidatos con actividad β -galactosidasa ya que carece de actividad intrínseca y su pérdida de pigmentación facilita la búsqueda de dicha actividad, tal y como se he mencionado previamente en la introducción.

La transformación con el ADN extraído se lleva a cabo mediante el método descrito por Angelov *et al.*, (2009) con leves modificaciones. Se siembra parte de la muestra en placas selectivas, dando lugar a un crecimiento en césped, que no permite la identificación de posibles candidatos. Con el fin de obtener colonias aisladas que permitan la identificación y aislamiento de candidatos, se realizan diluciones seriadas con el resto de la muestra. Sin embargo, a los tres días de cultivo se observa un crecimiento nulo en diluciones superiores a 10^{-1} , de lo que se concluye que el procedimiento usado para realizar la transformación no es el adecuado. Por este motivo, se realizan varios ensayos con distintas cantidades de ADN metagenómico para utilizar en la transformación, así como del número de células sembradas en placa.

Las condiciones y resultados obtenidos se muestran en la figura 8. El crecimiento nulo en las placas cuando se utilizaron 5 y 15 μ L de ADN indica un volumen de 5 μ L puede ser escaso mientras que 15 μ L es muy elevado, pudiendo inhibir el proceso de transformación. Sin embargo, se observa crecimiento cuando se transforman las células con 10 μ L de ADN metagenómico.

Estas dificultades de transformación de la cepa MD158 podrían deberse a que, a pesar de sus ventajas de carencia de pigmentación y ausencia de β -galactosidasa, también presenta deletados genes como: *cas6*, *ago*, entre otros; que codifican para proteínas implicadas en el sistema de adaptación inmune, guía y reparación del ADN. (Carr *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado la implicación del gen *crtB*, en la estabilidad de membrana (Fujita *et al.*, 2012), lo que podría estar relacionado con una menor eficiencia en la captación de ADN exógeno.

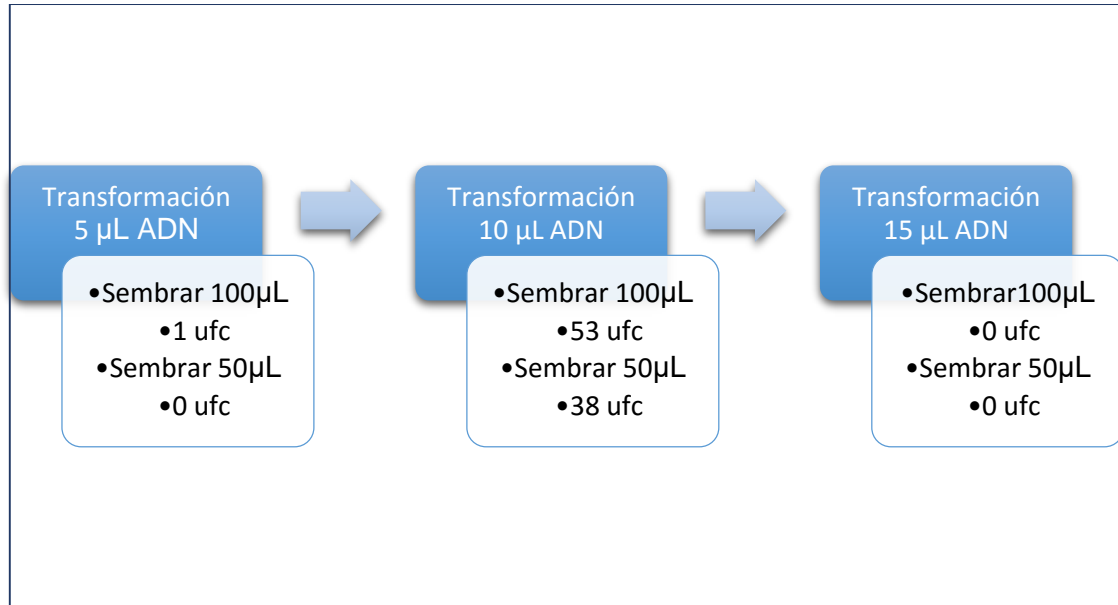


Figura 8. Esquema del proceso de puesta a punto de la cantidad de ADN plasmídico óptima para la transformación

4.4. Búsqueda de actividad β -galactosidasa en *T. thermophilus* MD158 transformado

Una vez conocidas las cantidades de ADN y número de colonias óptimos para la transformación, la búsqueda y obtención de candidatos con actividad β -galactosidasa se consiguió tras realizar el proceso de transformación en sucesivas ocasiones, en las que se optimizan otras condiciones de cultivo en placa tras la siembra de colonias, como son la temperatura y el grado de humedad en el incubador.

La temperatura óptima de crecimiento para *T. thermophilus* es de 70°C en medio líquido. Sin embargo, esta temperatura en medio sólido provoca una deshidratación rápida de las placas que impide el crecimiento. Por este motivo se realizó una incubación a 65°C, variando el grado de humedad en el interior del incubador.

Tras la transformación, utilizando las condiciones detalladas en el apartado 4.3., se sembraron 96 placas con el fin de obtener suficientes colonias y aislar candidatos positivos. La incubación en atmósfera húmeda de *T. thermophilus* MD158 ocasiona un crecimiento en césped tras 48 h (Tabla 6) y, en la mayoría de los casos, dicho césped se observa en los bordes de la placa (Figura 9).

Las condiciones de humedad utilizadas permiten que no se deshidraten las placas, pero incrementan la condensación de agua en el interior de las mismas, sobre todo cuando se utiliza un número elevado de placas, como en este caso, lo cual puede producir varios efectos indeseables: contaminación iniciada en los bordes de la placa, debido a que el exterior no es un ambiente estéril, o desplazamiento de líquido sobre la placa, lo que impide la formación de colonias aisladas fáciles de transferir a nuevas placas.

Tabla 6. Resultados de la transformación de *T. thermophilus* MD158

Número de colonias	Día 1	Día 2
0	37	4
0-10	45	16
10-20	8	4
20-30	0	0
30-100	3	2
Césped	0	64

Sin embargo, se obtiene una placa dónde hay crecimiento en césped con presencia de pequeñas colonias con pigmentación azul (Figura 9). Se procede a su aislamiento para su posterior expresión en medio suplementado con lactosa.



Figura 9. Colonia transformada con ADN plasmídico de aguas de Río Caldo en *T. thermophilus* MD158 con actividad β -galactosidasa

Las colonias positivas se resiembran y aíslan varias veces en medio selectivo hasta obtener sólo colonias con pigmentación, resultante de la actividad β -galactosidasa. Los sucesivos aislamientos se realizan en campana de flujo laminar, sembrando los candidatos en la zona central de la placa, en donde parece que tarda más en degradarse la kanamicina, y se sella con parafilm para evitar en lo posible que la condensación de agua en los bordes de la placa pueda estar en contacto con el aire del exterior en el incubador. De este modo se consiguen cuatro candidatos con colonias azules y sin aparente contaminación de colonias blancas (Figura10).



Figura 10. Colonia aislada con actividad β -galactosidasa

Los positivos aislados poseen un crecimiento nulo o muy escaso (Figura 10). Este bajo crecimiento podría deberse a que la delección de MD158 también eliminó los genes TT_P0196 y TT_P0197, que codifican para una nucleasa putativa y una exonucleasa de la familia RecB; se ha comprobado que la ausencia de estos genes causa deficiencias en el crecimiento (Brüggemann y Chen, 2006).

Posteriormente se inoculan los candidatos aislados en medio TB líquido con kanamicina, así como el pC3TFK vacío y *T.thermophilus* MD158 sin transformar para realizar la cuantificación de actividad β -galactosidasa. Pasados 3-4 días, comienzan a crecer exponencialmente alcanzando una DO_{600} 5.5, lo que se debe a la hidrólisis de la kanamicina (Figura 11).

El resultado es la pérdida de los candidatos por el crecimiento de colonias sin actividad en los medios líquidos pasadas 72 h.



Figura 11. Crecimiento de colonias sin actividad β -galactosidasa tras 3 días de la inoculación en medio TB suplementado con kanamicina (20 μ g/mL) de los candidatos a 70°C, 250 rpm

Se concluye así que, al incubar el candidato en medio líquido, las pocas colonias que no presentan la actividad crecen de forma exponencial pasadas las 48 h, lo que implica la pérdida del candidato e impide seguir con el ensayo. Esto puede deberse a que las colonias blancas contienen únicamente vector sin inserto. El crecimiento de estas colonias, con una menor carga exógena de ADN es mucho más rápido que los candidatos azules, que pueden tener vectores conteniendo insertos de hasta 40kb de tamaño y que, además de tener una mayor carga exógena de ADN, pueden contener genes que codifiquen proteínas que puedan ser tóxicas o que, de algún modo, ralenticen

el crecimiento de las células en comparación con las colonias transformadas únicamente con el vector vacío.

Para solventar este problema, en el futuro se necesitaría realizar varias optimizaciones:

- Conseguir las condiciones que permitan la obtención de colonias plenamente aisladas, quizás realizando la siembra en el centro de las placas tras la transformación
- Realizar un aislamiento más exhaustivo de los candidatos positivos
- Emplear medios con doble capacidad selectiva tras la obtención de candidatos positivos: con kanamicina y con lactosa como única fuente de carbono, con el fin de que las células transformadas sólo con vector o con vectores conteniendo insertos que no alberguen β -galactosidasas no puedan crecer posteriormente en medio líquido tras el aislamiento

5. CONCLUSIONES

- 1) El cultivo de *T. thermophilus* utilizando distintos tipos de aguas minerales, tanto en medio líquido como en placa, demuestra que este extremófilo no necesita aguas ricas en carbonatos para su crecimiento, ya que crece en todas las aguas
- 2) La extracción de ADN plasmídico de la librería metagenómica ha sido efectiva, obteniéndose cantidades variables de ADN de los distintos pocillos, que varían entre 10 y 6000 $\mu\text{g/mL}$ de ADN, dentro del rango óptimo para proceder a la transformación y con alto grado de integridad
- 3) Las condiciones de transformación de *T. thermophilus* para la búsqueda funcional de enzimas en este extremófilo debe seguir poniéndose a punto, ya que las eficiencias obtenidas no son las deseables. Se propone el uso de otra cepa diferente a MD158, dado que este mutante presenta la pérdida total de 118 genes, muchos de ellos implicados en sistemas de reparación del ADN, lo que conlleva a una disminución de crecimiento a altas temperaturas
- 4) La búsqueda de nuevas enzimas β -galactosidasa debe realizarse en medios con doble selección dadas las dificultades para la obtención de colonias aisladas tras el proceso de transformación. La doble selección debería realizarse con kanamicina y con lactosa como única fuente de carbono con el fin de evitar el crecimiento de colonias que puedan resistir inicialmente la selección por antibiótico por contener el vector que contiene el gen de resistencia a kanamicina pero que no pueden crecer en medios con este azúcar como única fuente de carbono al no contener β -galactosidasas capaces de hidrolizarlo

CONCLUSIONS

- 1) The growth of *T. thermophilus* using different types of mineral water, both in liquid and solid media, shows that this extremophile doesn't need carbonate-rich water for optimum growth
- 2) Extraction of metagenomic plasmid DNA was succesful, yielding different amounts of DNA, ranging from 10 to 6000 µg/ mL DNA and with a high degree of integrity
- 3) The conditions of transformation of *T. thermophilus* for functional searching of new enzymes in this extremophile must be settled up because the efficiency is not optimal. We propose the use of a strain different from MD158, since this mutant has a total loss of 118 genes, many of them involved in DNA repair systems, leading to a decrease of growth at high temperatures
- 4) The search for new β-galactosidase enzymes should be performed in double selection media given the difficulties to obtain isolated colonies after the process of transformation. The double selection should be done with kanamycin and with lactose as the sole carbon source in order to prevent the growth of colonies that may initially resist antibiotic selection, and that could contain the vector without insert. This vector confers kanamycin resistance but cells can't grow in this media because they don't have β-galactosidase capable of hydrolyzing lactose

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelov A, Mientus M, Liebl S, Liebl W (2009) A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 177-185.
- Brüggemann H, Chen C (2006) Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: plasticity of the mega plasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. *J. Biotechnol.* 124: 654-661.
- Carr JF, Danziger ME, Huang AL, Dahlberg AE, Gregory ST (2015) Engineering the Genome of *Thermus thermophilus* Using a Counterselectable Marker. *J. Bacteriol.* 6: 1135-1144.
- De Grado M, Castán P, Berenguer J (1999) A High-Transformation-Efficiency Cloning Vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* 42: 241-245.
- Ekkers DM, Cretoiu MS, Kielak AM, Elsas JD (2012) The great screen anomaly—a new frontier in product discovery through functional metagenomic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1005-1020.
- Erich S, Kuschel B, Schwarz T, Ewert J, Böhmer N, Niehaus F, Eck J, Lutz-Wahl S, Stressler T, Fischer L (2015) Novel high-performance metagenome β -galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry. *J. Biotechnol.* 210: 27-37.
- Frock AD, Kelly RM (2013) Extreme Thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 1: 363-372.
- Fuciños P, Rúa ML, Longo MA, Sanromán MA, Pastrana L (2008) Thermal spring water enhances lipolytic activity in *Thermus Thermophilus* HB27. *Process. Biochem.* 43: 1383-139.
- Fujita A, Misumib Y, Koyama Y (2012) Two versatile shuttle vectors for *Thermus thermophilus*–*Escherichia coli* containing multiple cloning sites, lacZ α gene and kanamycin or hygromycin resistance marker. *Plasmid* 67: 272-275.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245-249.
- Henne A, Brüggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, Johann A, Lienard T, Gohl O, Martinez-Arias R, Jacobi C, Starkuviene V, Schlenczeck S, Dencker S, Huber R, Klenk HP, Kramer W, Merkl R, Gottschalk G, Fritz HJ (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22: 547-553.
- Hugenholtz P, Tyson GW (2008) Metagenomics. *Nature* 455: 481-483.
- Jeon JH, Kim JT, Kang SG, Lee JH, Kim SJ (2009) Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic. *Mar. Biotechnol.* 10: 307-316.
- Jiang C, Li SX, Luo FF, Jin K, Wang Q, Hao ZY, Wu LL, Zhao GC, Ma GF, Shen PH, Tang XL, Wu B (2011) Biochemical characterization of two novel β -glucosidase genes by metagenome expression cloning. *Bioresour. Technol.* 102: 3272-3278.
- Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N, Furukawa K (1986) Genetic transformation of the thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* 166: 338-340.

- López-López O, Knapik K, Cerdán ME, González-Siso MI (2015) Metagenomic of an alkaline hot spring in Galicia (Spain): microbial diversity analysis and screening for novel lypolytic enzymes. *Front. Microbiol.* 6: 1291.
- Pereira RA, Fernández LR, Trillo MC, Cerdán ME, González Siso MI, Becerra M (2006) Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis-Aspergillus niger* β -galactosidase. *Microb. Cell. Fact.* 5: 41.
- Rhee JK, Ahn DG, Kim YG, Oh JW (2005) New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 817-825.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor *Laboratory Press*. New York.
- Schmeisser C, Steele H, Streit WR (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 955-62.
- Schröder C, Elleuche S, Blank S, Antranikian G (2014) Characterization of a heat-active archaeal β -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome. *Enzyme. Microb. Tech.* 57: 48-54.
- Sinowieky J, Grzybowska B, Zdziebło A (2006) Sources, properties and suitability of new thermostable enzymes in food processing. *Crc. Cr. Rev. Food. Sci.* 46: 197-205.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* 304: 66-74.
- Wang GY, Graziani E, Waters B, Pan W, Li X, McDermott J, Meurer G, Saxena G, Andersen RJ, Davies J (2000) Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org. Lett.* 2: 2401-2404.
- Zhang X, Li H, Li CJ, Ma T, Li G, Liu YH (2013) Metagenomic approach for the isolation of thermoestable β -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin. *BMC. Microbiology.* 13: 237.

7. ANEXO I. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

°C: grados centígrados

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

h: hora

IPTG: isopropyl β -D thiogalactosido

kb: kilobases

L: litro

LB: medio Luria-Bertani

LBC: medio Luria-Bertani con cloranfenicol

μ g: microgramo

μ l: microlitro

min: minutos

mg: miligramo

ml: mililitro

M: molar

nm: nanómetro

nM: nanomolar

N: normalidad

pb: pares de bases

p/V: peso/volumen

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato sódico

TB: medio Thermus Broth

T. thermophilus: *Thermus Thermophilus*

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

ufc: unidades formadoras de colonias

V: Voltios

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido