

Clonación y expresión en *Escherichia coli* de genes de celulasas de *Clostridium* IBUN 22A

Cloning and expression in *Escherichia coli* of cellulases genes from *Clostridium* IBUN 22A

Lucy Carolina Vargas Pabón*, Dolly Montoya*, Fabio Aristizábal**

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue construir una librería genómica a partir de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A, utilizando como vector de clonación el plásmido pBluescript® IISK+/- y su expresión en *Escherichia coli*. La detección de ocho clones recombinantes con actividad enzimática se realizó empleando el tamizaje enzimático con tres sustratos: celobiosa, carboximetilcelulosa y celulosa pulverizada (nativa). Los halos de hidrólisis fueron detectados por la técnica de rojo congo. Se realizaron análisis por restricción de tres de los plásmidos recombinantes representativos de cada una de las actividades hidrolíticas, sobre los tres sustratos mencionados. Los tamaños de los insertos clonados fueron aproximadamente 1.600, 13.000 y 11.000 pb para pBS68, pBS25 y pBS57, respectivamente. Mayores estudios de expresión proteica y caracterización enzimática permitirán definir la especificidad y otros parámetros característicos de estas enzimas. Así mismo, la secuencia de los insertos hará posible analizar y definir con más detalle la potencialidad biotecnológica de nuestra cepa hacia la producción de solventes mediante el empleo de sustratos celulósicos como fuente de carbono para la fermentación acetona, butanol, etanol (ABE).

Palabras clave: Librería genómica, celobiohidrolasas, celulosa, celulasas, *Clostridium* solventogénicos.

ABSTRACT

Genomic library of the native strain *Clostridium* IBUN 22A was constructed, using plasmid pBluescript® KS+/- as cloning vector and its expression in *Escherichia coli* was evaluated. Eight recombination clones with enzymatic activity were detected by enzymatic screening and using the red-Congo test with three substrates: cellobiose, carboxymethyl cellulose (CMC) and cellulose powder (native). Restriction analysis of three recombination plasmids, representative of each enzymatic activity showed the inserted size (1600, 13000 and 11000bp approximately for pBS68, pBS25 and pBS57 respectively). More studies of protein expression and enzymatic characterization will allow these enzymes and other typical parameters to be defined. In the same way the fragment sequence cloned will lead to a more detailed analysis and definition of the biotechnological potential of this strain regarding solvent production using cellulosic substrates for fermentation.

Key words: Genomic Library, Cellobiohydrolases, Cellulose, Cellulases, *Clostridium*.

INTRODUCCIÓN

La producción biotecnológica de solventes, usando microorganismos como *Clostridium*, ha conducido a la investigación sobre los genes celulolíticos, motivadas por la necesidad de realizar procesos fermentativos económicamente viables, con fuentes de carbono celulósicas y cepas

nativas o modificadas, capaces de metabolizarlas (Jones y Wood 1986; Claassen *et al.*, 1999).

Montoya y colaboradores (2000; 2001) han aislado y seleccionado trece cepas nativas colombianas de *Clostridium* productores de

* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

** Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia. E-mail: fabioaris@ibun.unal.edu.co

solventes, y estudiaron la capacidad hidrolítica de estas cepas frente a un amplio rango de polisacáridos presentes en residuos agroindustriales. Dichas cepas nativas se caracterizaron molecularmente a través de la secuencia parcial del gen 16s rARN y patrones de macro-restricción por electroforesis en campo pulsado. Estas cepas nativas demostraron pertenecer a un grupo homogéneo cercanamente relacionado con *Clostridium butyricum* (Montoya *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2001). Respecto a la actividad hidrolítica fueron destacadas las cepas nativas IBUN 18Q, IBUN 22A, IBUN 62B, IBUN 62F, e IBUN 140B. La cepa de *Clostridium* IBUN 22A mostró los mejores valores hidrolíticos y la máxima capacidad para degradar celulosa cristalina (Avicel). La potencialidad biotecnológica de esta cepa se basa en la utilización de carbohidratos oligoméricos y poliméricos, y a su capacidad para degradar sustratos complejos como la celulosa cristalina (Avicel) para producir solventes. Estas características plantean la necesidad de aislar, clonar y expresar sus genes celulolíticos, como aporte para la comprensión de las características moleculares, bioquímicas y fisiológicas del microorganismo (Montoya *et al.*, 2001).

En este trabajo se describe la construcción y tamizaje enzimático por la prueba de rojo congo en placa, de una librería genómica de *Clostridium* IBUN 22A, en el plásmido pBluescript® II KS+/- y expresada en *Escherichia coli*, para la detección de genes celulolíticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Clostridium IBUN 22A fue la cepa usada para la construcción de la librería genómica. *Escherichia coli* XL1 BLUE fue la cepa receptora para la transformación. El vector de clonación empleado fue el plásmido pBluescript® II KS+/- (Sambrook *et al.*, 1989).

Microorganismos, condiciones de crecimiento y extracción de ADN

Escherichia coli XL1 BLUE fue crecida aeróbicamente con agitación a 37°C, en medio Luria-Bertani (LB); cuando fue necesario, se adicionó ampicilina, isopropil-β-D-tio- galactósido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (XGAL) según las recomendaciones de Sambrook *et al.* (1989).

Clostridium IBUN 22A fue crecido en condiciones anaerobias a 37°C en medio RCM (medio de *Clostridium* reforzado), en los volúmenes necesarios para los preinóculos (20 ml) e inóculos respectivos (200 ml) (Montoya *et al.*, 2001). Para la extracción del ADN de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A, se siguió el protocolo de maxipreparación propuesto por Marmur (1961) y Schwarz *et al.* (1988).

Construcción de la librería genómica de *Clostridium* IBUN 22A

Lotes de 240 ng de ADN total de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A fueron digeridos parcialmente con 2,8 U de la enzima *Sau*3AI. 600 ng de ADN digerido parcialmente fue ligado con 600 ng de vector plasmídico previamente digerido con *Bam*HI, en un volumen de 20 µL. Se tomaron 600 ng de la ligación (10 µL) para transformar células de *Escherichia coli* XL1 BLUE. Un mililitro correspondiente al volumen total de la transformación fue plaqueado gradualmente en agar LB ampicilina (50 ng/ml) con el fin de aislar y tamizar los transformantes en busca de al menos un recombinante que demostrara el fenotipo celobiosa negativa, carboximetilcelulosa negativa y celulosa nativa positiva (Cornet *et al.*, 1983a; Tuka *et al.*, 1990; Cornet *et al.*, 1983b; Leibovitz and Béguin, 1996; Zappe *et al.*, 1986; New England Biolabs Catalog, 1998-1999, USA; Ausubel *et al.*, 1994-1998; Promega, 2001, USA; Sambrook *et al.*, 1989; Millet *et al.*, 1985).

Tamizaje enzimático de la librería

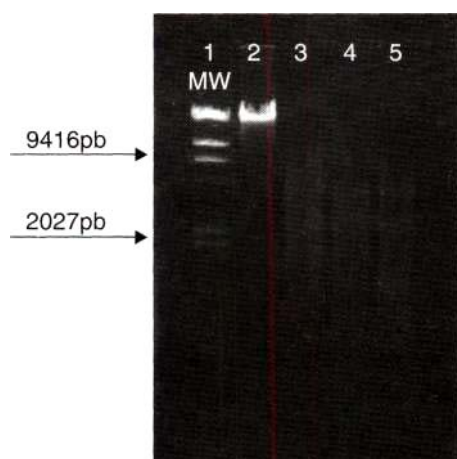
Cada uno de los clones de la librería genómica fue transferido a una caja de agar LB ampicilina (50 µg/ml), adicionado de IPTG y X-gal, según las concentraciones sugeridas por Sambrook *et al.* (1989), hasta construir cajas que contenían entre 50 y 60 clones. Después de una incubación a 37°C por 24 horas fueron transferidos uno a uno a tres cajas réplica de agar LB e incubados 24 horas. Posteriormente cada caja fue cubierta con 7 ml de Buffer PC. (50 mM K₂HPO₄, 12 mM ácido cítrico, pH 6,3) que contenían 0,7% de agar-agar y 0,5% del sustrato respectivo (Cellulose powder MN 300, Carboximetilcelulosa CMC, o celobiosa). Al final de un período de incubación de tres horas a 37°C, las cajas fueron cubiertas con solución de rojo congo al 1 % en agua por 15 minutos a temperatura ambiente, se retiró la solución de rojo congo y las cajas fueron lavadas con solución de NaCl 1M. Los clones con actividad se re-

flejaban por halos incoloros de hidrólisis sobre un fondo rojo (Cornet *et al.*, 1983, Teather y Wood, 1982).

RESULTADOS

Extracción de ADN y digestión parcial

Cultivos en 200 ml de medio RCM permitieron obtener por maxipreparación 200 μ l de ADN a una concentración de 100 ng/ μ l. Posteriormente, ensayos de digestión parcial establecieron la utilización de 2,8 U de enzima *Sau*3AI para 240 ng de ADN, en tiempos de 5 minutos, con lo cual se generaron fragmentos entre 9416 pb y 564 pb, con tamaños promedio en su mayoría de 5000 pb comparados con el marcador de ADN de lambda digerido con *Hind* III; este tamaño fue seleccionado con base en el interés de identificar genes con actividad contra celulosa cristalina, ya que genes de celobiohidrolasa publicados oscilan en este tamaño promedio (véase fotografía 1).



Fotografía 1. Ensayo de digestión parcial: 240 ng de ADN, 2,8 U de enzima *Sau*3AI en diferentes tiempos de digestión. Línea 1: ADN de lambda digerido con *Hind* III, línea 2: control no digerido de ADN; líneas 3 al 5: digestiones en 5, 10 y 15 minutos con 2,8 unidades de enzima.

Construcción de la librería genómica de *Clostridium* IBUN 22A

Células competentes de *Escherichia coli* XL1 BLUE, preparadas por el método tradicional de CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 1989), llevaron a obtener eficiencias de transformación de 6×10^6 transformantes/ μ g de ADN, con el vector pBluescript II KS +/-. El plásmido purificado se linealizó cortándolo con la enzima *Bam* HI en la posición 689, para obtener extremos cohesivos compatibles con los generados por la enzima *Sau*3AI, la cual se usó para generar fragmentos a partir del ADN total de la cepa *Clostridium* IBUN 22A.

Ensayos para determinar las concentraciones en moles vector-inserto 1:1, 1:2, 1:3 y 1:10, resultaron desfavorables. Los experimentos de Millet y colaboradores en 1985 fueron la base para identificar la relación adecuada, siendo ésta 1:1 en masa (600 ng: 600 ng); 600 ng de la ligación se tomaron para transformar y obtener la librería, cuyo tamaño fue de 723, correspondiente a una eficiencia de 1.205 transformantes/ μ g de ADN ensayado.

Tamizaje enzimático con la prueba de rojo congo en placa

La prueba de Teather y Wood, modificada por Cornet y colaboradores, incluye la celobiosa y la celulosa nativa como sustratos, permite identificar actividades que cubren los tres pasos esenciales en la degradación de celulosa: endoglucanasa, exoglucanasa y (3-glucosidasa) (Cornet *et al.*, 1983, Teather y Wood, 1982). La metodología de tamizaje enzimático en placa permitió detectar clara actividad hidrolasa, presentando gran sensibilidad para la detección de endoglucanasas y (3-glucosidasas, siendo una técnica rápida aplicada al tamizaje de librerías en *Clostridium*, modificaciones y combinaciones de sustratos pueden permitir la detección de celobiohidrolasas. Los datos correspondientes al tamizaje de la librería se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Tamizaje de la librería genómica de *Clostridium* IBUN 22A por actividad enzimática expresada en *Escherichia coli*.

	Número	Frecuencia (%)
Clones con actividad celolítica	8	1,1
Celulosa pulverizada	2	0,3
Carboximetilcelulosa	2	0,3
D-Celobiosa	4	0,5
Clones sin actividad	715	98,9
Total de clones evaluados	723	100

Análisis de los clones con actividad enzimática

Los ocho clones que mostraron actividad fueron evaluados por α -complementación y por restricción con la enzima *EcoRV*. En la α -complementación, la presencia de colonias blancas indicaron la inactivación del gen *lacZ'* del vector de clonación por inserción de fragmentos de ADN de *Clostridium* IBUN 22A (véase tabla 2).

Plásmido no recombinado fue comparado con plásmido recombinado de los clones 68, 25 y 57 por restricción con *EcoRV* y *SacI*. Estas enzimas fueron seleccionadas por hacer restricción a los lados y cerca a *Bam*HI, sitio de clonación en el vector, permitiendo la liberación de los insertos en los plásmidos recombinados, con la finalidad de definir aproximadamente el tamaño de los insertos clonados con actividad.

DISCUSIÓN

Desde los años ochenta, varios grupos de investigadores han realizado trabajos que permiten caracterizar los genes celulolíticos del género *Clostridium*. Inicialmente, dos especies enfocaron la mayor parte de las investigaciones: *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium thermocellum*. A partir de los noventa, especies como *Clostridium cellulolyticum* y *Clostridium cellulovorans* han completado el espectro de los genes celulolíticos. Las estrategias empleadas incluyen la clonación, secuenciamiento de genes y expresión de las proteínas en *Escherichia coli*; así, la construcción de librerías junto con los diferentes métodos de tamizaje en placa con sustratos como CMC y metilumberil celobiosido (MUC) han sido claves. *Sau3AI* es la enzima

preferencialmente empleada para digestión parcial, aunque otras como *EcoRI* se han utilizado. Igualmente plásmidos, cósmidos y fagos han sido los vectores de clonación seleccionados (Cornet *et al.*, 1983b; Millet *et al.*, 1985; Zappe *et al.*, 1986; Tuka *et al.*, 1990).

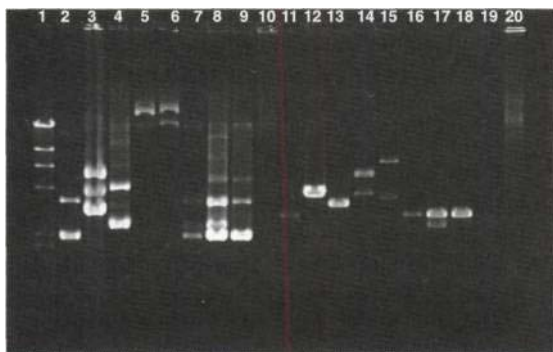
Para la cepa nativa IBUN 22A mesófila, la construcción de la librería se llevó a cabo mediante digestión parcial con *Sau3AI*, y como vector de clonación se empleó el plásmido pBluescript® II KS+/- . Se tamizaron 723 transformantes, que corresponden a una eficiencia de 1.205 transformantes / μ g de ADN donante. El tamaño de la librería tamizada fue casi cinco veces mayor, comparada con la de Millet; sin embargo, no fue necesario realizar purificaciones de los fragmentos por elución a partir de geles de agarosa como lo sugerían estos autores (Millet *et al.*, 1985). Por otro lado, la eficiencia fue casi siete veces menor comparada con la publicada por Tuka y colaboradores, quienes también purificaron los fragmentos por clonar pero buscando tamaños de insertos mucho mayores, entre 10 a 20 Kpb (Tuka *et al.*, 1990), mientras Millet buscaba un tamaño promedio de 4.000 Kpb. En ninguno de los casos anteriores se empleó ADN aislado de la misma cepa; tampoco se emplearon los mismos vectores ni las mismas condiciones experimentales; en consecuencia, es difícil formular hipótesis sobre las posibles causas que afectan el proceso de construcción de bibliotecas a partir de ADN de clostridios.

La detección enzimática por la prueba de rojo congo en placa ha sido el ensayo específico para la identificación de endoglucanasas. No obstante, para las exoglucanasas, importantes para la degradación de sustratos cristalinos, no es la prueba de elección

Tabla 2. Análisis de clones de *Escherichia coli* con actividad enzimática frente a sustratos celulósicos.

Número del clon	Actividad observada	Crecimiento en X-gal/IPTG	Migración electroforética
7	CMC ⁺	Azul	Similar a pBS
23	Celobiosa ⁺	Azul	Similar a pBS
25	CMC ⁺	Blanca	Menor a pBS
31	Celobiosa ⁺	Azul	Similar a pBS
56	Celobiosa ⁺	Blanca	Ningún patrón
57	Celobiosa ⁺	Blanca	Menor a pBS
68	Celulosa pulverizada ⁺	Blanca	Menor a pBS
71	Celulosa pulverizada ⁺	Blanca	Menor a pBS

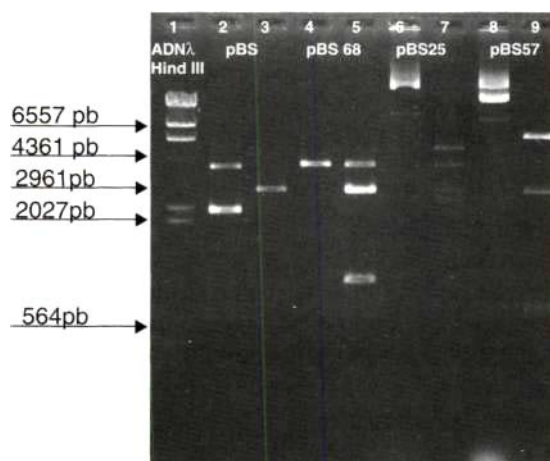
ya que aparentemente la despolimerización del sustrato es difícilmente detectable. Se ha propuesto el uso de otros sustratos fluorogénicos y cromogénicos como MUC y p-nitrofenilcelobiósido, pNPC, en conjunto con CMC, combinaciones adaptadas a la prueba de rojo congo para una mejor la sensibilidad del tamizaje (Béguin y Aubert, 1994). A pesar de lo anterior, fueron incluidos la celobiosa, CMC y celulosa pulverizada (nativa) como sustratos para el tamizaje. Dadas las características hidrolíticas demostradas por la cepa nativa y la importancia de los genes relacionados con esta actividad, los resultados de este trabajo abren un camino para el estudio del sistema celulolítico de la cepa nativa.



Fotografía 2. ADN plasmídico aislado de clones de *Escherichia coli* con actividad enzimática, frente a sustratos celulósicos y digestiones con *EcoRV*. Fila 1: ADN lambda digerido con *Hind* III; línea 2: plásmido pBluescript® II KS+/-; líneas 3 al 10: ADN plasmídico correspondiente a clones 68, 71, 25, 57, 7, 23, 31 y 56; línea 11: plásmido pBluescript® II KS+/- digerido con *EcoRV*; línea 12 al 19: ADN plasmídico digerido con *EcoRV* correspondiente a clones 68, 71, 25, 57, 7, 23, 31 y 56; línea 20: extracción de ADN plasmídico correspondiente a clon 56. Gel de agarosa al 0,7%.

Ocho clones, cada uno con actividad independiente hacia el sustrato, fueron identificados. Dos de ellos expresaron claramente el fenotipo de interés, en contra a lo planteado anteriormente, lo cual podría indicar que la proteína recombinante muestra un nivel de actividad elevado. Algunos de los plásmidos aislados para los clones representativos que mostraban actividad fueron comparados por digestión con las enzimas *EcoRV* y *SacI* con el plásmido no recombinado, permitiendo definir los tamaños aproximados de los fragmentos (véase fotografía 3). El inserto correspondiente a pBS68 no muestra sitios de corte internos para las enzimas *EcoRV* y *SacI* y su tamaño aproximado es de 1600

pb; para pBS25 y pBS57, sus tamaños aproximados son 13.000 y 11.000 pb, respectivamente, y dado que aparecen más de dos bandas, es de esperarse que los insertos presenten más de un sitio de corte para una u otra o ambas de las enzimas utilizadas. Para el clon pBS25 se observa que aparecen al menos dos bandas que migran entre 6.500 y 4.361 pb del marcador de peso, que deberán corresponder al inserto (véase fotografía 3, carril 7) y para el caso del pBS57 también aparecen dos bandas una que migra al nivel de la banda de 9.000 y otra al nivel de la de 564 (Fotografía 3, carril 9). Aunque para el clon 71 no se realizó el corte con las dos enzimas, del análisis electroforético del plásmido sin contar y cortado con *EcoRV* se pudo definir que puede tener un inserto de un tamaño menor a 1.000 pb (véase fotografía 2, carriles 4 y 13).



Fotografía 3. Análisis por restricción. Líneas 1: ADN lambda digerido con *Hind* III. Líneas 2 y 3: plásmido no recombinado sin digerir y digerido con *EcoRV* y *SacI*, respectivamente. Líneas 4 y 5: pBS 68 sin digerir y digerido con *EcoRV* y *SacI*, respectivamente. Líneas 6 y 7: pBS 25 sin digerir y digerido con *EcoRV* y *SacI*, respectivamente. Líneas 8 y 9: pBS 57 sin digerir y digerido con *EcoRV* y *SacI*, respectivamente. Gel de agarosa al 1%.

Los estudios de restricción mostraron resultados confusos con los clones 7, 23, 31 y 56, los cuales inicialmente mostraron actividad enzimática contra diferentes sustratos. Los tres primeros, en las pruebas de restricción resultaron ser no recombinantes; esto podría estar asociado con la posible eliminación del inserto durante los pasos posteriores a las pruebas de actividad, condición que fue demostrada para otros clones; sin embargo, esta hipótesis no pudo ser valorada debido a que no fue

posible recuperar las colonias originales; por otro lado tampoco se retransformó para evaluar nuevamente actividad enzimática. Por último, para el clon 56, aun cuando se intentó modificar los métodos para extraer ADN plásmidico, no fue posible lograrlo; en todos los casos mostraba niveles importantes de degradación, y esto podría estar asociado con el tipo de fragmento clonado, el cual al expresarse podría estar induciendo la sobreexpresión de nucleasas inespecíficas que impidan el aislamiento del ADN.

Escherichia coli XL1 BLUE permitió la expresión de genes celulolíticos con actividad endoglucanasa, α -glucosidasa y celobiohidrolasa de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A. Futuros estudios de expresión proteica y caracterización enzimática permitirán definir la especificidad y otros parámetros característicos de estas enzimas. Así mismo, la secuencia de los insertos permitirá no sólo un análisis bioinformático, sino que servirá de orientación para definir con más detalle la potencialidad biotecnológica de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A.

CONCLUSIONES

Se construyó una librería genómica de la cepa nativa *Clostridium* IBUN 22A, utilizando como vector de clonación el plásmido pBluescriptII® KS+/- . La técnica de tamizaje enzimático con rojo congo es una prueba rápida y útil para la detección de genes celulolíticos de *Clostridium*, clonados y expresados en *Escherichia coli*. De los 723 clones tamizados, dos de ellos portaron el fenotipo celobiosa-, C.M.C.-, celulosa nativa⁺, lo cual sugiere la presencia de una secuencia relacionada con la actividad celobiohidrolasa. Los insertos clonados de mayor tamaño, con actividad celulasa, oscilan entre 11.000 pb y 13.000 pb. El conocimiento de las secuencias aportará más información para seleccionar el gen o los genes responsables de la actividad enzimática sobre celulosa cristalina.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos por la financiación otorgada a este trabajo a la Dirección Nacional de Investigación (Dinain) y la División de Investigación de la sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

BIBLIOGRAFÍA

- Béguin, Fierre and Aubert, Jean-Paul. 1994. The Biological Degradation Of Cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 25-58.
- Claassen, P. A. M., Van Lier, J. B., López Contreras, A. M., Van Niel, E. W. J., Sijtsma L, Stams, A. J. M., Vries, S. S. de, Weusthuis, R. A. 1999. Utilisation of Biomass for the Supply of Energy Carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52:741-755.
- Cornet P., Millet J., Béguin P, and Aubert J-P. 1983a. Characterization Of Two cel/(cellulose degradation) Genes Of *Clostridium thermocellum* Coding For Endoglucanases. *Biotechnology*. 1: 589-594.
- Cornet P., Tronik D., Millet J. and Aubert J-P. 1983b. Cloning And Expression In *Escherichia coli* Of *Clostridium thermocellum* Genes Coding For Amino Acid Synthesis And Cellulose Hydrolysis. *FEMS Microbiology Letters*. 16: 137-141.
- Jones, David T. and Wood, David R. 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbial Reviews*. 50 (4): 484-524.
- Leibovitz, E. and Béguin, P. 1996. A New Type of Cohesin Domain That Specifically Binds The Dockerin Domain Of The *Clostridium thermocellum* Cellulosome-Integrating Protein CipA. *Journal of Bacteriology*. 178. (11): 3077-3084.
- Marmur, J. 1961. A Procedure For The Isolation Of Deoxyribonucleic Acid From Microorganisms. *Journal of Molecular Biology*. 3: 208-218.
- Millet, J., Pétré, D., Béguin, P, Raynaud, O. and Aubert, J-P. 1985. Cloning of Ten DNA Fragments of *Clostridium thermocellum* Coding For Cellulases. *FEMS Microbiology Letters*. 29:145-149.
- Montoya, D., Arévalo, C., González, S., Aristizábal, F. and Schwarz, W. 2001. New Solvent Producing *Clostridium* spp. Strains hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Micro & Biotech Spec. Issue Clostridium* 2000. 27 (5): 329.

- Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., and Schwarz, W. 2000. Isolation of Mesophilic Solvent-Producing Clostridia From Colombian Sources: Physiological Characterization, Solvent Production And Polysaccharide Hydrolysis. *Journal Biotechnology*. 79:117-126.
- Montoya, D., Perdomo, L., Arévalo, C., Aristizábal, F. Schwarz, 2001. Caracterización de cepas nativas de *Clostridium spp* por secuenciación parcial del gen Ribosomal 16 s rARN. *Revista Colombiana de Biotecnología* II (1): 35-39.
- New Wnglad Biolabs Catalog*. 1998-1999. USA.
- Promega Life Science Catalog*. 2001. Madison. USA.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schwarz W. H., Schimming, S., Rücknagel K. P., Burgschweiger, S., Kreil, G., Staudenbauer, W. L. 1988. Nucleotide Sequence of The *celC* Gene Encoding Endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*. *Gene*. 63: 23-30.
- Teather, R. M., and 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.
- Tuka, K., Zverlov, V. V., Bumazkin, B. K., Velikodvorskaya, G. A., and Strongin A. Ya. 1990. Cloning and Expression of *Clostridium thermocellum* Genes Coding for Thermostable Exoglucanases (Cellobiohydrolases) In *Escherichia coli* Cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 169 (3): 1055-1060.
- Zappe, H., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Endoglucanase, Cellobiase and Amino Acid Biosynthesis Genes in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*. 132:1367-1372.