



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la expresión del proteoma
intracelular de una cepa nativa colombiana de
Clostridium sp. en condiciones de producción de
1,3-propanodiol**

Natalia Beatriz Comba González

Universidad Nacional de Colombia
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia

2011

**Evaluación de la expresión del proteoma
intracelular de una cepa nativa colombiana de
Clostridium sp. en condiciones de producción de
1,3-propanodiol**

Natalia Beatriz Comba González

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

Dolly Montoya Castaño MSc, PhD.

Línea de Microorganismos solventogénicos:

Grupo de Bioprocesos y Bioprospección

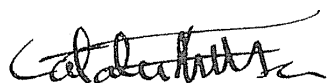
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia

2011

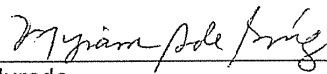
NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para grado de Maestría en Microbiología el 18 de agosto de 2011.

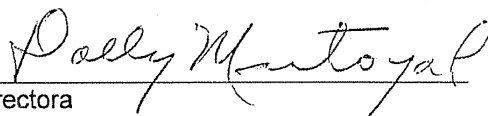
En constancia firman:



Jurado
Catalina Arévalo Ferro
Universidad Nacional de Colombia



Jurado
Myriam Sánchez de Gómez
Universidad Nacional de Colombia



Directora
Dolly Montoya Castaño
Universidad Nacional de Colombia

"A un ser humano se le puede quitar todo excepto una cosa, la última de sus libertades: elegir su actitud frente a cualquier circunstancia, elegir su camino..."

Victor Frankl

Para Violeta, Jerónimo, mi mamá, mi hermano

y mis amigos...

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo durante este largo camino. A mi mamá, amiga y compañera, gracias por estar ahí siempre, su ejemplo de valentía ante los problemas, amor a su familia y consagración al trabajo, influyó de manera determinante en mi formación personal y profesional, ella es y será por siempre lo más importante en mi vida. A Leo y Diana por su comprensión y a mis amados sobrinos por su cariño y por darle alegría a mi vida.

De manera muy especial agradezco a la Doctora Dolly Montoya, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por la confianza que depositó en mí, por su apoyo incondicional, así como por sus sabios y prudentes consejos durante todo este proceso.

Al Grupo de Hormonas de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por la Profesora Myriam Sánchez de Gómez, por su apoyo en los análisis proteómicos y su constante interés en el desarrollo del estudio. De manera muy especial quiero agradecer a Andrés Vallejo investigador de este grupo, quien estuvo conmigo de manera incondicional, se encargó de entrenarme en Proteómica y con su experiencia en el tema contribuyó de manera significativa en la estandarización de las metodologías implementadas en este estudio. Gracias también a Juan Carlos Alarcón, Diana Garay, Susana Nova, Mónica y Adriana Umaña por su ayuda durante mi estadía en su laboratorio.

A mis compañeros de la línea de Microorganismos Solventogénicos en particular a Mauricio Bernal, por sus importantes aportes, así como su apoyo desde mi ingreso al grupo.

Al laboratorio de Fermentaciones dirigido por la Ingeniera Nubia Moreno y de manera especial a Paula Arévalo por su apoyo durante las fermentaciones. Del mismo modo a Ana Lucia Castiblanco por su colaboración con el HPLC.

Al posgrado interfacultades de Microbiología por el apoyo económico otorgado para el análisis de algunos spots por espectrometría de masas y de manera especial a la profesora Marta Raquel Fontanilla, por su apoyo, sus enseñanzas y el cariño incondicional que siempre profesó hacia mí. A Socorro Prieto por su amable ayuda y su valiosa amistad.

A mis compañeros de la maestría Carlos Cruz, Julio Cesar Ríos, Diana Nieto, Erika García, Ana María Morales, Melissa Nuñez, Lizeth Moreno y Patricia Cifuentes con quienes comencé este reto que hoy termina. Y bueno a mis amigas de siempre, Jenny Rodríguez, Nancy Puentes, Ximena Pérez, Yamile Celis, Vanessa Flórez y mi profe Amparo Canosa, por estar ahí siempre y enriquecer mi vida con todas sus enseñanzas. Gracias por su amistad y apoyo incondicional. Las quiero!!!!

Para todos y para quienes no mencioné infinitas GRACIAS!!!!.

Resumen

En este trabajo se evaluó la expresión de las proteínas intracelulares, en la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B y en la cepa *Clostridium butyricum* DSM 2478, en dos fases del crecimiento bacteriano y en condiciones de producción de 1,3- propanodiol (1,3-PD), mediante análisis proteómicos por electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Los análisis efectuados permitieron encontrar diferencias en la expresión de proteínas entre las fases y cepas evaluadas. De los spots diferencialmente expresados, diez fueron identificados a través de análisis por espectrometría de masas en tandem, utilizando el método de mapeo peptídico. Se identificaron las enzimas: aspartato-semialdehído deshidrogenasa, aconiato hidratasa, glutamina sintetasa, trifosfato isomerasa, inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa, las proteínas ribosomales S2 y L10 y las enzimas: 1,3- propanodiol deshidrogenasa y 3- hidroxibutiril- coA- deshidrogenasa implicadas en la ruta metabólica de producción de 1,3-PD.

Palabras clave: *Clostridium* sp., proteoma, electroforesis bidimensional, espectrometría de masas.

Abstract

In this study was determine the expression of intracellular proteins in the native strain *Clostridium* sp. IBUN 158 B and in the strain *Clostridium butyricum* DSM 2478, in two phases of bacterial growth, in production conditions of 1,3-Propanediol (1,3-PD). Proteoma expression was analyzed by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Differences were found in the proteome expression between strains and phases. 10 spots differentially expressed in stages were identified with analysis in tandem mass spectrometry by the peptide mapping method. This results recorded the presence of enzymes: aspartate semialdehyde dehydrogenase, aconitate hydratase, glutamine synthetase, triosephosphate isomerase, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, ribosomal proteins S2 and L10, and the enzymes: 1,3-propanediol dehydrogenase and 3- hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, involved in the production of the solvent of interest (1,3-PD).

Keywords: *Clostridium* sp., Proteome, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIIIIII
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 1,3-Propanodiol.....	5
1.2 Producción bacteriana de 1,3-Propanodiol.....	6
1.3 Enzimas involucradas en la producción bacteriana de 1,3-Propanodiol.....	8
1.4 Proteómica.....	11
1.5 Proteómica en bacterias.....	12
1.6 Tecnologías en Proteómica.....	13
1.6.1 Electroforesis en dos dimensiones.....	13
1.6.2 Espectrometría de masas.....	14
1.6.2.1 Mapeo Peptídico.....	15
1.7 Antecedentes del IBUN en cuanto al estudio de clostridios solventogénicos..	16
2. Problema y Justificación.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1 Objetivos general.....	19
3.2 Objetivo específico.....	19
4. Materiales y métodos.....	20
4.1 Cepas.....	21
4.1.2 Obtención de los stocks de las cepas.....	21
4.1.3 Preparación del preinóculo e inóculo	22
4.2 Fermentaciones	22

4.2.1 Determinación de biomasa bacteriana.....	23
4.3 Perfiles de ácidos y solventes.....	24
4.4 Separación de las proteínas intracelulares.....	25
4.4.1 Obtención de los extractos de proteínas intracelulares	25
4.4.2 Cuantificación de las proteínas.....	27
4.4.3 Separación de las proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones.....	28
4.4.3.1 Isoelectroenfoque	28
4.4.3.2 Segunda dimensión (SDS PAGE).....	30
4.4.4 Fijación.....	31
4.4.5 Tinción.....	31
4.5 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas por espectrometría de masas.....	31
4.5.1 Análisis de los geles bidimensionales.....	32
4.5.2 Espectrometría de masas.....	32
4.6 Búsqueda de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS.....	36
5. Resultados.....	36
5.1 Diseño experimental.....	37
5.2 Fermentaciones.....	37
5.3 Determinación de ácidos y solventes por HPLC.....	38
5.4 Separación de las proteínas intracelulares.....	40
5.4.1 Electroforesis en dos dimensiones.....	40
5.5 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales.....	42
5.5.1 Perfiles de las proteínas diferencialmente expresadas.....	42
5.5.2 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas por espectrometría de masas.....	47
5.6 Búsqueda de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS.....	47
6. Discusión.....	49
6.1 Diseño experimental.....	49
6.2 Fermentaciones.....	49

6.3 Perfiles de ácidos y solventes por HPLC	51
6.4 Separación de las proteínas intracelulares.....	52
6.4.1 Electroforesis en dos dimensiones.....	53
6.5 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales.....	53
6.5.1 Perfiles de las proteínas diferencialmente expresadas.....	53
6.6 Asignación de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS.....	55
7. Conclusiones y recomendaciones.....	62
7.1 Conclusiones	62
7.2 Recomendaciones.....	63
8. Bibliografía.....	85

Anexos

Anexo 1: Espectro de masas de la proteína identificada como Aspartato- semialdehído deshidrogenasa.....	64
Anexo 2: Espectro de masas de la proteína identificada como Aconitasa hidratasa.....	67
Anexo 3: Espectro de masas de la proteína identificada como Glutamina sintetasa.....	69
Anexo 4. Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Inosin-5' monofosfato- eshidrogenasa.....	71
Anexo 5. Espectro de masas de la proteína identificada como 3- hidroxibutiril- coA deshidrogenasa.....	73
Anexo 6. Espectro de masas de la proteína identificada como 3- hidroxibutiril- coA deshidrogenasa.....	75
Anexo 7. Espectro de masas de la proteína identificada como Proteína Ribosomal S2.....	77
Anexo 8. Espectro de masas de la proteína identificada como Proteína Ribosomal L10.....	79
Anexo 9. Espectro de masas de la proteína identificada como 1,3- propanodiol deshidrogenasa.....	81
Anexo 10. Espectro de masas de la proteína identificada como Triosafofato isomerasa.....	83

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Rutas bioquímicas de la fermentación del glicerol.....	9
Figura 2. Diagrama de flujo general de los procedimientos a seguir para separar e identificar las proteínas intracelulares de la cepa nativa y la cepa control.....	20
Figura 3. Electroforesis en condiciones denaturantes de proteínas intracelulares expresadas en la fase exponencial de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	27
Figura 4. Diagrama de flujo general en el cual se ilustra el diseño experimental del estudio.....	37
Figura 5. Crecimiento de la cepa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	38
Figura 6. Cinética de fermentación de la cepa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	38
Figura 7. Cinética de fermentación de la cepa control <i>Clostridium butyricum</i> DSM 2478.....	39
Figura 8. Electroforesis bidimensional de extractos provenientes de la fase exponencial de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	41
Figura 9. Proteínas diferencialmente expresadas en la fase exponencial de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	43
Figura 10. Proteínas diferencialmente expresadas en la fase de latencia de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	43

Figura 11.	Perfiles de 12 proteínas diferencialmente expresadas en las dos fa fases de crecimiento de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	44
Figura 12.	Análisis booleano de los spots exclusivos de la fase exponencial de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	45
Figura 13.	Análisis booleano de los spots exclusivos de la fase de latencia de la cepa control <i>Clostridium butyricum</i> DSM 2478 y de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158 B.....	45
Figura 14.	Electroforesis bidimensional en la que se señalan los spots exclusivos de la fase de latencia en cada una de las cepas evaluadas.....	46
Figura 15.	Electroforesis bidimensional en la que se señalan los spots exclusivos de la fase de latencia y de la fase exponencial de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158.....	46
Figura 16.	Electroforesis bidimensional de proteínas provenientes de fase de latencia de la cepa nativa <i>Clostridium</i> sp. IBUN 158.....	48
Figura 17.	Electroforesis bidimensional de proteínas provenientes de la fase exponencial en la cepa control <i>Clostridium butyricum</i> DSM 2478.....	48

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición del medio RCM®.....	21
Tabla 2. Composición del medio TGY.....	22
Tabla 3. Composición del medio industrial.....	23
Tabla 4. Relación lineal de las calibraciones realizadas en el HPLC para la determinación de compuestos (sustratos y productos) en el medio de cultivo.....	24
Tabla 5. Determinación de parámetros de fermentación.....	40
Tabla 6. Características de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, mediante el método de mapeo peptídico.....	47

Introducción

La necesidad de obtener fuentes energéticas alternativas que sean amigables con el medio ambiente ha llevado a la expansión de la producción de biocombustibles, dentro de los que se encuentra el biodiesel, el cual se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo y mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación con la subsecuente producción de glicerina. A partir de este proceso se producen 10 toneladas de glicerina por cada 100 toneladas de biodiesel (Canacki and Sanli, 2008). El glicerol como subproducto pierde valor comercial debido a la presencia de impurezas cuya remoción implica un alto costo. Es por esto que en la actualidad se están generando tecnologías alternativas para su aprovechamiento que no requieren purificación, tal es el caso de la fermentación microbiana para producir compuestos de alto valor agregado como el 1,3 propanodiol (1,3-PD) (Saxena et al., 2009).

El 1,3-PD también llamado trimetilenglicol, es un compuesto orgánico con una amplia variedad de usos, puede emplearse como monómero para la síntesis de varios poliésteres y poliuretanos mejorando sus propiedades químicas y mecánicas, en el diseño de refrigerantes y tintas acuosas, en la fabricación de ciertos solventes, adhesivos, detergentes y cosméticos, así como en la producción de biocidas para la desinfección industrial y el tratamiento de aguas residuales (Papanikolaou et al., 2008).

La producción del 1,3-PD se realiza a través de vías químicas tales como la hidrólisis de la acroleína y la reacción de óxido de etileno con monóxido de carbono e hidrógeno. Sin embargo, dichos procesos resultan ser costosos, tóxicos y poco rentables para la industria. Debido al crecimiento de la demanda del 1,3-PD se han implementado mecanismos para su obtención por vía biotecnológica, los cuales se basan en la fermentación bacteriana realizada por microorganismos del género *Clostridium* y de la familia Enterobacteriaceae capaces de usar sustratos económicos tales como la glicerina

industrial (proveniente de la industria del biodiésel) y biotransformarlos en 1,3-PD con un rendimiento superior al de su síntesis química (Fonseca et al., 2009).

En respuesta a la necesidad de búsqueda y mejoramiento de cepas nativas productoras de solventes en especial de 1,3-PD con miras a optimizar el proceso biotecnológico y disminuir los costos de la fermentación bacteriana, el grupo de Bioprospección y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), dentro de su amplia trayectoria, aisló de 155 muestras de suelos de diferentes cultivos agrícolas a lo largo del territorio colombiano, 178 cepas del género *Clostridium*, de las cuales trece se comportaron como hiperproductoras de solventes (acetona, butanol, etanol y 1,3 propanodiol), cinco de estas trece fueron mayores productoras de 1,3-PD que la cepa de referencia *C. butyricum* DSM 523. En la actualidad los propósitos del grupo se encaminan hacia la búsqueda de conocimientos en lo concerniente a la proteómica y genómica del metabolismo del glicerol en las cepas nativas hiperproductoras, orientados hacia el desarrollo de estrategias en ingeniería metabólica que mejoren la calidad del proceso (Montoya, 2008).

El estudio de las proteínas desde el punto de vista biotecnológico se basa en el comportamiento dinámico del proteoma de un organismo en una condición determinada, caso contrario a lo que ocurre con la información genética que se comporta de manera estática. Es por esto que las secuencias de DNA y la expresión del RNA mensajero no suministran información acerca de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, su abundancia, estructura final y estado de actividad (Ogorzalek et al., 2005). El surgimiento de las tecnologías en proteómica, con una rápida y continua evolución ha hecho posible realizar un análisis global de las proteínas y su expresión en un ambiente particular (Cordwell, 2006; Cho, 2007).

Las investigaciones en proteómica tienen importantes aplicaciones a nivel biotecnológico e industrial a la hora de incrementar el rendimiento de un producto y en la búsqueda de las propiedades deseadas (Gupta and Lee, 2007). De esta manera, la producción de sustancias de reconocida importancia comercial como el 1,3-PD a partir de glicerol por

parte de enterobacterias, lactobacilos y clostridios, podría verse favorecida si se conoce la expresión de las enzimas involucradas en las rutas metabólicas utilizadas por las bacterias para transformar el glicerol en 1,3-PD. En el presente trabajo se propuso evaluar la expresión del proteoma intracelular de la cepa nativa colombiana *Clostridium* sp. IBUN 158 B y de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478, en dos fases del crecimiento bacteriano y en condiciones de cultivo que favorecen la producción de 1,3-PD, en geles de dos dimensiones de alta reproducibilidad. Posteriormente se analizó, la expresión diferencial de las proteínas obtenidas y finalmente se llevó a cabo la identificación de algunas de éstas mediante análisis por espectrometría de masas en tándem.

1. Marco Teórico

1.1 1,3- Propanodiol

El 1,3-PD o trimetilen glicol es un compuesto intermediario usado como monómero para nuevos poliésteres y plásticos biodegradables, en los cuales es posible modificar sus propiedades físicas, con el fin de obtener los productos deseados. Hacia 1995 la situación del mercado del 1,3-PD cambió de modo significativo cuando la compañía Shell anunció la comercialización de un nuevo poliéster llamado Corterra™ PTT compuesto por ácido tereftálico y 1,3-PD. Este nuevo polímero politrimetilentereftalato (PTT), combina excelentes propiedades de resistencia con una producción favorable en términos ambientales. Cabe destacar que ésta es una tecnología en ascenso y que el 1,3-PD es usado directamente por los productores del mismo, pero no se vende en el mercado como materia prima (Saxena *et al.*, 2009).

Para cumplir con la demanda comercial, la producción de 1,3- PD se ha venido realizando mediante vías químicas y biotecnológicas. Químicamente se produce en empresas como DuPont en cuyo proceso se parte de acroleína para generar hidroxopropionaldehído (HPA) el cual es posteriormente hidrogenado hasta 1,3-PD. Otro proceso es el realizado por Shell (empresa encargada de la mayor producción mundial), en el cual se promueve la reacción entre óxido de etileno con monóxido de carbono o hidrógeno (hidroformilación). El compuesto obtenido se extrae y posteriormente pasa por un proceso de hidrogenación (Fonseca *et al.*, 2009). Se sabe que la producción de 1,3-PD a partir de acroleína no excede el 40 % mientras que a partir de óxido de etileno es de alrededor del 80 %, por otro lado, se estima que para el 2015, la síntesis a través de la vía biotecnológica sea del 15 % aproximadamente (Saxena *et al.*, 2009).

Si bien la síntesis química es importante en la producción industrial del 1,3- PD su implementación ha traído problemas debido a factores como el uso de altas presiones junto con elevadas temperaturas durante los procesos de hidroformilación e hidrogenación, sumado a esto, los catalizadores utilizados en las reacciones presentan costos elevados; así mismo, la emisión de tóxicos al ambiente durante el proceso contribuye a la contaminación de los recursos naturales. Con el propósito de mejorar la producción de 1,3-PD, los esfuerzos se han encaminado hacia la síntesis biotecnológica basada en sustratos económicos, un ejemplo, es la empresa DuPont, que ha desarrollado una cepa de *Escherichia coli* capaz de obtener 1,3- PD a partir del proceso fermentativo del jarabe de maíz. Este polímero a base de maíz se denomina Sorona™ y tiene como características además de provenir de una fuente natural el conferir a los productos propiedades como suavidad y resistencia al estiramiento (Saxena *et al.*, 2009).

1.2 Producción bacteriana de 1,3- Propanodiol

La producción de biocombustibles ha ido en aumento a nivel mundial al constituirse como una fuente energética renovable, tal es el caso del biodiesel cuya síntesis genera subproductos como el glicerol con aplicaciones industriales. El glicerol puede ser biotransformado a 1,3-PD, que como se mencionó anteriormente es un solvente con importantes aplicaciones en la industria química y textil. Esta conversión puede llevarse a cabo por bacterias dentro de las que se encuentran enterobacterias como *Klebsiella* sp. (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* sp. (*E. agglomerans*) y *Citrobacter* sp. (*C. freundii*), además de bacilos gram positivos como *Lactobacillus* y *Clostridium* (*C. butyricum* y *C. pasteurianum*) (Ping and Biebl, 2002). Cabe destacar que una las mejores productoras naturales en términos de rendimiento y productividad es la especie *C. butyricum*, así mismo, la ventaja más importante que ofrece esta cepa frente a las demás es su inocuidad, debido a que no se requieren los cuidados de manipulación que se deben tener cuando se trabaja con bacterias patógenas. Así mismo, desde el punto de vista económico, se ha demostrado que la enzima glicerol deshidratasa de *C. butyricum* la cual

cataliza la reacción de deshidratación del glicerol a 3-hidroxiacetaldehído en la formación de 1,3- PD por la vía reductiva (Figura 1), es independiente de la coenzima B12, lo que es relevante en términos de costos para los procesos de fermentación (González *et al.*, 2004).

Se sabe que estos microorganismos utilizan el glicerol a través de dos rutas metabólicas (Figura 1). Una, es la ruta oxidativa en la que el glicerol es deshidrogenado a dihidroxiacetona que después de una fosforilación puede convertirse en piruvato, intermediario a partir del cual se producen ácidos o solventes. La otra, es una conversión reductiva y consiste en la deshidratación del glicerol a 3-hidroxiacetaldehído, con la posterior reducción del aldehído a 1,3-PD (Biebl *et al.*, 1999).

El glicerol puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía, la toma de este sustrato tiene la ventaja de no requerir consumo energético debido a que pasa a través de la membrana plasmática por difusión pasiva con la participación de la proteína facilitadora del transporte de glicerol (GlpF) (Da Silva *et al.*, 2009). En condiciones anaeróbicas el 1,3-PD es sintetizado cuando hay disponibilidad de glicerol, de esta manera por cada 3 moléculas de glicerol una es utilizada en la ruta oxidativa de síntesis de 1,3-PD y las otras dos para su producción por la vía reductora. La vía oxidativa del metabolismo es requerida para la formación de ATP, conlleva a la producción de acetato y está asociada con la incorporación de átomos de carbono en la biomasa celular. La vía reductora tiene como finalidad oxidar los equivalentes reductores liberados durante la formación de dihidroxiacetona y la posterior oxidación de la dihidroxiacetona-3- fosfato. La regeneración de NAD^+ a partir de las dos moléculas de NADH_2 formadas, requiere de la síntesis de un subproducto que sirva como aceptor de electrones, es por esto que para solucionar tal requerimiento redox, el glicerol es convertido a 3-hidroxiacetaldehído, el cual es reducido a 1,3-PD en una reacción dependiente de NADH_2 (Figura 1) (Saxena *et al.*, 2009).

La fermentación del glicerol en las enterobacterias conduce a la acumulación de dos productos principales el 1,3-PD y el acetato, mientras que como subproductos se obtienen lactato, formato, succinato y etanol, producidos dependiendo de las condiciones de cultivo. Por otra parte, en el caso de los clostridios el principal producto de la

fermentación es el 1,3-PD y como subproductos se obtienen dos ácidos (butirato y acetato), además de CO₂ e H₂ (Fonseca *et al.*, 2009).

Los rendimientos de energía y productos de la vía del 1,3-PD se encuentran ligados con la formación de acetato y/o butirato, procesos en los cuales se genera ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato (Figura 1). Por su parte, la formación de ácidos disminuye la disponibilidad de NADH en el medio, es por esto que la síntesis de 1,3-PD, se ve favorecida por la producción acetato, teniendo en cuenta que para generar butirato se consume un mayor número de moléculas de NADH (White, 1995). Es de destacar que en microorganismos del género *Clostridium* las fuentes de poder reductor (NADH) son: la formación de biomasa (dado que el glicerol es más reducido que la biomasa de composición promedio C₄H₇O₂N), la conversión de glicerol a dihidroxiacetona y la disponibilidad de ferredoxina unida a moléculas de hidrógeno para reducir el NAD⁺ oxidado (Biebl *et al.*, 1992).

1.3 Enzimas involucradas en la producción bacteriana de 1,3-Propanodiol

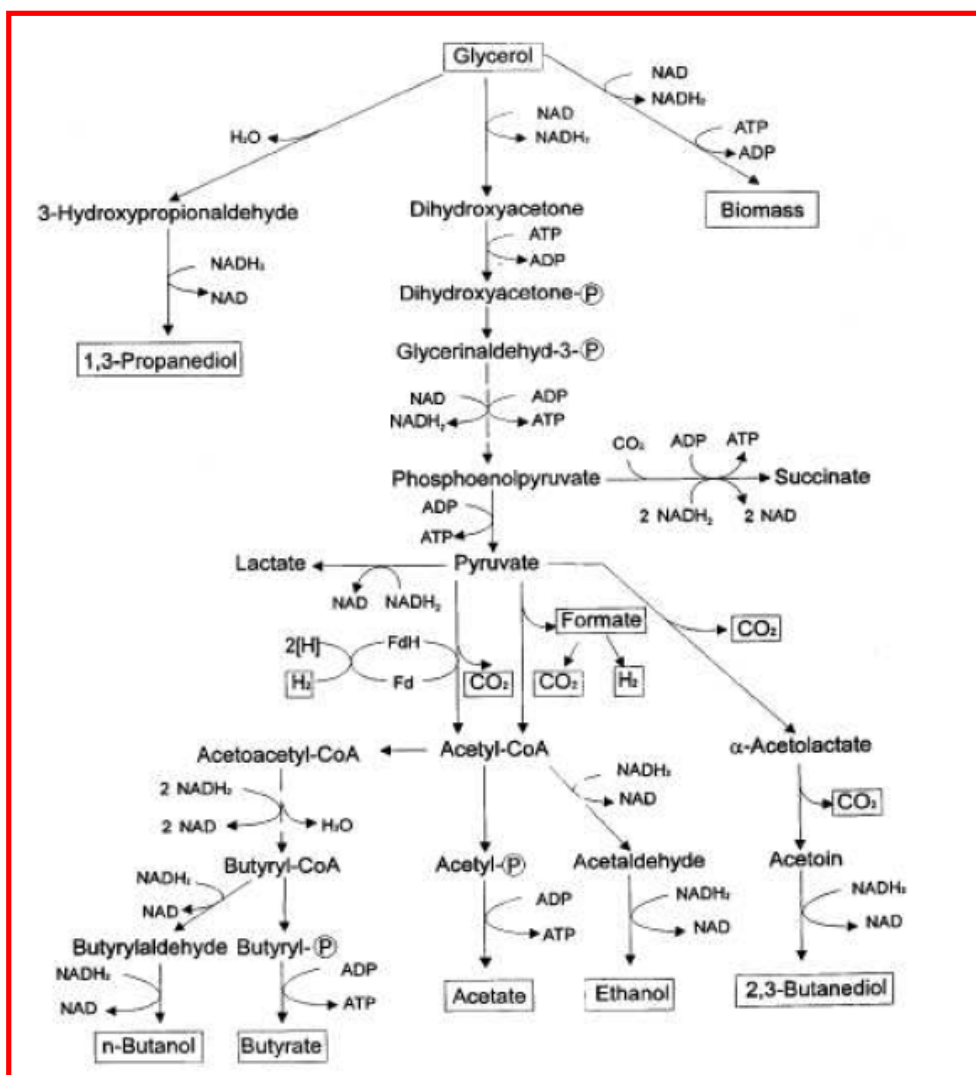
En un cultivo de microorganismos, el crecimiento solo comienza tras un periodo de tiempo que constituye la llamada fase de latencia, en la cual ocurre la síntesis de las enzimas requeridas para el crecimiento celular, la utilización de los nutrientes presentes en el medio del cultivo y la producción de los metabolitos esenciales ausentes en el mismo (Madigan *et al.*, 2009). Por lo tanto es en esta fase en la que se sintetiza la maquinaria enzimática necesaria para las rutas oxidativa y reductiva de síntesis de 1,3-PD.

Posterior a esta fase ocurre el crecimiento exponencial, el cual se ve disminuido por factores como la limitación de un nutriente esencial en el medio de cultivo o la acumulación de productos de desecho que alcancen niveles inhibitorios para las funciones celulares. En este punto comienza la fase estacionara en la cual no hay ni aumento ni descenso en el número de células y aunque puede haber crecimiento

bacteriano, también se da la muerte celular, de modo que se produce un equilibrio entre ambos procesos (Madigan *et al.*, 2009)

De las enzimas sintetizadas en la fase de latencia, existen alrededor de 25 que participan en las dos vías de producción de 1,3-PD (Figura 1), en la ruta oxidativa el glicerol establece una interacción del tipo enzima-sustrato con la enzima glicerol deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , la cual cataliza la reacción de oxidación que conduce a la formación de dihidroxiacetona (DHA), posteriormente se produce la fosforilación de DHA llevada a cabo por la enzima DHA-quinasa generando un compuesto denominado dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Reimann *et al.*, 1998).

Figura 1. Rutas bioquímicas de la fermentación del glicerol (Biebl *et al.*, 1999)



Como paso siguiente en la ruta metabólica una triosafosfato isomerasa cataliza la formación de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a partir de DHAP, el G3P se transforma en fosfoenolpiruvato que se convierte en piruvato generando una molécula de ATP. El piruvato puede entonces emplearse para la generación de acetil-CoA con la intervención de la enzima piruvato ferredoxina- oxidoreductasa, que además de controlar el flujo de electrones interviene en la regeneración de cofactores NAD^+ / NADH_2 lo que produce a su vez un descenso en la concentración de hidrógeno. En esta parte de la ruta también intervienen las enzimas ferredoxina- NADH_2 oxidoreductasa, ferredoxina-NADPH oxidoreductasa, rubredoxina-NADH oxidoreductasa y la enzima hidrogenasa (Reimann *et al.*, 1998).

A partir de acetil-CoA se producen tanto ácidos orgánicos como solventes; por una parte puede generarse acetato con ayuda de la enzima fosfato acetil transferasa que cataliza la transformación de acetil-CoA en acetil-fosfato y luego de la enzima acetato quinasa que cataliza la formación de acetato. Así mismo, es posible generar butiril-CoA mediante la acción de la enzima tiolasa (acetil-CoA- acetil transferasa), la cual cataliza la formación de acetoacetil-CoA que posteriormente pasa a 3- hidroxibutiril-CoA con la participación de la enzima 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, luego con ayuda de la enzima crotonasa se forma crotonil-CoA y finalmente butiril-CoA gracias a la enzima butiril-CoA deshidrogenasa. Desde butiril-CoA es posible la formación de butiraldehído reacción catalizada por la enzima butiraldehído deshidrogenasa que da paso a la producción de butanol, mediada por la acción de la enzima butanol deshidrogenasa, de igual modo, a partir de butiril-CoA es posible obtener butiril fosfato en una reacción catalizada por la enzima fosfato- butiriltransferasa y luego butirato con ayuda de la enzima butirato quinasa. Finalmente, la producción de etanol a partir de acetil-CoA comienza con la generación de acetaldehído reacción catalizada por la enzima acetaldehído deshidrogenasa y luego la formación de etanol a través de la etanol deshidrogenasa (Biebl *et al.*, 1999).

Por otra parte en la ruta reductiva ocurre la interacción entre la enzima glicerol deshidratasa y el glicerol lo que produce su transformación a 3-hidroxipropionaldehído

(3HPA), el cual es posteriormente reducido a 1,3- PD por la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa dependiente de NADH cuya reacción resulta en la regeneración de un NAD^+ (Biebl *et al.*, 1999).

1.4 Proteómica

El concepto de “Proteoma” fue inicialmente propuesto por Wilkins en el año 1995 para referirse al equivalente protéico del genoma. Con el auge de las proteínas surge entonces la necesidad de profundizar en su conocimiento, por lo que nace la disciplina denominada “Proteómica”, ciencia que se ocupa del estudio de todas las proteínas producidas por células y organismos en una condición determinada (Cho, 2007).

La proteómica abarca un amplio rango de temas, es por esto que se divide en varias ramas especializadas en el estudio de aspectos particulares, así la proteómica funcional se ocupa de la descripción de los cambios en la expresión de las proteínas durante diferentes mecanismos celulares tales como la diferenciación, la proliferación y la señalización, entre otros. Por otra parte, la proteómica estructural identifica la estructura molecular, determina la secuencia de aminoácidos y representa la localización de las proteínas a nivel celular, comparando esta información con la suministrada en las bases de datos existentes (Lefkovits, 2003; Dhingra *et al.*, 2005; Lee, 2001).

En la mayoría de los casos el estudio de las proteínas implica dos etapas, la primera de éstas se lleva a cabo mediante procedimientos de electroforesis en dos dimensiones, con el fin realizar un análisis comprensivo de los componentes protéicos de las células vivas en una condición específica. La segunda etapa, es la evaluación cuantitativa de las proteínas previamente separadas a través de la determinación de sus masas moleculares con ayuda de la tecnología de espectrometría de masas (Gygi and Aebersold, 2000; Bunai and Yumane, 2005). De esta manera, la electroforesis en dos dimensiones y la espectrometría de masas representan una tecnología integrada por medio de la cual se pueden separar, detectar y cuantificar las proteínas en una sola operación (Anderson *et al.*, 2000; Natarajan *et al.*, 2009).

Genes y proteínas interactúan a nivel estructural, evolutivo, funcional y metabólico, lo que resulta en un inmenso flujo de información. Es así como, la bioinformática sirve como un puente entre las observaciones realizadas en diversas disciplinas biológicas y los conocimientos relacionados con la comprensión del funcionamiento de los sistemas o procesos para su subsiguiente aplicación. En proteómica, la bioinformática se ha constituido como una parte integral en procedimientos como el almacenamiento de la información en bases de datos y su posterior interpretación (Dhingra *et al.*, 2005).

1.5 Proteómica en bacterias

En bacterias es posible lograr dos aproximaciones a través de los estudios en proteómica, la primera se basa en aspectos relacionados con la identificación de las proteínas, su distribución a nivel celular, así como la determinación de su abundancia relativa (Everley *et al.*, 2009; Osman *et al.*, 2009). La segunda aproximación es del tipo diferencial y consiste en la comparación de patrones de proteínas de una cepa dada sometida a diferentes condiciones ambientales, con el fin de identificar aquellas proteínas diferencialmente expresadas. Ejemplos de este tipo de aproximación son los estudios realizados en *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*, en las cuales se ha podido evaluar la expresión del proteoma bajo distintas condiciones (Champomier *et al.*, 2002; Bunai and Yumane, 2005; Kashino *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Otro de los campos en los que se aplica la proteómica es en el estudio de bacterias patógenas, se busca identificar proteínas relacionadas con resistencia a antibióticos y producción de toxinas. Adicionalmente se indaga acerca de nuevos blancos para medicamentos y se establecen los efectos que éstos tienen sobre la fisiología celular o el mecanismo de patogenicidad (Yamakawa, 1996; Grandi, 2001; Karlsoon, 2003; Al- Khaldi and Mossoba, 2004; Sawires and Songer, 2006; Everley *et al.*, 2009; Muetzelburg *et al.*, 2009).

En *Clostridium* los primeros estudios en proteómica se centraron en analizar la respuesta de *C. acetobutylicum* bajo condiciones de estrés ambiental y comparar estos resultados con los cambios en los patrones de síntesis de proteínas producidos por el paso de acidogénesis a solventogénesis, fases que se presentan generalmente en las fermentaciones de *Clostridium* sp. (Terracciano *et al.*, 1988; Pich *et al.*, 1990). A partir de entonces las investigaciones se encaminaron hacia la evaluación de la expresión del proteoma en diferentes especies de *Clostridium* bajo condiciones ambientales específicas (Narberhaus *et al.*, 1994; Denger, 1996; Flengsrud and Skjeldal, 1998; Shaffer, 2002). De igual manera las tecnologías en proteómica fueron implementadas para el estudio de la fisiología y patogenicidad de cepas como *C. botulinum*, *C. perfringes* y *C. difficile* (McClane and Rood, 2001; Mukherjee, 2002; Karlsson, 2003). En la actualidad las perspectivas de los estudios de proteómica en clostridios se han encaminado hacia la optimización de las metodologías empleadas para la preparación de las fracciones protéicas (Schwarz *et al.*, 2007); la separación de las proteínas y su posterior identificación utilizando técnicas de espectrometría de masas como MALDI-TOF (láser de desorción/ ionización asistido por matriz-analizador por tiempo de vuelo) (Muetzelburg *et al.*, 2009; Everley *et al.*, 2009). Sin embargo; es importante destacar que el enfoque que presenta este trabajo no se conoce en la literatura y por ende la información obtenida es un aporte novedoso al estudio de los clostridios productores de 1,3-PD.

1.6 Tecnologías en Proteómica

1.6.1 Electroforesis en dos dimensiones

La técnica de electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida ha demostrado ser un método eficiente para la separación de un gran número de proteínas presentes en una determinada muestra (Cho, 2007). La primera dimensión se basa en el isoelectroenfoco, un método electroforético que separa proteínas de acuerdo a su carga, ya que éstas al ser moléculas anfotéricas, es decir que tienen carga neta positiva, negativa o cero, (dependiendo de su composición de aminoácidos y del pH del medio circundante) migran en un gradiente de pH hasta encontrar el valor en el cual su carga

neta es nula. En la segunda dimensión la separación se realiza dependiendo del tamaño de las proteínas, de manera que al final del proceso se obtiene un gel con múltiples sitios protéicos (spots) separados de acuerdo a su punto isoeléctrico en la dirección horizontal y a su tamaño en la dirección vertical (Dhingra *et al.*, 2005).

Los patrones de las imágenes para las diferentes muestras pueden ser comparados manualmente o usando programas disponibles comercialmente con el fin de identificar los sitios protéicos que son cualitativamente diferentes o que se encuentran sobre o sub expresados; ejemplos de dichos software son: Melanie 3, producido por GeneBio, PDQuest producido por Bio-Rad® e ImageMaster producido por Amersham Pharmacia Biotech (Hebestreit, 2001).

Cabe anotar que para mejorar los resultados y no subestimar la presencia de las proteínas menos representativas, resulta útil fraccionar las muestras, aún más si se considera que la tecnología de electroforesis en dos dimensiones es menos sensible cuando se trata de proteínas alcalinas e hidrofóbicas, con tamaños superiores a los 200 kDa. De modo que esta técnica funciona mejor cuando se trata de proteínas denaturadas con tamaños entre 7 y 200 kDa y que tengan un pH óptimo entre 3.5 y 11.5 (Hebestreit, 2001).

1.6.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se aplicó por primera vez en el año 1970 con propósitos de caracterización microbiana, desde entonces se ha venido usando para la detección de lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos bacterianos, es mayormente utilizada en la determinación de diferencias a nivel del proteoma de bacterias estrechamente relacionadas, en la detección de modificaciones post- traduccionales y en la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de las proteínas separadas (Everley *et al.*, 2009).

Esta tecnología consiste en determinar la proporción masa/carga (m/z) de moléculas individuales en fase gaseosa a través de la observación de su trayectoria a lo largo de un campo magnético o eléctrico. Un espectrómetro de masas acopla varios sistemas funcionando en conjunto, primero está el ionizador que como su nombre lo indica es el encargado de ionizar la muestra, una vez los iones son formados, pueden ser separados de acuerdo a su proporción m/z y finalmente detectados por sistemas de amplificación acoplados a computadores que generan imágenes de acuerdo a las señales obtenidas (Cho, 2007).

En proteómica el sistema más utilizado en espectrometría de masas se conoce como MALDI-TOF, en el cual la proteína a analizar se suspende en una matriz de estructura cristalina formada por pequeñas moléculas orgánicas capaces de absorber los rayos UV empleados para la ionización. De esta manera, cuando la energía láser impacta la matriz, causa una rápida excitación de la misma que se transmite a la proteína haciendo que se formen cationes radicales con un electrón desapareado ($M+H^+$). Los iones generados son acelerados por un campo electrostático y expulsados dentro de un tubo de vuelo, los cuales al salir del tubo se encuentran con el analizador de masas o analizador de tiempo de vuelo (TOF: time of flight), que se basa en el principio que establece que al acelerar el ión a través de un voltaje constante, la velocidad con la cual éste alcanza el detector depende de su masa; así los iones más livianos tardarán menos tiempo en llegar al final del tubo mientras que los más pesados llegaran después. Finalmente, las señales obtenidas son convertidas en pulsos eléctricos y representadas por picos en espectrogramas de masas (Dhingra *et al.*, 2005; Resing and Ahn, 2005).

1.6.2.1 Mapeo Peptídico

Uno de los métodos más utilizados para la identificación de proteínas partiendo de datos provenientes de espectrometría de masas, es el Mapeo Peptídico. En esta técnica, la proteína desconocida que ha sido separada mediante electroforesis bidimensional, es hidrolizada (mediante proteasas específicas de secuencia, como la tripsina) en pequeños péptidos cuyas masas absolutas pueden determinarse a través de un espectrómetro de masas como el MALDI-TOF/ TOF. Las masas obtenidas son comparadas con una base de datos de proteínas cuya secuencia es conocida. Del mismo modo, mediante un

enfoque *in silico* es posible utilizar la información genómica del organismo de interés, empleando software capaces de traducir las secuencias nucleotídicas del genoma (depositadas en las bases de datos) a secuencias de aminoácidos. Contando con esta información, el paso a seguir es cortar teóricamente la secuencia de la cadena polipeptídica y calcular las masas absolutas de los péptidos hallados. Finalmente, estas masas son comparadas con las masas obtenidas experimentalmente, con el fin de establecer semejanzas y determinar la posible identidad de la proteína desconocida, de una manera estadísticamente significativa (Resing and Ahn, 2005).

1.7 Antecedentes del IBUN en cuanto al estudio de clostridios solventogénicos

El grupo de Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia comprende cuatro líneas de investigación, la de solventes, la de biofertilizantes, la de caucho natural y la de biopolímeros. La línea de solventes inició sus actividades estandarizando las condiciones de aislamiento y cultivo de microorganismos anaerobios con la cepa de referencia *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Luego hacia mediados de la década de los ochenta se aislaron 178 cepas de *Clostridium* sp. a partir de 155 muestras provenientes de diferentes cultivos agrícolas, de las cuales 13 cepas presentaron una mayor producción de solventes como acetona, butanol, etanol y 1,3 propanodiol con respecto a las cepas de referencia (*C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. butyricum* DSM 2478). Posteriormente, se evaluó la capacidad de estas cepas para utilizar diferentes tipos de polisacáridos, con resultados positivos para varios de los sustratos evaluados (Montoya *et al.*, 2001). También se realizaron estudios relacionados con la taxonomía de las cepas nativas utilizando ensayos moleculares tales como la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S rARN (Montoya *et al.*, 2000), caracterización por perfiles plasmídicos (Arévalo *et al.*, 2002), PFGE (Electroforesis en Gel de Campo Pulsado) (Quilaguy *et al.*, 2006), hibridación ADN-ADN, perfiles de macrorestricción y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism). Posteriormente se diseñó un análisis multivariado de las técnicas de caracterización genotípicas y fenotípicas y se demostró

que varias de estas cepas estaban en un nodo taxonómico diferente al de las cepas de referencia *C. butyricum* DSM 2478 y DSM 523 y por consiguiente se propusieron como nueva especie de *Clostridium* sp. (Jaimes *et al.*, 2006).

Así mismo se evaluó la capacidad de estas cepas para producir 1,3-PD a partir de glicerol sin necesidad de adicionar coenzima B12, aunque para todas se encontró producción de 1,3-PD, dos de éstas (IBUN 158B y 13A) presentaron altos rendimientos en comparación con la cepas de referencia (Cárdenas *et al.*, 2006). De esta manera, con el fin de optimizar los procesos de fermentación se evaluaron diferentes condiciones en el medio de cultivo y además se utilizó glicerina co-producto de la industria de producción de biodiesel (Pérez, 2009).

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de caracterización molecular de las cepas promisorias, con el fin de obtener la secuencia de los genes involucrados en la producción de 1,3-PD. Actualmente, se tienen avances acerca de la organización del operon *dha* encargado de la regulación genética de la producción del solvente en la cepa nativa IBUN 13A y se cuenta con la secuencia de una región del genoma de la cepa IBUN 158B de 4556 pb que contiene tres genes potenciales identificados como *dhaB1*, *dhaB2* y *dhaT* que codifican para las enzimas glicerol deshidratasa, activadora de la glicerol deshidratasa y 1,3-PD deshidrogenasa, respectivamente (Montoya, 2009). Dentro de las proyecciones en el estudio de clostridios solventogénicos está la realización de investigaciones que permitan generar conocimientos preliminares acerca de la bioquímica, genética y proteómica del proceso con el fin de hacer de este un bionegocio exitoso (Montoya, 2008).

2. Problema y Justificación

Uno de los propósitos en la industria encargada de la producción de 1,3-PD es el mejoramiento del mecanismo biotecnológico. Es por esto que para optimizar el proceso, las investigaciones se han centrado en aspectos como la manipulación genética de los microorganismos productores, además de variaciones en las condiciones de fermentación (Saxena *et al.* 2009). El grupo de Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia cuenta con cepas nativas de *Clostridium* sp. con potencial para producir 1,3-PD a partir de glicerol, en la actualidad sus investigaciones están encaminadas hacia la generación de conocimiento en aspectos relacionados con genómica y proteómica en el mecanismo de producción de 1,3-PD (Montoya 2008). En el caso particular de los estudios en proteómica, el análisis diferencial de los niveles de expresión de las proteínas durante la producción de 1,3-PD puede constituirse como una estrategia importante en la meta de hacer de la producción biotecnológica de dicho solvente una alternativa rentable. Como contribución a este propósito con el presente trabajo se pretende dar respuesta al siguiente interrogante:

¿Existen diferencias en cuanto a los niveles de expresión de las proteínas intracelulares de una cepa nativa colombiana de *Clostridium* sp. en condiciones de producción de 1,3-PD?. Para responder esta pregunta de investigación se realizaron comparaciones entre las proteínas expresadas en dos puntos de la curva de crecimiento bacteriano, uno al final de la fase de latencia y el otro al culminarse la fase exponencial, periodo en el cual la producción de 1,3-PD es máxima.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de las proteínas intracelulares de una cepa nativa colombiana de *Clostridium* sp. bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio para la producción de 1,3 propanodiol.

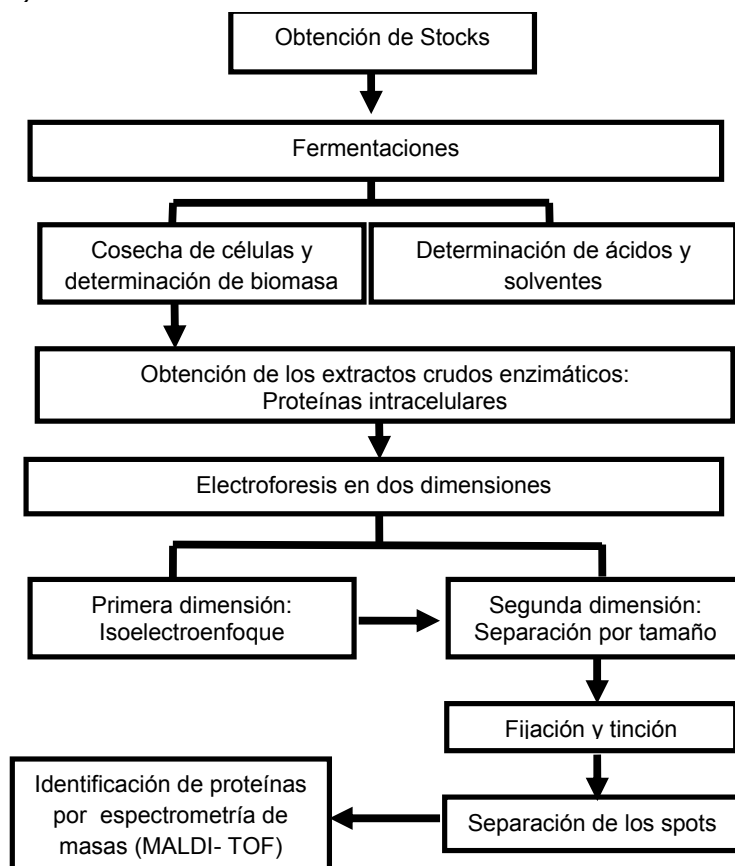
3.2 Objetivos Específicos

- Separar las proteínas intracelulares de acuerdo a su carga y a su tamaño utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones.
- Determinar el peso molecular de las proteínas separadas a través de la tecnología de espectrometría de masas: láser de desorción / ionización asistido por matriz - analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF).
- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas implicadas en la ruta metabólica del 1,3-PD, a través de la tecnología MALDI-TOF acoplada a herramientas bioinformáticas.

4. Materiales y Métodos

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas intracelulares implicadas en la ruta metabólica del 1,3-PD, se trabajó de acuerdo a los procedimientos descritos en el siguiente esquema (Figura 2), que se explican detalladamente a lo largo del texto en las secciones posteriores.

Figura 2. Diagrama de flujo general de los procedimientos a seguir para separar e identificar las proteínas intracelulares de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B y de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478.



4.1 Cepas

Se emplearon dos cepas provenientes del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. La cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158B, que presenta mayor producción de 1,3-PD en comparación con las bacterias de referencia (Cárdenas *et al.*, 2006) y la cepa *Clostridium butyricum* DSM 2478 que se utilizó como control. Cabe anotar que la cosecha de las células se realizó en dos puntos de la curva de crecimiento, uno de los cuales correspondió al final del periodo de latencia o periodo *lag*, etapa de adaptación de la célula a los cambios de su ambiente fisicoquímico y el otro punto al final del periodo de crecimiento exponencial en donde la producción de 1,3-PD alcanza su mayor nivel.

4.1.2 Obtención de los stocks de las cepas

La inoculación se llevó a cabo al 7.5% en viales con 100 ml de medio de cultivo RCM® cuya composición se muestra en la Tabla 1; a continuación se procedió a la activación de las esporas mediante un choque térmico, sometiendo los viales inoculados primero a una temperatura de 80°C por 15 minutos y luego a 0°C durante otros 15 minutos. Transcurrido este tiempo los viales se llevaron a incubar a 37° C durante 24 horas.

Tabla 1. Composición del medio RCM®

Ingredientes	g/l
Extracto de levadura	3
Extracto de carne	10
Extracto de peptona	5
Almidón	1
D-glucosa	5
L-cisteína	0,5
Cloruro de sodio	5
Acetato de sodio	3
Agar- agar	12,5

4.1.3 Preparación del preinóculo e inóculo

La preparación del preinóculo de cada fermentación se realizó con base en el protocolo sugerido por Montoya y colaboradores (2000), de este modo se tomó del stock un volumen de 3 ml que fue inyectado en un vial con 40 ml de medio de cultivo RCM estéril (Tabla 1). Luego se procedió a activar las cepas sometiendo los viales inyectados a un choque térmico, primero a una temperatura de 70°C por 10 minutos y luego a una inmersión en un baño de agua - hielo durante el mismo tiempo (10 minutos). Posteriormente, estos preinóculos se cultivaron por 12-14 horas a 200 rpm y 37°C con el fin de obtener una densidad óptica de aproximadamente 2,5. Para preparar el inóculo se tomaron 3 ml del preinóculo y se inyectaron en viales con 40 ml de medio TGY al cual se le reemplazó la fuente de carbono original (glucosa) por glicerol (Tabla 2). Posteriormente los viales se colocaron en el agitador a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0.

Tabla 2. Composición del medio TGY

Ingredientes	g/l
Extracto de levadura	5
Triptona	8,5
K ₂ HPO ₄	1
L-cisteína	0,5
Glicerol	50

4.2 Fermentaciones

Las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado en un reactor RAF Plus Bioengineering AG bajo condiciones de anaerobiosis por burbujeo constante con

nitrógeno N_2 , un volumen efectivo de trabajo de 4 litros y un porcentaje de inóculo del 10%, el medio de cultivo utilizado fue medio industrial cuya composición se describe en la Tabla 3, este es el resultado de la modificación de un medio estandarizado previamente en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia para la fermentación acetobutílica. Las concentraciones de glicerol, vitaminas y las fuentes nitrogenadas inorgánica y orgánica fueron las optimizadas por Pérez (2009). Se mantuvieron condiciones controladas con una temperatura de $37^\circ C$, 200 rpm y pH 7. Para determinar los puntos de toma de muestras, correspondientes a las dos fases de crecimiento evaluadas, se llevaron a cabo fermentaciones previas en el reactor con la cepa control y la cepa nativa y se construyeron las curvas de crecimiento para cada una de éstas.

Tabla 3. Composición del medio industrial para las fermentaciones en el reactor de 4L

Ingredientes	Concentración
Glicerol ($g.l^{-1}$)	50
Extracto de levadura ($g.l^{-1}$)	2
$(NH_4)_2SO_4$ ($g.l^{-1}$)	4
L-cisteína clorhidrato ($g.l^{-1}$)	0,5
KH_2PO_4 ($g.l^{-1}$)	1
K_2HPO_4 ($g.l^{-1}$)	1
Biotina ($mg.l^{-1}$)	4
PABA ($mg.l^{-1}$)	3
Stock de minerales Composición:	
$MgCl_2$ (5 $g.l^{-1}$), $CaCl_2$ (3 $g.l^{-1}$), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (3,7 $g.l^{-1}$), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (3,3 $g.l^{-1}$), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (3,8 $g.l^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot (1,3 g.l^{-1})$, Zn_2SO_4 (2,8 $g.l^{-1}$), H_2BO_3 (0,12 $g.l^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,18 $g.l^{-1}$), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,13 $g.l^{-1}$)	4

4.2.1 Determinación de biomasa bacteriana

En las fermentaciones, se tomaron 3 ml de muestra (por triplicado), a los cuales se les midió la absorbancia a 680 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad®, tomando como blanco medio de cultivo sin inocular. Para realizar la correlación entre la absorbancia y el peso seco se siguió el protocolo especificado por Cárdenas y colaboradores (2006). Para ello,

se tomaron alícuotas de 2 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos y se realizaron dos lavados del pellet celular agregando 2 ml de solución salina al 0.9% seguidas por una centrifugación (14000 rpm por 10 minutos). El precipitado resultante fue sometido a una temperatura de 60°C en el horno hasta obtener un peso constante (aproximadamente 48 horas).

4.3 Perfiles de ácidos y solventes

De cada una de las fermentaciones realizadas se tomaron muestras en diferentes horas con el fin de realizar una cinética de producción de ácidos y solventes tanto en la cepa control como en la cepa nativa, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos, con el fin de remover el pellet celular. Posteriormente fueron almacenadas a -10°C hasta su análisis. Tanto los productos como los sustratos de las fermentaciones se cuantificaron bajo las condiciones estandarizadas en el IBUN (Cárdenas *et al.* 2006), utilizando la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con un detector de índice de refracción (Waters®) y una columna AMINEX HPX-87H (Bio- Rad®) a 50°C, con fase móvil de ácido sulfúrico 5 mM, flujo de 0,6 ml/min y un tiempo de corrida de 21 minutos. El software utilizado fue Varian Star Chromatography Workstation 4.0. Como patrones se usaron ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, metanol, glicerol y 1,3-propanodiol, en concentraciones desde 1 g/L hasta 50 g/L. Los tiempos de retención, la pendiente de la recta y los coeficientes de relación lineal (R^2) para la determinación de las concentraciones de los compuestos evaluados mediante esta técnica, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Relación lineal de las calibraciones realizadas en el HPLC para la determinación de compuestos (sustrato y productos) en el medio de cultivo (medio industrial)

Compuesto	Tiempo de Retención	Pendiente de la Recta	Coefficiente R ²
Glicerol	12.9964	97931	0.999944
1,3-Propanodiol	16.8655	51911	0.999998
Ácido Láctico	11.9495	33453	0.999938
Ácido Acético	14.2205	37087	0.999961
Ácido Butírico	19.9805	55925	0.999945
Metanol	18.3778	8296.3	0.999998

4.4 Separación de las proteínas intracelulares

Para el primer objetivo propuesto consistente en separar las proteínas intracelulares de acuerdo a su carga y a su tamaño utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones, se llevaron a cabo los procedimientos metodológicos que se mencionan a continuación, los cuales comprenden desde la extracción de las proteínas intracelulares hasta la obtención de los geles en dos dimensiones.

4.4.1 Obtención de los extractos de proteínas intracelulares

Para concentrar la biomasa, el producto de las fermentaciones (aproximadamente 4 L) se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C, en una centrifuga marca Sorval, posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en solución salina al 0.9% - EDTA 1 mM (solución SSE). El EDTA es un quelante de cationes divalentes por medio del cual se inhibe la acción de las metaloproteasas y la solución salina, simula el estado fisiológico normal de la célula. Con el fin de remover totalmente el medio de cultivo de la biomasa celular, se realizaron otras tres centrifugaciones (5000 rpm por 30 minutos a 4°C), después de las cuales se descartaron los sobrenadantes, mientras que el pellet celular se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Para obtener extractos protéicos en la cantidad y calidad requeridas se emplearon aproximadamente 150 mg de biomasa, la cual fue lavada con solución SSE previo a su

procesamiento, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y finalmente se resuspendió en buffer fosfato pH 7,0 con inhibidor de proteasas PEFABLOC 10 mM, buffer en el cual se llevó a cabo la lisis celular.

Debido a la estructura compacta de la pared de las bacterias Gram positivas como *Clostridium* sp. es necesaria la implementación de metodologías que promuevan la lisis celular sin causar la denaturación de las proteínas de interés. Dentro de las metodologías comúnmente utilizadas para este tipo de bacterias están el uso de detergentes y el ultrasonido. En este estudio se empleó buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl pH 7.4 (50 mM), EDTA 5 mM, NP-40 0.5 %, SDS 0.1% y Tritón X-100 al 1%). Se realizaron ensayos utilizando únicamente este buffer como método de lisis, en otros se combinó con ultrasonido variando los tiempos y el número de ciclos de sonicación (desde 6 hasta 240 ciclos, con tiempos de 5 hasta 60 segundos) y finalmente se probó utilizando solamente ultrasonido e implementando los mismos ciclos. En todos los ensayos de lisis con detergentes (buffer RIPA) y con ultrasonido, se llevaron a cabo coloraciones de Gram, con el fin de verificar la ruptura de la pared celular. Por otra parte, para observar la calidad de las proteínas se realizaron electroforesis en una dimensión.

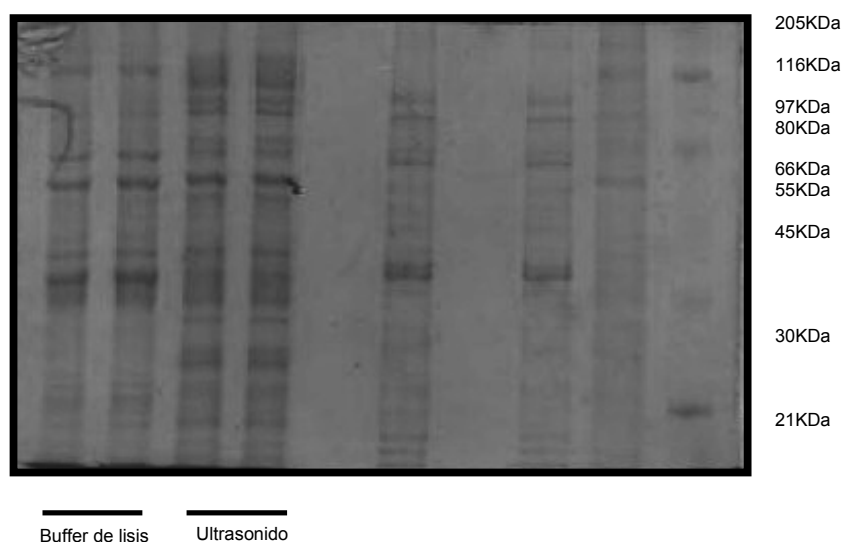
Luego de múltiples ensayos, se escogió el método de ultrasonido, dado que en las electroforesis se observaba un mayor número de bandas, en comparación con las proteínas extraídas con el buffer RIPA (Figura 3). Para llevar a cabo este procedimiento, se modificó el protocolo de Mao y colaboradores (2009); se realizaron ciclos de sonicación de 5 segundos a 40 W, durante 20 minutos, con intervalos de descanso de 5 segundos, utilizando un sonicador Sonics Vibra Cell. Una vez cumplidos los ciclos, se centrifugó a 14000 rpm, por 15 minutos a 4°C, con el fin de separar los restos celulares del extracto protéico. Los sobrenadantes resultantes se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a -20°C hasta su procesamiento.

Con el fin de limpiar la muestra de lípidos y sales, posibles interferentes en el corrido electroforético, las proteínas fueron precipitadas con el método metanol- cloroformo, consistente en mezclar 200 µl de extracto protéico con 480 µl de metanol y 160 µl de

cloroformo, luego de mezclar con vortex se adicionaron 640 μ l de agua desionizada destilada, la mezcla se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, con la posterior formación de tres fases, una superior, una inferior y en el medio de ambas las proteínas concentradas, de esta manera se removió la fase superior y se volvió a añadir el mismo volumen de agua, repitiendo el anterior procedimiento con el fin de garantizar una mayor limpieza de sales en el extracto protéico.

Finalmente, se agregaron 300 μ l de metanol, para luego centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos; el sobrenadante resultante se descartó y el pellet correspondiente a las proteínas concentradas se dejó secar al aire libre por unos minutos; posteriormente los tubos fueron almacenados a -20°C, hasta su procesamiento.

Figura 3. Electroforesis en condiciones denaturantes (gel de poliacrilamida al 12%), de extractos provenientes de la fase exponencial de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. Proteínas (15 μ l) extraídas con ultrasonido (en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM) y con buffer de lisis (buffer RIPA). Precipitadas con el método Metanol-Cloroformo. Tinción con azul de comassie.



4.4.2. Cuantificación de las proteínas

Las proteínas previamente concentradas se resuspendieron en buffer de resolubilización [urea 7 M, tiourea 2M, CHAPS 4% (p/v), DTT 40 mM, anfolitos al 1% en gradiente No

Lineal 3-10]. La cuantificación de la cantidad de proteína total en los extractos, se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico (Pierce 660 nm) (Pierce®, Thermo Scientific), diluyendo la muestra diez veces, el reactivo de Pierce es compatible con los detergentes y agentes reductores más comúnmente utilizados, la cuantificación se fundamenta en un procedimiento colorimétrico basado en la unión de la proteína a un complejo cromóforo-metal en condiciones ácidas, que produce un cambio en el máximo de absorción del cromóforo, el cual se puede medir a 660 nm. El reactivo interactúa con los residuos básicos de la proteína, básicamente histidina, arginina y lisina y en una menor proporción con tirosina, triptófano y fenilalanina; de esta manera la intensidad del color resultante en la dilución es proporcional a la concentración de proteínas.

Todas las muestras se cuantificaron por duplicado, las mediciones de las variaciones de absorbancia se realizaron en un lector de placas ELISA Bio-Rad®, a una longitud de onda de 660 nm. Se construyeron curvas patrón utilizando albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/ml como proteína estándar. La concentración de la muestra a cuantificar se determinó mediante interpolación de los valores en la curva patrón.

4.4.3 Separación de las proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones

4.4.3.1 Isoelectroenfoque

Esta técnica electroforética separa las moléculas protéicas de acuerdo a su carga en presencia de un gradiente de pH. El procedimiento empleado para tal fin se basa en el uso de geles de poliacrilamida en forma de tiras que contienen gradientes de pH inmovilizados (IPG por sus siglas en inglés Immobilized pH gradients); así las proteínas estimuladas por un campo eléctrico migran a lo largo del gel hasta que alcanzan valores de pH en los cuales su carga neta es nula (punto isoeléctrico) (Chiou and Wu, 1999).

Para estandarizar las condiciones del isoelectroenfoque se utilizaron tiras IPG de 7 cm con un rango de pH de 3 a 10, sin embargo; debido a que se encontraron un gran número de proteínas con puntos isoeléctricos en el rango de pH ácido, la separación de los spots no fue óptima, razón por la cual se realizó un zoom utilizando tiras de 10 cm con un rango de pH de 4 a 7. Una vez se estandarizaron las condiciones del isoelectroenfoque, se utilizaron tiras IPG de 18 cm con el mismo rango de pH, las cuales se emplearon a la hora de hacer los geles finales (por triplicado) de cada una de las fases evaluadas tanto en la cepa nativa como en la cepa control. En el caso de las tiras IPG de 10 cm se cargaron 100 µg de proteína, mientras que para las tiras de 18 cm se necesitaron 300 µg.

Para la realización del isoelectroenfoque se siguió el protocolo estandarizado por el Grupo de Investigación en Hormonas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. De esta manera, el volumen de extracto equivalente a los microgramos requeridos (100 y 300 µg, respectivamente) se resuspendió en buffer de rehidratación [urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, anfolitos 3-7 1% (Amersham ®) y trazas de azul de bromofenol]. La urea y la tiourea son compuestos que rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas que determinan la estructura conformacional de las proteínas, el CHAPS es detergente zwitterión que incrementa la solubilidad de las proteínas sin afectar el intercambio iónico durante el isoelectroenfoque y el DTT es un agente reductor que reduce los puentes disulfuro entre aminoácidos (Görg *et al.*, 2000).

El volumen final de los extractos mezclados con el buffer de rehidratación fue de 125 µl para las tiras de 10 cm y 325 µl para las de 18 cm. Se utilizaron tiras secas inmovilizadas (7 cm, pH No lineal 3-10 de Bio-Rad®; 7 cm, pH No lineal 4-7 de Bio-Rad® y 18 cm, pH No lineal 4-7 de Bio-Rad®). El volumen correspondiente fue añadido de forma lineal en bandejas de rehidratación, posteriormente se colocó la tira IPG con gradiente de pH inmovilizado. La tira con la muestra se rehidrató de forma pasiva por una hora, transcurrido este tiempo se cubrió con aceite mineral (Bio-Rad®) para dar paso a la rehidratación activa durante 11 horas a 50 voltios (V) en un focalizador Bio-Rad®. En este estudio fueron estandarizadas las condiciones de isoelectroenfoque (IEF) con los siguientes gradientes de Voltaje: 250 V por 0,5 h (rampa rápida), 1000 V por 0,5 h (rampa rápida), 1000 V por 1 h (constante), 4000 V por 0,65 h (rampa rápida), 4000 V por 1 h (constante) y 10000 V (rampa rápida) por 6,5 h hasta 75000 Vh; a 50 µA/gel y a una

temperatura constante de 20°C. Finalmente, la tira IPG fue almacenada a -70°C o preparada de inmediato para la segunda dimensión (SDS -PAGE).

4.4.3.2 Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Esta técnica permite separar las proteínas obtenidas en la primera dimensión (isoelectroenfoque) de acuerdo a su masa molecular. Como primer paso se realizó el equilibrio de las tiras IPG, cuyo propósito es promover la transferencia de las proteínas separadas en el isoelectroenfoque. Los dos equilibrios se realizaron durante 15 minutos cada uno, añadiendo 2,5 ml de buffer de equilibrio para tiras IPG de 7 cm y 5 ml para tiras de 18 cm. El primer equilibrio, se llevó a cabo con un buffer A [Urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, Glicerol 20% (v/v) y DTT 130 mM]. Posteriormente, el segundo equilibrio se llevó a cabo con un buffer B [Urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, Glicerol 20% (v/v) y Yodoacetamida 135 mM]. Mientras que el DTT actúa como agente reductor, la Iodoacetamida es un agente alquilante que previene la reoxidación de los grupos sulfuro separados por el DTT; el SDS, es un detergente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas separándolas en varias subunidades, adicionalmente les confiere carga negativa con lo que facilita su separación por electroforesis (Dunbar, 1987). Por otra parte, tanto la urea como el glicerol disminuyen el efecto electroendosmótico causado por las moléculas con carga positiva que impiden la transferencia de las proteínas hacia la segunda dimensión (Görg *et al.*, 2000).

Para la electroforesis en dos dimensiones, las tiras IPG equilibradas fueron puestas en un gel de poliacrilamida al 12 % o al 10 % en condiciones desnaturalizantes. La SDS-PAGE para los geles pequeños (7 x 8 cm y 0.75 mm de espesor) se llevó a cabo en una cámara mini PROTEAN 3 (Bio-Rad®) a 80 V, durante aproximadamente dos horas. Por otra parte, la SDS-PAGE para los geles finales (20 × 20 cm y 3 mm de espesor) se realizó en una cámara de electroforesis vertical DODECA (Bio-Rad®), a 80 V, temperatura ambiente y por un tiempo de 18 horas. Para las corridas se utilizó Buffer Tris- Glicina - SDS 0.1%.

Como marcador de peso molecular se usó el estándar Pierce Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Pierce®), así como un marcador de peso comercial de 190 KDa (Bioline®).

4.4.4 Fijación

Con el propósito de inmovilizar las proteínas en el gel y remover cualquier compuesto que pudiera interferir con el procedimiento de tinción, los geles se sumergieron dos veces en una solución de fijación (compuesta por metanol al 50 % y ácido acético al 5 %) en condiciones de agitación constante durante un periodo de tiempo de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, los geles se enjuagaron con agua destilada por 10 minutos, para posteriormente ser teñidos (Koga, 2008).

4.4.5 Tinción

En esta tinción existen varios mecanismos a través de los cuales el colorante se une a las proteínas, puede ser porque se establecen interacciones entre los aminoácidos básicos y los colorantes ácidos o por la formación de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y uniones hidrofóbicas, entre el colorante y las proteínas (Jin *et al.*, 2008). Para la tinción de los geles obtenidos en este trabajo se siguió el procedimiento estandarizado por el grupo de investigación en hormonas, en el que se contemplan los siguientes pasos:

Sumergir durante toda una noche los geles en la solución blue silver (metanol al 20 %, ácido fosfórico al 10 %, sulfato de amonio al 10 % y Azul Brillante de Coomassie (G- 250) al 0,125 %).

Decolorar los geles con H₂O/PLC por toda la noche y hacer lavados sucesivos hasta eliminar completamente el exceso de colorante.

4.5 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas

En las secciones que restan de la metodología, se describen los procedimientos realizados con el fin de cumplir con los otros dos objetivos específicos planteados para el estudio, que tienen que ver con la determinación el peso molecular de las proteínas diferencialmente expresadas y su identificación, utilizando la tecnología de espectrometría de masas (MALDI-TOF).

4.5.1 Análisis de los geles bidimensionales

Los geles destañados fueron escaneados con una resolución de 300 dpi y su análisis se realizó utilizando el software PDQUEST de Bio-Rad®. Las imágenes fueron filtradas de acuerdo con el tipo de ruido encontrado, el background fue sustraído y cada spot fue normalizado, mediante el método llamado cantidad total en spots válidos, que divide cada spot, entre la cantidad total de spots presentes en el gel. En los geles obtenidos y mediante el uso de las herramientas disponibles en el programa utilizado, se determinó el número de spots, así mismo, se llevaron a cabo análisis de matching (apareamiento), cualitativos, cuantitativos, estadísticos y booleanos, con el fin de realizar comparaciones entre cepas y entre las fases de crecimiento evaluadas. Con base en los resultados, se seleccionaron los spots que iban a ser identificados, los cuales fueron extraídos de los geles y enviados a analizar por espectrometría de masas al Instituto Pasteur de Uruguay.

Debido a que se presentó un número considerable de spots diferencialmente expresados, con base en los resultados arrojados por el software utilizado y dado el interés que existía por encontrar proteínas implicadas en la ruta metabólica de producción de 1,3-PD, se tuvieron en cuenta los datos reportados en la literatura en relación al peso molecular y punto isoeléctrico de dichas proteínas. De manera que se picaron (extrajeron) los spots presentes en zonas próximas a los valores reportados, aumentando así la probabilidad de

identificar proteínas involucradas en la producción de 1,3-PD. Así mismo, dentro de los criterios de selección se tuvieron en cuenta spots expresados solamente en una fase, spots presentes en ambas fases de crecimiento, al igual que spots sobre expresados y sub expresados.

4.5.2 Espectrometría de masas

Mediante la tecnología MALDI-TOF, es posible cuantificar las masas moleculares e identificar las proteínas. El primer paso para la identificación de las proteínas es su separación, posteriormente éstas deben fragmentarse en péptidos a través de una digestión peptídica (dentro de gel), mediante el uso de enzimas como la proteasa tripsina, la cual corta por los aminoácidos lisina y arginina (López *et al.*, 2006).

En la aplicación de esta tecnología, uno de los factores a tener en cuenta es el uso de una matriz, la cual está compuesta por ácidos orgánicos que absorben la longitud de onda del láser utilizado y facilitan la separación del analito. La matriz utilizada comúnmente es el ácido alfa ciano 4- hidroxicinámico (CHCA por sus siglas en ingles) usada para péptidos, pequeñas proteínas y glicopéptidos (Cañas *et al.*, 2007). Luego se procede a mezclar sobre una placa de microtitulación la matriz con el péptido a analizar. Posteriormente, se realiza un procedimiento de secado al vacío, con el cual se promueve la formación de cristales (entre la matriz y el analito) que facilitan el proceso de ionización. Por último, la muestra es introducida en el espectrómetro de masas (MALDI) en el cual se llevan a cabo los procesos de ionización y desorción (Dhingra *et al.*, 2005; Cañas *et al.*, 2007).

El resultado final arrojado por el equipo es un espectrograma, en el que se observan picos cuya intensidad relativa permite establecer la proporción de cada componente en la muestra, dependiendo de la relación masa/ carga de los iones generados. La utilización de programas de búsqueda permiten comparar la imprenta peptídica obtenida, la cual es característica para cada proteína, con imprentas virtuales almacenadas en bases de datos, como SwisProt, NCBI, MASCOT, entre otras, con lo que se obtiene un listado de posibles proteínas ordenadas de acuerdo al nivel de identidad encontrado (Dhingra *et al.*, 2005).

En este estudio, el análisis de espectrometría de masas fue realizado en el Instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay). El método elegido para la identificación de proteínas fue el mapeo peptídico. Las proteínas extraídas fueron tratadas con tripsina (grado-secuenciación de Promega) por toda la noche a 37°C. Los péptidos fueron extraídos del gel usando acetonitrilo al 60% en TFA al 0,2 %, posteriormente fueron concentrados por vacío, secados y desalinizados usando micro-columnas C18 de fase reversa (OMIX). La elución de los péptidos de las micro-columnas fue llevada a cabo directamente dentro de la placa de muestra del espectrómetro de masas, con 3 µl de solución matriz (ácido alfa ciano 4- hidroxicinámico en 60% de acetonitrilo acuoso con TFA al 0,2 %).

Los espectros de masas de las muestras digeridas fueron adquiridos en un MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) en modo reflector y fueron calibrados externamente usando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Así mismo, se realizó la colisión inducida para la disociación de masas / masas en los péptidos seleccionados.

4.6 Búsqueda de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS

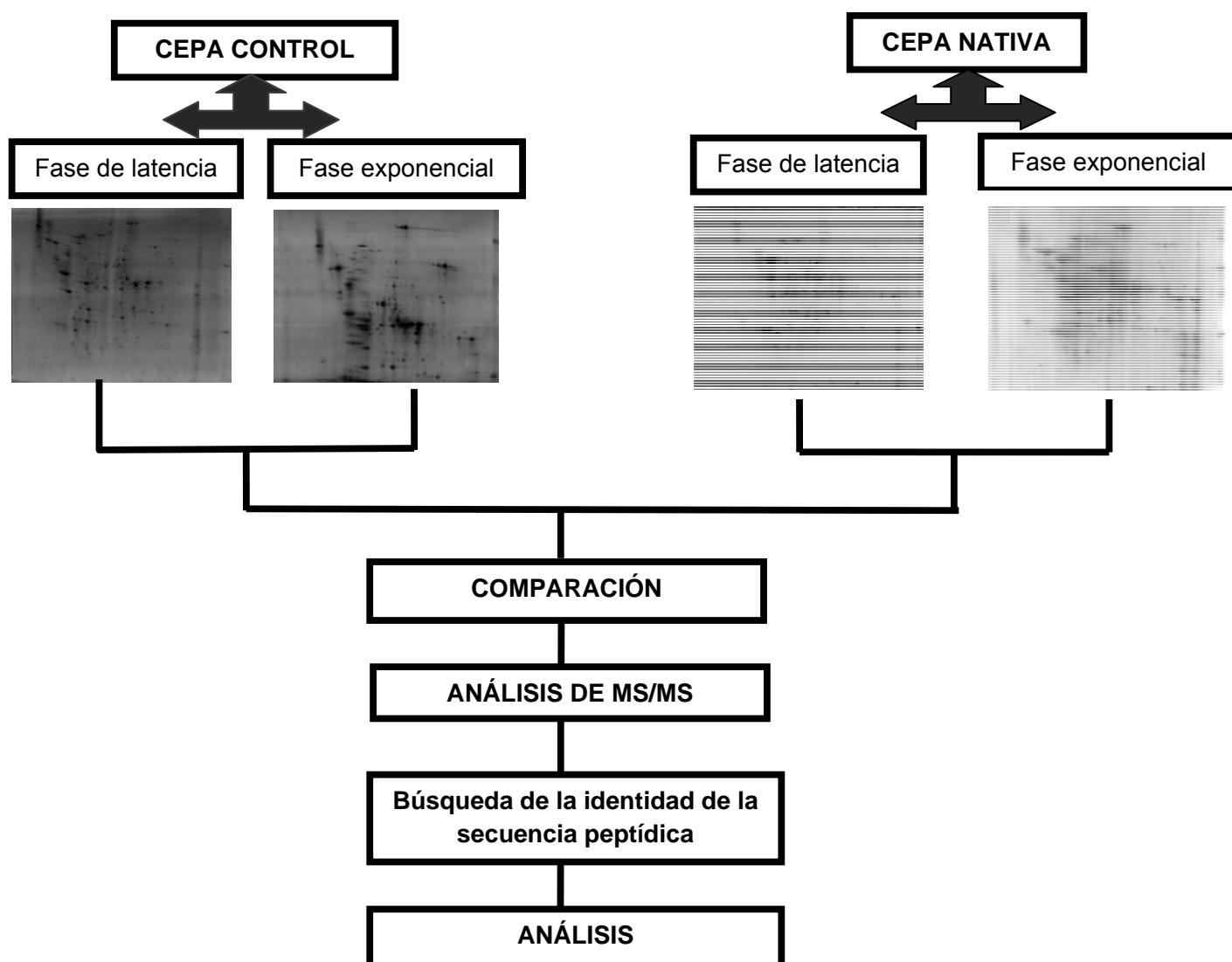
Con base en los resultados enviados por el Instituto Pasteur de Montevideo, se pudo cumplir con el último objetivo propuesto consistente en la identificación de algunas de las proteínas diferencialmente expresadas que fueron separadas por electroforesis bidimensional. Para realizar esta identificación se tuvieron en cuenta los parámetros descritos a continuación.

De las proteínas diferencialmente expresadas en las fases de crecimiento evaluadas, diez fueron seleccionadas para ser analizadas por espectrometría de masas. De esta manera, se eligieron spots expresados solamente en la fase de latencia (3 spots), así como spots presentes en ambas fases de crecimiento (7 spots), de éstos, 3 spots estuvieron sobre expresados y los restantes (4 spots) se registraron como sub expresados. Las proteínas fueron identificadas mediante la búsqueda en bases de datos locales utilizando los

valores m/z, con ayuda del programa MASCOT y los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masas monoisotópica, 0.08 Da; fragmento de tolerancia de masas, 0.25 Da; oxidación de metionina, como posible modificación, carbamido-metilación como modificación fija y una pérdida triptica por clivaje permitida. Los espectros de masa obtenidos para cada una de las proteínas analizadas, junto con los parámetros utilizados para su identificación están en los anexos que aparecen al final del texto (Anexo 1 al 10).

5. Resultados

Figura 4. Diagrama de flujo general en el cual se ilustra el diseño experimental del estudio



5.1 Diseño experimental

En este estudio se llevó a cabo el análisis proteómico que se ilustra en la figura 4 para la cepa nativa y la cepa control evaluando dos fases de crecimiento (fase de latencia y fase exponencial).

Se obtuvieron geles bidimensionales, que fueron comparados con el fin de establecer los spots diferencialmente expresados. Posteriormente, diez de estos spots fueron identificados por el método mapeo peptídico acoplado los resultados de espectrometría de masas, con el análisis de MS/MS realizado a los péptidos escogidos.

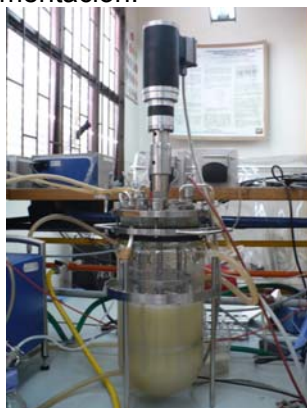
A continuación, se reportan los resultados obtenidos, primero se mencionan algunos parámetros de las fermentaciones a partir de las cuales se colectó la biomasa necesaria para la extracción de las proteínas intracelulares, posteriormente se reportan los rendimientos de la producción de 1,3-propanodiol y los demás productos sintetizados; finalmente se describen los análisis proteómicos que comprenden electroforesis bidimensional y análisis de los spots diferencialmente expresados por espectrometría de masas.

5.2 Fermentaciones

Las fermentaciones con la cepa control y la cepa nativa se realizaron por duplicado de acuerdo a los parámetros ya mencionados (reactor de 4 litros, en medio industrial, anaerobiosis por burbujeo constante con N₂, temperatura de 37°C, 200 rpm y pH 7.0). La primera fermentación se hizo con el fin de corroborar los tiempos de duración de cada una de las fases evaluadas, posteriormente se realizó otra fermentación, cuya biomasa resultante fue utilizada para extraer las proteínas intracelulares.

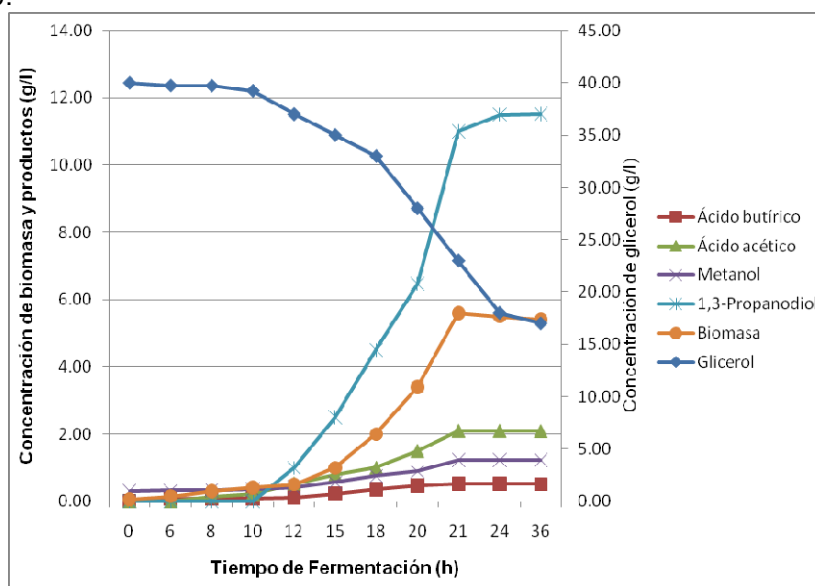
En la figura 5 se puede observar el sistema usado para el crecimiento del microorganismo en medio industrial y en las condiciones antes descritas.

Figura 5. Crecimiento de la cepa *Clostridium* sp. IBUN 158 B en el reactor de 4 litros, en medio industrial, anaerobiosis por burbujeo constante con N₂, temperatura de 37°C, 200 rpm y pH 7, a las 36 horas de fermentación.



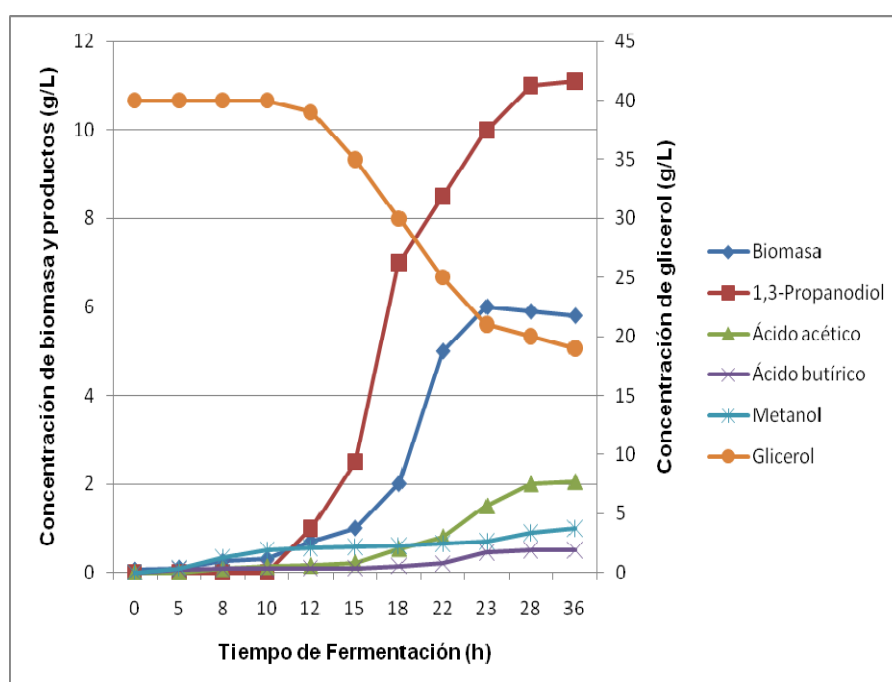
La cinética de la fermentación se realizó durante 36 horas de fermentación, mostrando los resultados que se pueden observar en la figura 6, para el caso de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B y en la figura 7 para la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478.

Figura 6. Cinética de fermentación de la cepa *Clostridium* sp. IBUN 158 B, en el reactor de 4 L a las 36 horas de fermentación creciendo en medio de cultivo industrial, condiciones de anaerobiosis por burbujeo constante con N₂, temperatura de 37°C, 200 rpm y pH 7.0.



En ambas fermentaciones la fase de latencia se presentó entre las 0 y las 12 horas, mientras que la fase exponencial de crecimiento estuvo entre las 12 y las 21 horas de fermentación para la cepa nativa y entre las 12 y las 23 horas de fermentación para la cepa control (Figuras 6 y 7).

Figura 7. Cinética de fermentación de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478, en el reactor de 4L a las 36 horas de fermentación creciendo en medio de cultivo industrial, condiciones de anaerobiosis por burbujeo constante con N₂, temperatura de 37°C, 200 rpm y pH 7.



5.3 Determinación de ácidos y solventes por HPLC

De acuerdo con los valores de sustrato (glicerol) y productos (1,3- propanodiol, acetato y butirato) obtenidos por medio de HPLC, se definieron los rendimientos de producción (Tabla 5). Como era de esperarse, el 1,3 –propanodiol únicamente se detectó durante la fase de crecimiento exponencial, puesto que es un metabolito primario (Figuras 6 y 7). Así mismo, se determinó que la cepa nativa presentó el mayor rendimiento en la producción de este solvente a partir de glicerol (0.78 mol/mol). Con respecto a los demás productos, tanto en el control como en la cepa nativa, se produjo una mayor cantidad de acetato que

de butirato, sin embargo; los dos presentaron rendimientos inferiores con respecto al 1,3 – propanodiol (Tabla 5).

Tabla 5. Determinación de parámetros de fermentación en el reactor de 4 litros, para la cepa nativa y la cepa control a las 23 y 21 horas de fermentación respectivamente, en medio industrial y bajo condiciones controladas de temperatura y pH. (Y): rendimiento. (pd): 1,3-propanodiol. (but): butirato, (acet): acetato.

PARÁMETRO	CEPA NATIVA	CEPA CONTROL
Glicerol consumido (g/L)	17	19
1,3- PD producido (g/L)	11	10
Y pd/s (mol/mol)	0.78	0.64
Y but/s (mol/mol)	0.04	0.04
Y acet/s (mol/mol)	0.12	0.11

A continuación se describen los resultados que permitieron cumplir con el objetivo planteado inicialmente en relación con la separación de las proteínas intracelulares de acuerdo a su carga y a su tamaño utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones.

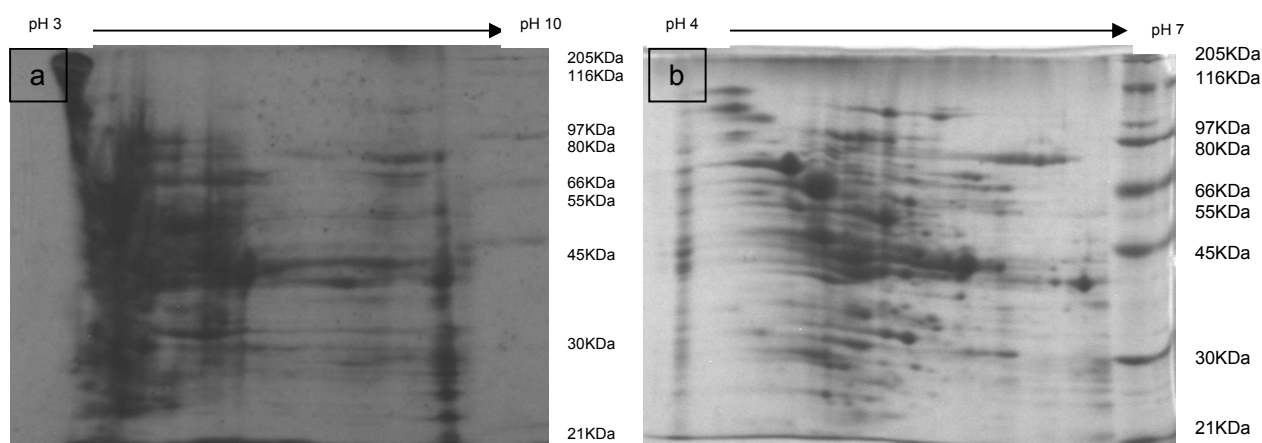
5.4 Separación de las proteínas intracelulares

5.4.1 Electroforesis en dos dimensiones

Con el fin de determinar en qué zona de punto isoelectrónico (pI) se encontraba la mayor parte de las proteínas intracelulares, se evaluaron extractos provenientes de ambas cepas que fueron obtenidos mediante la lisis con ultrasonido. Los proteomas fueron separados en electroforesis en dos dimensiones usando tiras de isoelectroenfoque de 7 cm en gradiente no lineal de pH 3-10. En los geles obtenidos se observó una mayor acumulación de proteínas en la región ácida de los proteomas (Figura 8a). Por tal motivo se escogió un

rango de pH estrecho en dicha región, utilizando tiras de 7 cm en gradiente no lineal de pH 4-7. Como resultado se observó una mejor separación, así como un menor solapamiento de las proteínas a lo ancho del gel (Figura 8b). De esta manera, utilizando un zoom en la región ácida se logró una resolución mayor de las proteínas y por consiguiente se facilitó el análisis del proteoma intracelular.

Figura 8. a) Electroforesis bidimensional en condiciones denaturantes (gel de poliacrilamida al 12%), de extractos provenientes de la fase exponencial de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. Primera dimensión: tiras pH 3 - 10 (7 cm). b) Electroforesis bidimensional de proteínas intracelulares de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. Primera dimensión: tiras pH 4-7 (7cm). Proteínas (100 µg) extraídas con ultrasonido, en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM. Tinción con Blue Silver.



Es importante recalcar que luego de varios ensayos probando diferentes condiciones, fue posible obtener un protocolo de isoelectroenfoco adecuado para separar las proteínas presentes en la fracción intracelular tanto de la cepa control como de la cepa nativa, con los siguientes gradientes de Voltaje: 250 V por 0,5 h (rampa rápida), 1000 V por 0,5 h (rampa rápida), 1000 V por 1 h (constante), 4000 V por 0,65 h (rampa rápida), 4000 V por 1 h (constante) y 10000 V (rampa rápida) por 6,5 h hasta 75000 Vh; a 50 µA/gel y a una temperatura constante de 20°C.

En las dos fases evaluadas, los geles finales y sus réplicas, registraron una alta reproducibilidad, lo cual se demuestra con coeficientes de correlación significativos tanto para la fase de crecimiento exponencial como para la fase de latencia de la cepa nativa, con valores de 0.84 y 0.95, respectivamente. En la cepa control los coeficientes de

correlación entre réplicas fueron de 0.80 en la fase exponencial y de 0.89 para la fase de latencia.

5.5 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales

Los resultados que se describen en las siguientes secciones están relacionados con el análisis de los geles obtenidos para la búsqueda de las proteínas diferencialmente expresadas en las dos fases y cepas evaluadas. Con base en parámetros de sobre expresión, sub expresión así como la presencia spots exclusivos, se seleccionaron aquellos que iban a ser analizados por espectrometría de masas, con el fin de realizar la determinación de su peso molecular y posterior identificación. Con los datos obtenidos a partir de estos análisis se cumple con los tres objetivos específicos propuestos en este estudio.

5.5.1 Perfiles de las proteínas diferencialmente expresadas

En ambas cepas estudiadas, los perfiles proteómicos obtenidos mostraron un mayor número de spots en la fase de latencia con respecto a la fase de crecimiento exponencial. Mientras que en la fase exponencial se registró un promedio de 132 spots en la cepa nativa y de 151 spots en la cepa control; la fase de latencia presentó un promedio de 215 spots en la cepa nativa y de 202 spots en el control.

De acuerdo con los análisis realizados, se encontró un total de 171 spots diferencialmente expresados al comparar entre las fases de crecimiento de las dos cepas evaluadas. Los análisis cuantitativos (relativos) mostraron que el 30% (52 spots) de las proteínas diferencialmente expresadas se registraron en la fase de crecimiento exponencial (Figura 9) y el 70 % (118 spots) en la fase de latencia (Figura 10). Es así como, usando un factor de cambio correspondiente al doble del nivel de expresión (figura 11), se encontró que 37

spots (21 %) de la fase exponencial y 30 spots (17%) de la fase de latencia se sobre expresaron (T-student $p < 0,05$), lo que se evidencia porque al comparar una proteína que se expresa tanto en el periodo de latencia como en la fase exponencial, su cantidad aumenta al doble de manera diferencial en una de estas fases.

Figura 9. A la izquierda, las proteínas diferencialmente expresadas en la fase exponencial de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. A la derecha, las proteínas sobre expresadas y sub expresadas al comparar las dos fases de crecimiento, así como la cepa nativa con la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478.

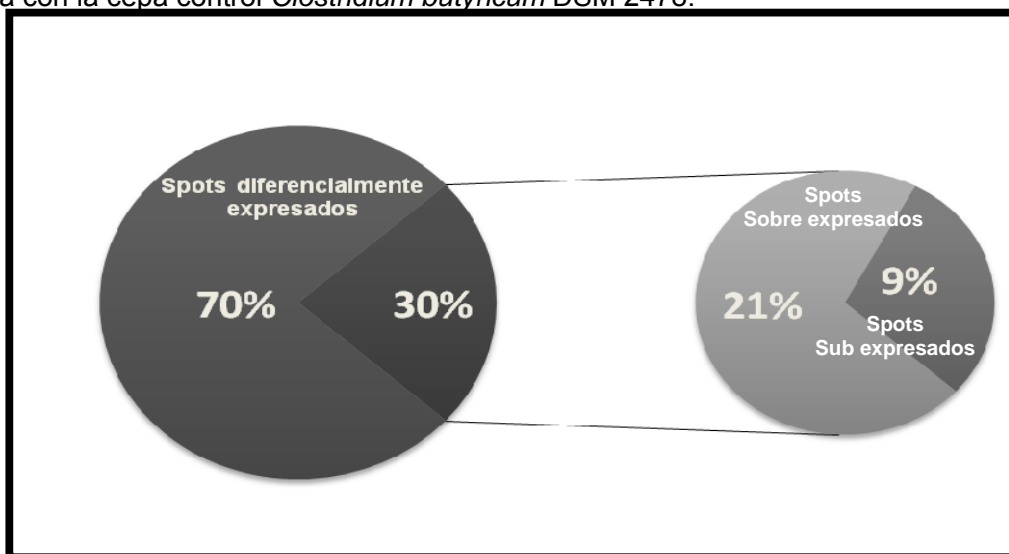
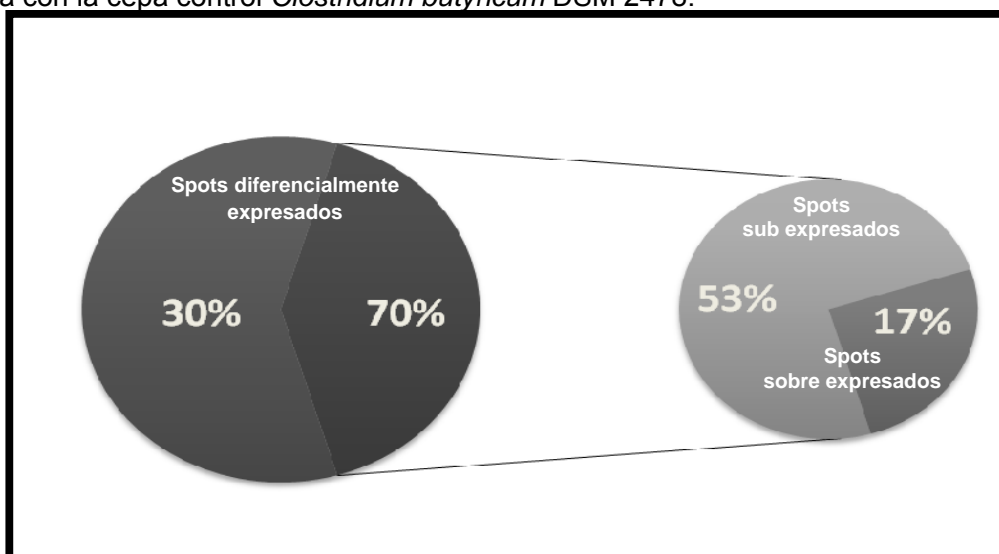
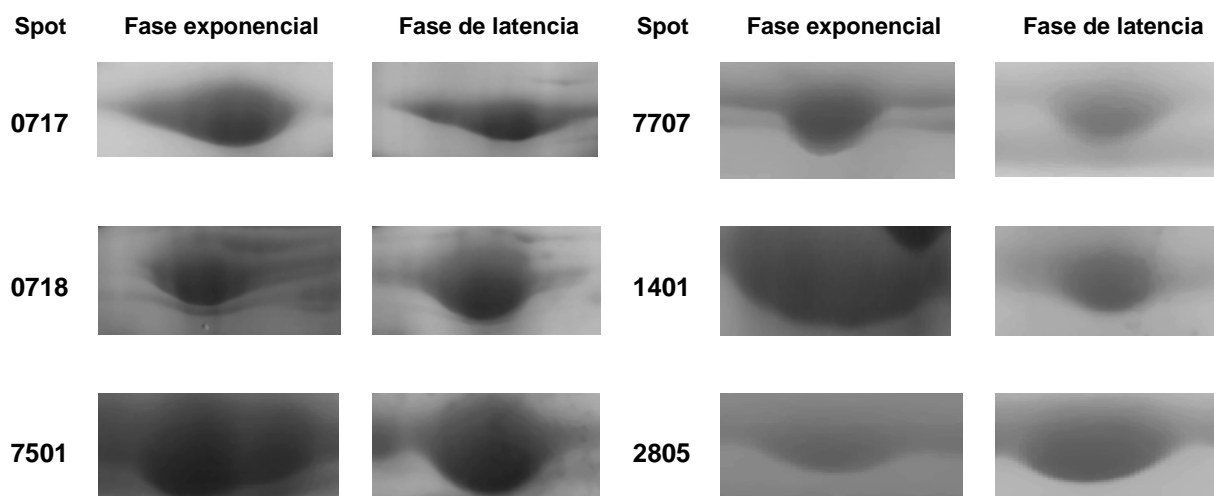


Figura 10. A la izquierda, las proteínas diferencialmente expresadas en la fase de latencia de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. A la derecha, las proteínas sobre expresadas y subexpresadas al comparar las dos fases de crecimiento, así como la cepa nativa con la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478.



Con respecto a un factor de 0.5 (correspondiente a la mitad del nivel de expresión) (Figuras 9 y 10), 15 spots (9%) de la fase exponencial y 88 spots (53%) de la fase de latencia redujeron su nivel de expresión (se sub expresaron) (T-student $p \leq 0,05$), lo que se detecta porque al comparar una misma proteína presente en las dos etapas de crecimiento: exponencial y latencia, esta disminuye su cantidad a la mitad de manera diferencial en una de las fases. Los anteriores resultados son consistentes con las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre las dos fases, en cada una de las cepas evaluadas (Test de Mínimos cuadrados $p \leq 0,05$).

Figura 11. Perfiles de 12 proteínas diferencialmente expresadas (sobre expresadas) en la fase de crecimiento exponencial y en la fase de latencia de la cepa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. Proteínas (300 μ g) extraídas con ultrasonido, en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM. Primera dimensión: tiras pH 4-7 (18 cm). Tinción con Blue Silver.



Con el fin establecer diferencias a nivel de las cepas y las fases de crecimiento evaluadas, se llevaron a cabo comparaciones utilizando sets de análisis booleanos (Figuras 12 y 13). Es así como en ambas cepas, la fase de latencia presentó un mayor número de spots exclusivos, en comparación con la fase de crecimiento exponencial (Figura 12). Al comparar entre la cepa control y la cepa nativa, ésta última presentó el mayor número de spots exclusivos en la fase de latencia (Figuras 13 y 14).

Figura 12. Análisis booleano de los spots exclusivos de la fase de exponencial (en rojo) y de la fase de latencia (en naranja) presentes en la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. En el centro se muestran los spots comunes en ambas fases.

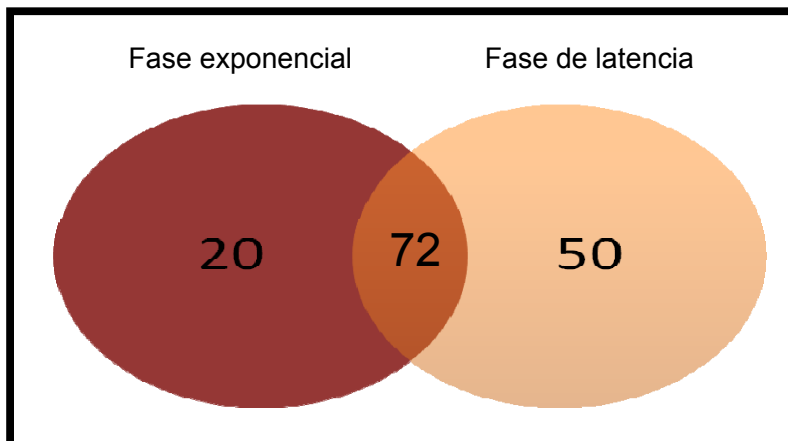
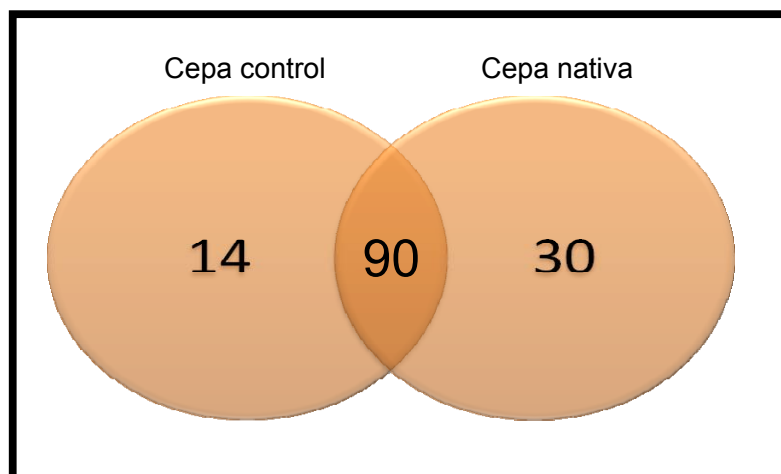


Figura 13. Análisis booleano de los spots exclusivos de la fase de latencia de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478 y de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B. En el centro se muestran los spots comunes en ambas cepas.



Si bien en la fase de latencia, ambas cepas presentan un gran número de spots en común, los spots exclusivos de cada una se muestran en la figura 14. De igual manera, en la figura 15 se destacan los spots presentes únicamente en la fase de crecimiento exponencial, así como los spots exclusivos de la fase de latencia.

Figura 14. Spots exclusivos en la fase de latencia. Electroforesis bidimensional (geles de poliacrilamida al 12%). a) En círculos de color ocre, proteínas intracelulares de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478 exclusivas de la fase de latencia. b) En círculos rojos, proteínas intracelulares de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B exclusivas de la fase de latencia. Proteínas (300 µg) extraídas con ultrasonido, en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM. Primera dimensión: tiras pH 4-7 (18 cm). Tinción con Blue Silver.

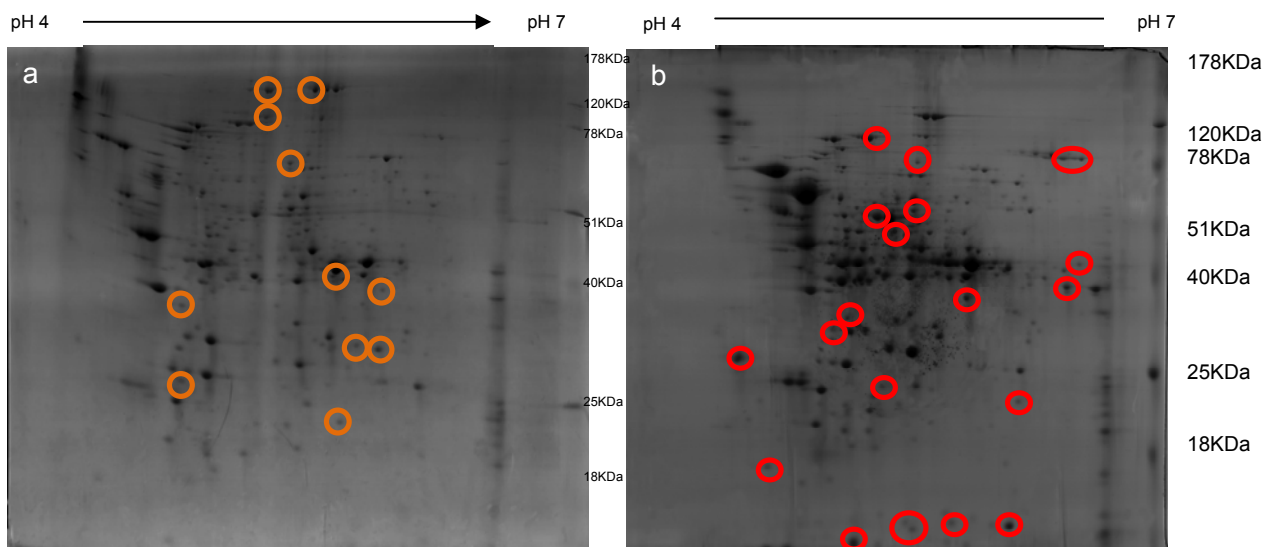
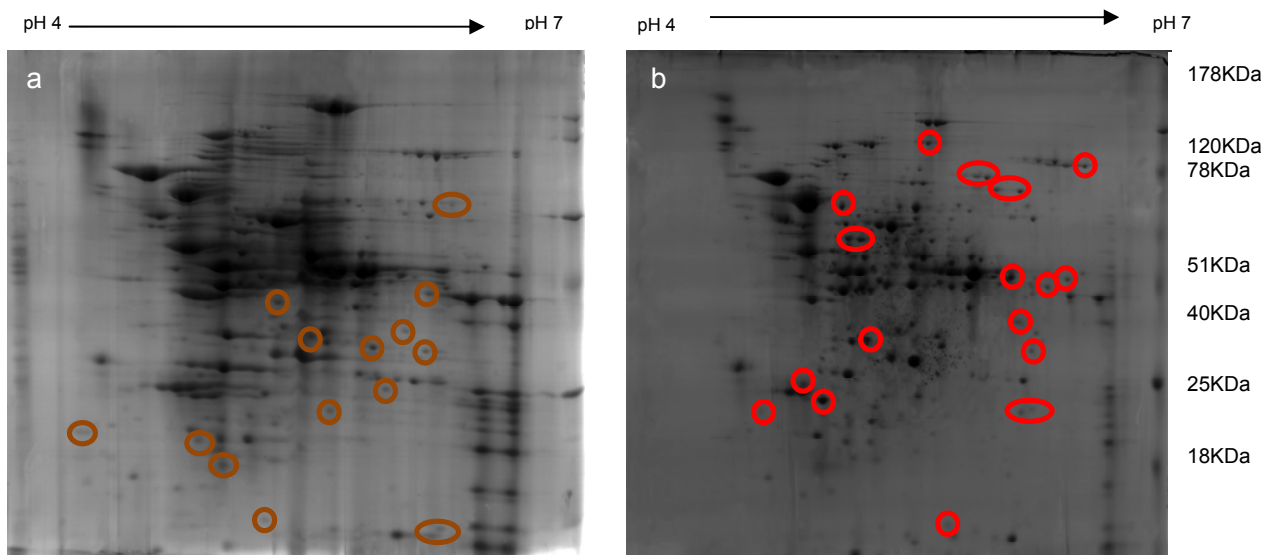


Figura 15. Spots exclusivos en la fase de latencia y la fase exponencial. Electroforesis bidimensional (gel de poliacrilamida al 12%). a) En círculos de color café, proteínas intracelulares de la fase exponencial. b) En círculos de color rojo, proteínas intracelulares de la fase de latencia de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B.



5.5.2 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas por espectrometría de masas

De las proteínas diferencialmente expresadas en las fases de crecimiento evaluadas, diez fueron seleccionadas para ser analizadas por espectrometría de masas (Figuras 16 y 17). De esta manera, se eligieron spots expresados solamente en la fase de latencia (3 spots), así como spots presentes en ambas fases de crecimiento (7 spots), de éstos, 3 spots estuvieron sobre expresados y los restantes (4 spots) se registraron como sub expresados (Tabla 6).

Tabla 6. Características de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, mediante el método de mapeo peptídico¹.

Spot #	Proteína Identificada	Masa molecular aparente (kDa)	Punto Isoelectrico aparente (pI)	Score	Función
5703	Aconitato hidratasa	69	5.35	168	Ciclo de Krebs
5705	Glutamina sintetasa	72	5.40	140	Síntesis de Glutamina
1106	Triosafofato isomerasa	16	5.01	108	Síntesis de Gliceraldehído- 3- fosfato
7515	Aspartato-semialdehido deshidrogenasa	40	5.98	142	Síntesis de ácido aspártico
7101	Proteína ribosomal S2	26	6.38	182	Síntesis de Proteínas
7001	Proteína ribosomal L10	18	6.02	137	Síntesis de Proteínas
7706	Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa	52	6.08	122	Síntesis de nucleótidos
4304	3-hidroxi-butiril-coa deshidrogenasa.	30	5.50	146	Síntesis de Hidroxibutiril- CoA
4305	3-hidroxi-butiril-coa deshidrogenasa	30	5.50	119	Síntesis de Hidroxibutiril- CoA
7501	1,3-propanodiol deshidrogenasa	42	5.85	137	Síntesis de 1,3-PD

5.6. Búsqueda de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS

En la tabla 6 también se resumen las proteínas identificadas y sus principales características, de esta manera los números de las proteínas exclusivas de la fase de latencia aparecen en rojo, los de las proteínas presentes en ambas fases están verde, los correspondientes a las proteínas sobre expresadas se resaltan en un cuadro amarillo y los de las proteínas sub expresadas en un cuadro de color ocre. Es importante mencionar que para todos los spots analizados por masas el score fue mayor a 85, por ende la

¹Los números de los spots exclusivos de la fase de latencia aparecen en rojo, los spots presentes en ambas fases están verde, los correspondientes a las proteínas sobre expresadas se resaltan en un cuadro amarillo y los de las proteínas sub expresadas en un cuadro de color ocre.

identificación de las proteínas se realizó de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

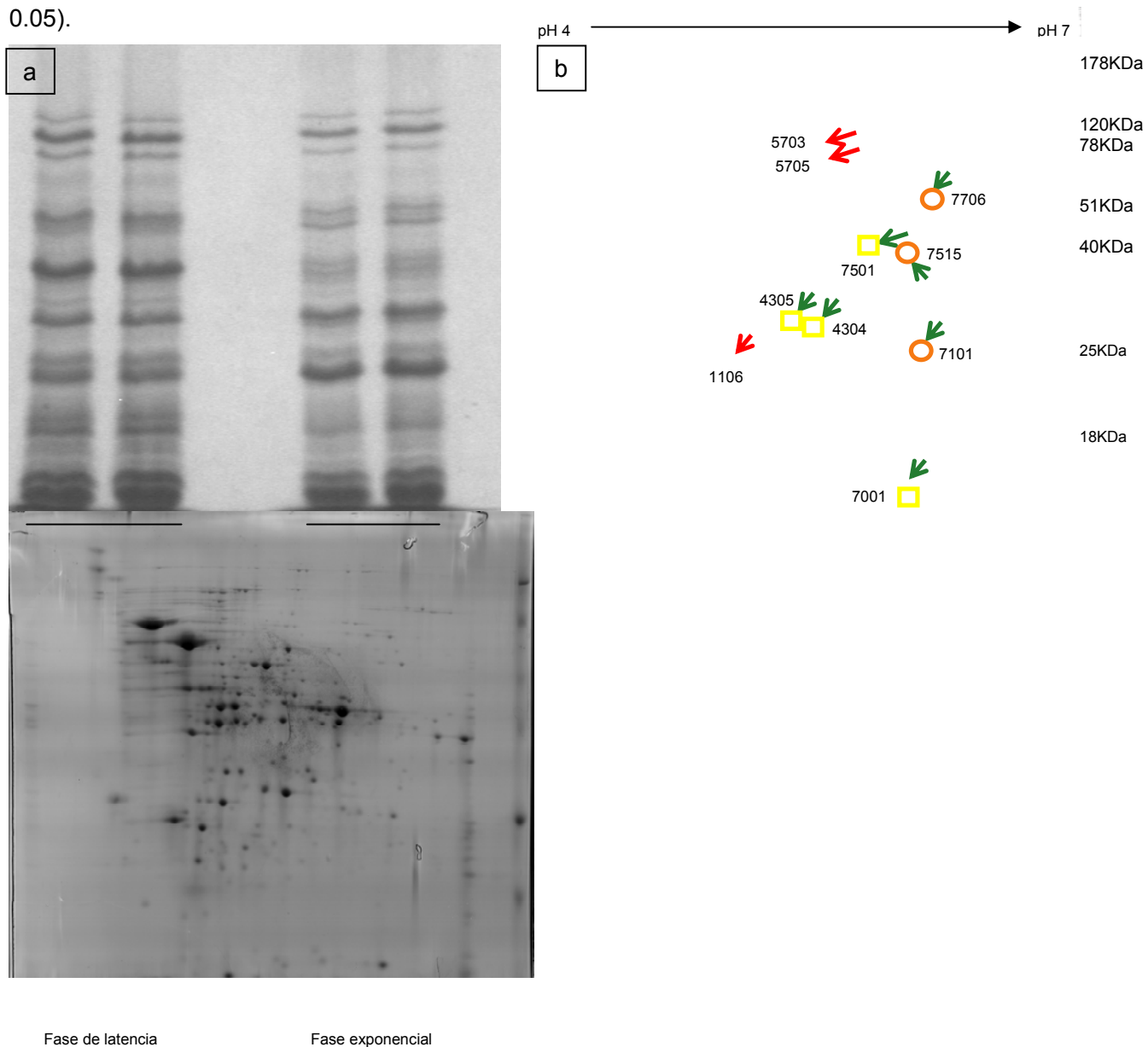


Figura 16. a) Electroforesis en condiciones denaturantes (gel de poliacrilamida al 12%), de extractos provenientes de las fases exponencial y de latencia de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158B. b) Electroforesis bidimensional de proteínas intracelulares (fase de latencia). Proteínas (300 μ g) extraídas con ultrasonido, en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM. Primera dimensión: tiras pH 4-7 (18 cm). Tinción con Blue Silver. Las flechas señalan las proteínas que fueron analizadas por espectrometría de masas. En rojo

las proteínas exclusivas de la fase de latencia, en verde las proteínas presentes en ambas fases, en cuadros amarillos las proteínas sobre expresadas, en círculos ocre las proteínas sub expresadas.

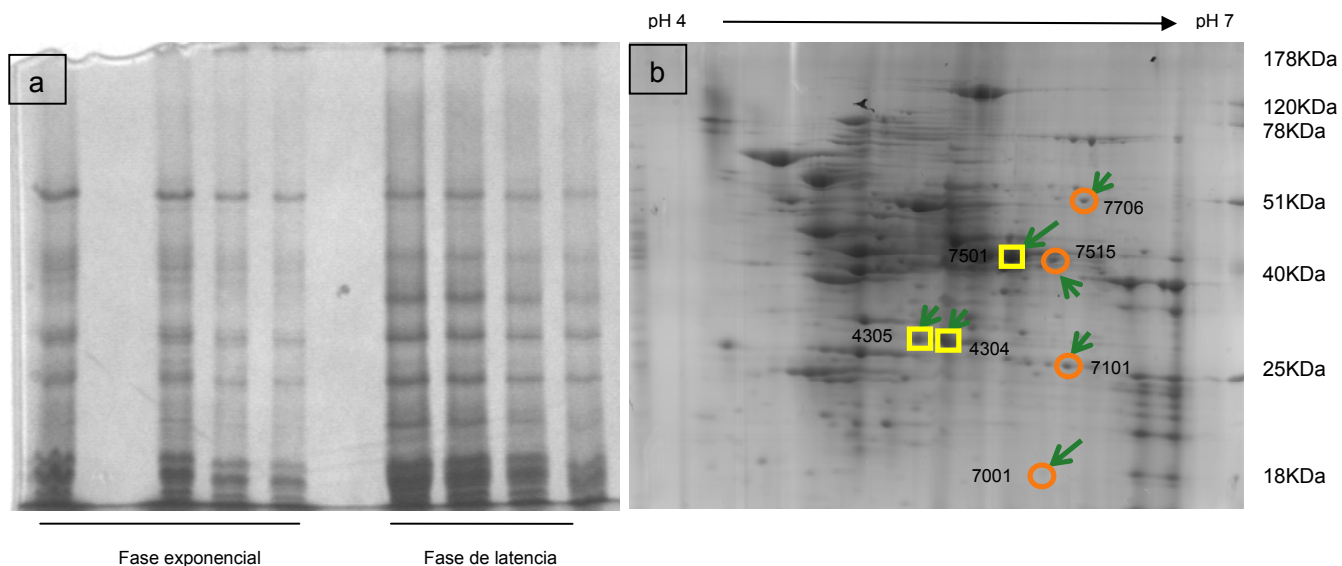


Figura 17.a) Electroforesis en condiciones denaturantes (gel de poliacrilamida al 12%), de extractos provenientes de las fases exponencial y de latencia de la cepa control *Clostridium* sp. IBUN 158 B. **b)** Electroforesis bidimensional de proteínas intracelulares (fase exponencial). Proteínas (300 μ g) extraídas con ultrasonido, en buffer fosfato con Pefabloc 10 mM. Primera dimensión: tiras pH 4-7 (18 cm). Tinción con Blue Silver. En rojo las proteínas exclusivas de la fase de latencia, en verde las proteínas presentes en ambas fases, en cuadros amarillos las proteínas sobre expresadas, en círculos ocre las proteínas sub expresadas.

6. Discusión

6.1 Diseño experimental

En este estudio, la aplicación de electroforesis bidimensional acoplada al análisis por espectrometría de masas, permitió establecer diferencias en cuanto a algunas de las proteínas expresadas en la fase de latencia y en la fase de crecimiento exponencial de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B y de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478, bajo condiciones de producción de 1,3-PD. Así mismo, la identificación de diez de estas proteínas a través de espectrometría de masas, demostró la presencia de enzimas necesarias en procesos de biosíntesis, así como en la producción del solvente de interés. A continuación se discuten detalladamente los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, los cuales enriquecen el estudio que realiza la línea de Microorganismos Solventogénicos del Grupo de Bioprocesos del IBUN en cuanto a la producción de solventes y de 1,3-PD, para entender mejor estos procesos desde un nivel metabólico.

6.2 Fermentaciones

En las especies de *Clostridium* productoras de solventes, las fermentaciones por lote se dividen en dos fases: la fase acidogénica y la solventogénica. El 1,3-PD es un metabolito primario, es decir que se sintetiza durante la fase exponencial de crecimiento. También durante la fase exponencial ocurre la fase acidogénica, en la cual el microorganismo crece y al mismo tiempo produce acetato, butirato, CO₂ e hidrógeno, de modo que el crecimiento y la producción de ácidos ocurren paralelamente. Es así como, tanto en la vía de producción de ácido acético como en la de ácido butírico se genera ATP por fosforilación a nivel de sustrato, que luego es utilizado en los procesos de biosíntesis (Figura 1). Durante este estado también se producen equivalentes reducidos (NADH₂),

los cuales, de no ser transferidos a un aceptor de electrones externo, son oxidados en la vía reductora para producir 1,3-PD (Reimann *et al.*, 1998).

En Clostridios productores de metabolitos secundarios como butanol, etanol y acetona, la acumulación de ácidos en el medio, trae como consecuencia una disminución en el pH, el cual puede llegar hasta pH 4.00. Esta condición según se ha sugerido, actúa como un inductor para la biosíntesis de las enzimas solventogénicas, que da paso a la segunda fase de la fermentación, en la cual se producen solventes. En este punto la producción de ácidos se detiene, así como el crecimiento celular. Así mismo, se sabe que los ácidos formados durante la fase acidogénica reingresan a la célula y actúan como co-sustratos para la producción de solventes, lo que trae como consecuencia el incremento del pH en el medio de cultivo (Gheshlaghi *et al.*, 2009).

En este estudio las fermentaciones se llevaron a cabo en condiciones de pH controlado (pH 7.00), por tal motivo no ocurrió el cambio de la fase acidogénica a la solventogénica, la cual como se mencionó anteriormente es inducida como una respuesta adaptativa de las células al bajo pH del medio (Saxena *et al.*, 2009). En las fermentaciones realizadas, solo se produjeron ácidos y 1,3-PD. Como era de esperarse, la producción de 1,3-PD, ocurrió de forma paralela al crecimiento del microorganismo, es decir durante la fase exponencial, la cual en todas las fermentaciones realizadas estuvo entre las 12 y las 21 horas para la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B y entre las 12 y las 23 horas de fermentación para la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478 (Figuras 6 y 7).

6.3 Determinación de ácidos y solventes por HPLC

De acuerdo a los valores obtenidos de sustrato y productos por medio de HPLC se definieron los rendimientos. En cuanto al rendimiento en la producción de 1,3-PD para la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B, fue superior ($0,78 Y_{\text{mol p/s}}$) al obtenido en otras investigaciones realizadas por el grupo ($0,67$ y $0,72 Y_{\text{mol p/s}}$) (Pérez, 2009), este resultado ratifica la validez de la optimización del medio de cultivo utilizado en las fermentaciones,

la cual ha sido uno de los mayores intereses del grupo en los últimos años (Aragón, 2007; Pérez, 2009). La optimización de un medio de cultivo permite incrementar el rendimiento de los procesos biotecnológicos, razón por la cual, los dos macronutrientes más relevantes (carbono y nitrógeno) son determinantes en la concentración de 1,3-PD obtenida por fermentación. Adicionalmente, las formulaciones utilizadas especialmente para la producción del glicol (1,3-PD) tienen suplementos que contienen elementos metálicos como potasio, magnesio, calcio, cobalto, cobre y zinc en forma de sales orgánicas. Estos elementos son importantes para el microorganismo al ser cofactores enzimáticos, cationes y/o componentes de estructuras como pared y membrana celular. Además se adicionan factores de crecimiento, como biotina y ácido para-aminobenzóico que son fuente de aminoácidos requeridos para la síntesis de las proteínas necesarias durante el crecimiento celular (González *et al.*, 2004).

En términos fisiológicos, la producción de 1,3-PD podría ocurrir por la necesidad de *Clostridium* sp. de emplear el ATP y los cofactores reducidos en la ruta reductiva de síntesis 1,3-PD (Figura 1); posteriormente estos cofactores una vez oxidados van a ser reducidos durante la síntesis de biomasa bacteriana y pueden entonces ser utilizados también en la producción de 1,3-PD (Biebl *et al.*, 1999). Esta función fisiológica del 1,3-PD, es la de regenerar los equivalentes reductores que son liberados para la formación de dihidroxiacetona así como durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato (Figura 1) en la ruta oxidativa (Saxena *et al.*, 2009).

La máxima producción de 1,3-PD se obtendría si solo se generara, acetato, CO₂ e H₂ como productos en la formación y utilización del piruvato. En contraste, si las dos moléculas de NADH liberadas durante la generación de una molécula de piruvato son reutilizadas para formar otros productos como el butirato, la formación de 1,3-PD se verá disminuida (Nakamura and Whited, 2003).

Los resultados obtenidos por HPLC mostraron bajos rendimientos en la producción de ácidos (Tabla 5), lo que podría estar favoreciendo la síntesis del solvente, dado que los cofactores oxidados para la producción de biomasa, se estarían generando en mayor medida a través de la ruta reductiva del 1,3-PD. En todas las fermentaciones realizadas, se registró una mayor producción de acetato que de butirato (Figuras 6 y 7), lo cual promueve la síntesis de 1,3-PD, ya que en la reacción de formación de acetato, de tres

moléculas de glicerol, una es usada para la producción de este ácido, así mismo se forman dos moléculas de NADH₂, las cuales luego serán utilizadas en la ruta reductiva de producción de 1,3-PD (esto sin considerar la generación de biomasa) (Saxena *et al.*, 2009). Por otra parte, en la vía de formación de butirato ocurren dos pasos de oxidación de NADH, lo cual convierte a esta vía en una ruta competitiva para la producción de 1,3-PD, en cuanto a la disponibilidad de equivalentes reducidos (Biebl *et al.*, 1998).

Sin embargo; debe considerarse que varias de las vías mencionadas anteriormente, son usadas simultáneamente por los microorganismos, lo que pudo desencadenar la baja producción de ácidos, así como el alto rendimiento en la formación de 1,3-PD. De esta manera, la distribución de productos durante las fermentaciones es función de los múltiples factores que influyen la fisiología celular, la regulación génica, así como la actividad de los genes producidos, lo que determina la expresión de las proteínas durante las distintas fases de crecimiento de *Clostridium* sp. (Nakamura and Whited, 2003).

6.4 Separación de las proteínas intracelulares

A continuación se presentan los análisis correspondientes al primer objetivo planteado en el estudio que consiste en la separación de las proteínas intracelulares de acuerdo a su carga y a su tamaño utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones.

En los estudios en proteómica es de suma importancia la estandarización de técnicas y métodos que aseguren la obtención de fracciones adecuadas para la realización de electroforesis bidimensional. Durante estudio, se estandarizó un método basado en el uso de ultrasonido que permitió la obtención de una fracción representativa de proteínas intracelulares. Mediante la acción de ondas sonoras de alta frecuencia, se busca la ruptura de las paredes celulares bacterianas y por ende se logra la extracción, desagregación y solubilización de las proteínas (Mao *et al.*, 2009). Del mismo modo, se estableció un protocolo de isoelectroenfoque que permitió separar con una buena resolución, las proteínas intracelulares expresadas en las dos fases de crecimiento

evaluadas, tanto en la cepa nativa como en la cepa control, este protocolo difiere en ciertos pasos, con otro estandarizado en estudios previos para la separación de proteínas extraídas de *Clostridium acetobutylicum*, particularmente en lo que se relaciona con el voltaje final, dado que para este caso fue de 3500 V (Schwarz *et al.*, 2007), mientras que en el protocolo establecido en este estudio, se llegó hasta 10000 V.

6.4.1 Electroforesis en dos dimensiones

El análisis de fracciones del proteoma de un organismo, en este caso particular de la fracción intracelular, ofrece varias ventajas dado que permite reducir la complejidad del proteoma, mejora la separación y evita el solapamiento por parte de proteínas abundantes. La suma de estos factores aumenta la probabilidad de identificar de manera significativa las proteínas separadas mediante electroforesis bidimensional (Lefkovits, 2003; Dhingra *et al.*, 2005). De la misma manera, el trabajo en proteómica requiere de una alta reproducibilidad experimental, la cual determina la obtención de datos biológicamente representativos. Para este estudio los geles finales y sus réplicas presentaron coeficientes de correlación significativos, tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase de latencia, en la cepa nativa (0.84 y 0.95) y en la cepa control (0.80 y 0.89, respectivamente), lo que indica alta similitud entre los geles y es evidencia de reproducibilidad experimental. Si bien para *Clostridium* sp. los trabajos en proteómica no reportan valores de coeficientes de correlación, si destacan dentro de sus resultados, reproducibilidad entre los geles bidimensionales obtenidos (Sullivan and Bennett, 2005; Schwarz *et al.*, 2007).

6.5. Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales

A partir de este punto los análisis se centran en discutir los resultados obtenidos en cuanto al análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en las fases de crecimiento evaluadas y posteriormente en las funciones de las proteínas seleccionadas, identificadas mediante espectrometría de masas en tándem, utilizando el método de mapeo peptídico.

6.5.1 Perfiles de las proteínas diferencialmente expresadas

Mediante el análisis realizado a los geles obtenidos fue posible establecer diferencias entre las proteínas sintetizadas en las fases de crecimiento evaluadas, registrándose alrededor de cincuenta spots expresados exclusivamente durante la fase de latencia de la cepa nativa (Figura 12). Este resultado era de esperarse si se considera que es en dicha fase, cuando ocurre la síntesis de las enzimas requeridas para el crecimiento celular, la utilización de los nutrientes presentes en el medio del cultivo y la producción de los metabolitos esenciales ausentes en el mismo (Madigan *et al.*, 2009).

De igual manera, los análisis de los geles obtenidos permitieron establecer las proteínas a identificar mediante espectrometría de masas. En este punto es importante destacar que para todos los spots analizados, el score fue mayor a 85 (Tabla 6). El score mide la probabilidad de que el match (apareamiento) entre un dato experimental proveniente del análisis por espectrometría de masas en tándem y la secuencia reportada en la bases datos sea un evento al azar. El umbral para este parámetro establecido por defecto, está entre 45 y 85, de manera que los valores superiores a 85 representan una probabilidad menor al 5 % de que el match realizado sea un evento al azar, es así como la asignación de la secuencia péptidica en la base de datos es correcta, lo que indica que la identificación de las proteínas analizadas se llevó a cabo de forma estadísticamente significativa.

6.6 Asignación de la identidad de la secuencia peptídica derivada de MS/MS

Se han descrito alrededor de 25 enzimas que participan en la fermentación del glicerol; el análisis por espectrometría de masas permitió detectar la presencia de tres de ellas en la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B, así como en la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478.

Como parte de la ruta reductiva, se identificó a la enzima 1,3- propanodiol deshidrogenasa dependiente de NADH (Anexo 9), la cual reduce una molécula de 3- hidroxipropionaldehído para formar 1,3-PD en la ruta reductiva (Figura 1) (Johnson and Lin, 1987; Vega and Foster, 1992). Según reportes, la mayor actividad de esta enzima ocurre al final de la fase exponencial, en donde a su vez se presenta la máxima producción de 1,3-PD (Hongwen *et al.*, 2005). Sin embargo; a partir de los geles bidimensionales obtenidos y de los análisis realizados, se resalta como un resultado importante para el estudio la presencia de la enzima 1,3- propanodiol deshidrogenasa dependiente de NADH sobre expresada (Figura 11) en las dos fases de crecimiento evaluadas (T-student $p \leq 0,05$).

Investigaciones realizadas para caracterizar la enzima 1,3- propanodiol deshidrogenasa dependiente de NADH, han establecido que ésta es inducida en anaerobiosis y en presencia de glicerol en el medio, dichas condiciones se generaron en las fermentaciones realizadas, lo cual explica en cierta medida la expresión de la enzima en las dos etapas del crecimiento del microorganismo que fueron evaluadas (fase de latencia y de crecimiento exponencial). De igual manera, se sabe que la síntesis y sobre expresión de esta enzima en la ruta reductiva, ocurre con el fin último de prevenir la acumulación del intermediario 3- hidroxipropionaldehído producido a partir de glicerol, el cual es un compuesto tóxico a nivel celular (Chen *et al.*, 2011). Estudios previos realizados en el grupo de investigación revelaron que *Clostridium* sp. IBUN 158 B, presenta una mayor tendencia al consumo de NADH, en comparación con cepas como *Clostridium* DSM 2478 (Amaya and Pardo, 2009); con lo que se haría necesaria la expresión de la enzima durante toda la fermentación, tal y como se describe en este trabajo.

Como parte de la ruta oxidativa se identificó la enzima triosafosato isomerasa (Anexo 10), que cataliza la isomerización reversible de la hidroxiacetona fosfato a gliceraldehído-3- fosfato (Figura 1). Hasta el momento no se conoce otro microorganismo aparte de *Clostridium butyricum* que pueda producir di-hidroxiacetona fosfato a partir de glicerol, compuesto que posteriormente es metabolizado en la glicolisis. La enzima triosafosato isomerasa, cataliza una de las reacciones del proceso, cuyo producto es el gliceraldehído- 3- fosfato, intermediario, que luego es metabolizado hasta piruvato. Estudios previos demuestran la importancia de esta enzima (Rentier *et al.*, 1993;

Rozovosky and McDermott, 2001), la cual está presente en todos los organismos vivos (enzima housekeeping), participando en varias vías metabólicas tales como la glicolisis y la gluconeogénesis, así como en los procesos energéticos que ocurren estas rutas (Dhalluin *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006); razón por la cual ha sido ampliamente estudiada en términos de su estructura y actividad (Shing *et al.*, 1975).

La otra enzima identificada en la ruta oxidativa fue la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Anexos 5 y 6) que cataliza la reducción de acetoacil-CoA por el NADH, generando hidroxiacil-CoA, un intermediario importante para la producción de butirato y butanol (Figura 1) (Hartmanis and Gatenbeck, 1984; Youngleson *et al.*, 1989). Estudios sobre la actividad de la enzima en cultivos en lote, describen que ésta se ve incrementada durante la fase exponencial de crecimiento y luego se mantiene constante una vez el crecimiento cesa (Gheshlaghi *et al.*, 2009). Si bien en este estudio, los niveles de butirato fueron bajos (Tabla 5), su producción ocurrió paralelamente al crecimiento celular del microorganismo (Figuras 6 y 7). Es así como, la presencia de la enzima 3-hidroxiacil-CoA (sobre expresada) en ambas fases de crecimiento (Figuras 16 y 17), puede favorecerse si durante las fermentaciones se controlan las condiciones de pH con lo cual se promueve la producción de ácidos y se inhibe la formación de solventes, como es el caso de este estudio. Así mismo, es posible que durante la fase de latencia, ocurra la síntesis de esta enzima así como de toda la maquinaria enzimática requerida para la producción de ácido butírico, posterior a esto la enzima 3-hidroxiacil-CoA permanece sobre expresada hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial, periodo en el cual su actividad incrementa, favoreciendo de este modo, la producción de una mayor cantidad de butirato.

Como se mencionó anteriormente en ambas cepas estudiadas, la fase de latencia se destacó por presentar un mayor número de proteínas exclusivas. Es así como, con el análisis por espectrometría de masas en tandem fue posible estudiar tres de estas proteínas. Se identificó la enzima aconitato hidratasa (Anexo 2) (Figura 16), perteneciente a la familia de las aconitasas citoplasmáticas, altamente conservadas entre procariotas y eucariotas y reconocidas por presentar diversas funciones a nivel celular. La aconitato

hidratasa, es la segunda enzima del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) o ciclo de Krebs y cataliza la isomerización del citrato a isocitrato (Jordan *et al.*, 1999). Si bien en bacterias anaerobias no ocurre el ciclo de Krebs de la misma manera que en organismos aerobios, sí se producen todos los intermediarios biosintéticos de esta ruta, ya sea a través de una forma incompleta del ciclo (propia de anaerobios), o mediante reacciones anapleróticas (Baumgart and Bott, 2010). Es así como, la presencia de la aconitasa, favorece la formación de isocitrato a partir del cual se genera α -cetoglutarato, uno de los principales precursores de aminoácidos que finalmente constituirán las proteínas, cuya síntesis, como se mencionó anteriormente ocurrirá en mayor proporción durante la fase de latencia.

En microorganismos Gram positivos como *Bacillus subtilis* esta enzima es también requerida para la esporulación (Serio *et al.*, 2006). Adicionalmente se ha comprobado que presenta regiones específicas de unión al DNA y está implicada en la regulación del metabolismo del hierro, controlando la expresión de los operones que codifican para el sistema de adquisición de este metal, bajo condiciones limitantes (Alén and Sonenshein, 1999; Tsuchiya *et al.*, 2008; Baumgart and Bott, 2010). Con respecto a los clostridios, si bien la enzima aconiato hidratasa esta reportada para algunas especies como *C. butyricum* y *C. ljundahlii* (Köpke *et al.*, 2010), los análisis genómicos también han demostrado su ausencia en otras especies, como *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.* 2001). Es importante mencionar que esta enzima ha sido caracterizada bioquímicamente en organismos eucariotas como las levaduras; así como en algunos procariotas tanto gram negativos como gram positivos, sin embargo; no se encontraron estudios de este tipo para *Clostridium* sp.

Otra proteína expresada de manera diferencial durante la fase de latencia, fue la enzima glutamina sintasa (Anexo 3), que participa en el metabolismo de los aminoácidos, específicamente cuando el amonio reacciona con el glutamato, en presencia de ATP para producir glutamina, uno de los veinte aminoácidos de las proteínas (Krishnan and Ramji, 1985; Köpke *et al.*, 2010). Mediante esta reacción, la célula bacteriana asimila el amonio, el cual proviene de una fuente orgánica (extracto de levadura) y de otra inorgánica ((NH₄)₂SO₄), ambas, constituyentes del medio de cultivo utilizado para las fermentaciones.

Adicionalmente, son de relevancia para el estudio, investigaciones que demuestran que el metabolismo del nitrógeno influye de cierta manera en la producción de solventes en especies de *Clostridium* sp. particularmente *C. acetobutylicum* (Usdin *et al.*, 1986; Kim, 2002), en esta especie la glutamina está relacionada con la biosíntesis del NAD⁺ (cofactor en las reacciones de oxido- reducción), dado que dicho aminoácido, promueve la actividad de las enzimas involucradas en el proceso (Resto *et al.*, 2009). Es así como, la producción de 1,3-PD podría verse incrementada por la síntesis de glutamina, que favorece la formación de NAD⁺, el cual una vez reducido participaría en la ruta reductiva, mediante la cual se genera el 1,3-PD.

La última de las enzimas identificadas, expresada únicamente en la fase de latencia, fue la inosin-5'-monofosfato-deshidrogenasa (Anexo 4), la cual cataliza un paso esencial en la biosíntesis de novo de los nucleótidos de guanina, específicamente la conversión de inosin- 5'- monofosfato a xantosina- 5'- monofosfato, con la reducción del cofactor NAD⁺ (Mizushina *et al.*, 2007). Esta enzima, controla el tamaño del pool de nucleótidos guanina presentes en la célula, los cuales son necesarios para la síntesis de RNA y DNA y a su vez influye en muchos procesos fisiológicos, que incluyen la replicación, la transcripción y la señalización, durante el metabolismo basal, así como en la proliferación celular (Zhang *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudios previos realizados con la enzima inosin-5'-monofosfato-deshidrogenasa en eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*) y en procariontes (*E. coli*), han encontrado que ésta presenta sitios específicos de unión al DNA y por ende posiblemente regule algunos de los procesos celulares (McLean *et al.*, 2004). Para *Clostridium* sp. se halló un reporte en el que se describe el cluster de genes responsables de la biosíntesis de purinas (Köpke *et al.*, 2010), pero no se encontraron estudios en los que se realice su caracterización bioquímica.

Los otros spots identificados correspondieron a proteínas ribosomales (S2 y L10), (Anexos 7 y 8) cuya principal función radica en ser constituyentes de los ribosomas bacterianos. La proteína ribosomal S2 hace parte de la subunidad 30S (Powers *et al.*, 1988), mientras que la proteína L10 constituye la subunidad 70S (Gudkov, 1980). Estudios genómicos han permitido establecer la presencia de estas dos proteínas en

Clostridium sp. (Nölling *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002; Sebahia *et al.*, 2007). Así mismo, se ha encontrado que las proteínas ribosomales S2 y L10, al parecer establecen enlaces con el factor de iniciación de la traducción (IF2), regulando su actividad y favoreciendo de esta manera la síntesis de proteínas durante la fase de latencia, periodo en el cual el microorganismo se prepara para crecer y se adapta a las características propias medio de cultivo (Laalami *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 2003; Vishwanath *et al.*, 2004).

Finalmente, se identificó la enzima asparato- semialdehído deshidrogenasa (Anexo 1), la cual participa en la ruta metabólica del ácido aspártico y cataliza la conversión de aspartato - semialdehído en aspartil fosfato, mediante una fosforilación reductiva, en una reacción reversible dependiente de NADP⁺ y de un fosfato. Al parecer, esta ruta es fundamental para la sobrevivencia de los microorganismos y comienza a partir del oxalacetato, uno de los intermediarios generados en el ciclo de Krebs (Moore *et al.*, 2002).

El ciclo del aspartato se lleva a cabo por muchas bacterias para producir lisina, treonina, metionina e isoleucina, así como varios intermediarios metabólicos no protéicos, dentro de los cuales se destacan el diaminopimelato, un componente esencial necesario para las uniones cruzadas de los polímeros que constituyen la pared celular bacteriana, el S-adenosil metionina que funciona como donador de grupos metilo en numerosas reacciones biológicas, además de ser precursor de moléculas de señalización (quórum-sensing) y el dihidrodipicolinato, necesario para la síntesis de dipicolinato, que se caracteriza por ser el mayor componente de las esporas bacterianas en microorganismos Gram positivos (Faehnle *et al.*, 2006).

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que en *Bacillus* sp. la enzima asparato - semialdehído deshidrogenasa también presenta actividad RNAasa (Faehnle *et al.*, 2005; Curien *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2004). Es importante aclarar que para *Clostridium* sp. no se tienen reportes en los que se describan las funciones antes descritas. La presencia de la enzima se ha registrado en las especies *C. butyricum*, *C. perfringes*, *C. botulinum* y *C. acetobutylicum* con base análisis genómicos (Nölling *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002; Sebahia *et al.*, 2007). Sin embargo; en la revisión que se hizo

para este trabajo, no se encontraron estudios experimentales acerca de la actividad de la enzima y su caracterización bioquímica.

Las dos proteínas ribosomales junto con la enzima asparato-semialdehído-deshidrogenasa, fueron expresadas tanto en la fase de latencia como en la fase de crecimiento exponencial (Figuras 16 y 17), lo cual puede deberse a su participación en la síntesis de proteínas, constituyéndose como enzimas necesarias durante todo el ciclo de vida de la bacteria, más aún si ante un cambio en las condiciones del medio, se promueve la síntesis de nuevas enzimas que son requeridas para las distintas vías metabólicas que se estén utilizando a nivel celular.

Finalmente, es importante mencionar que se tiene previsto identificar la totalidad de las proteínas diferencialmente expresadas, dado que se requiere continuar con el estudio a fin de establecer diferencias en cuanto a la fase de latencia y la fase de crecimiento exponencial tanto en la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B como de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478, bajo condiciones de producción de 1,3-PD.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

La aplicación de electroforesis bidimensional acoplada al análisis por espectrometría de masas, permitió establecer diferencias en cuanto a algunas de las proteínas expresadas en la fase de latencia y en la fase de crecimiento exponencial tanto en la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B como en la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478 en condiciones de producción de 1,3-PD.

Las enzimas 1,3- propanodiol deshidrogenasa dependiente de NADH y 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa estuvieron sobre expresadas tanto en la fase de latencia como en la fase de crecimiento exponencial de la cepa control *Clostridium butyricum* DSM 2478 y de la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN 158 B, lo cual demuestra la importancia de estas enzimas durante la fermentación bacteriana, no solamente en al final de la fase exponencial, en la cual siempre se ha reportado su máxima actividad.

Mediante el análisis por espectrometría de masas se identificaron diez de las proteínas diferencialmente expresadas, tres de las cuales fueron exclusivas de la fase de latencia (Aconitato hidratasa, Glutamina sintetasa y Triosafofato isomerasa), las demás estuvieron presentes en ambas fases pero presentaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión. De este modo, cuatro enzimas estuvieron sub expresadas (Aspartato-semialdehido deshidrogenasa, Proteína ribosomal S2, Proteína ribosomal L10 y la enzima Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa) mientras que las restantes se observaron sobre expresadas (3-hidroxi-butiril-coa deshidrogenasa y la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa).

Algunas de las proteínas identificadas están implicadas en procesos de biosíntesis, tal es el caso de las enzimas Glutamina sintetasa (síntesis de glutamina), Triosafofato isomerasa (síntesis de Gliceraldehído-3- fosfato), Aspartato- semialdehído deshidrogenasa (síntesis de ácido aspártico), Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (síntesis de nucleótidos), Aconitato hidratasa (ciclo de Krebs) y las dos proteínas ribosomales S2 y L10 (síntesis de proteínas). Otras están relacionadas con la producción de 1,3-PD en la ruta reductiva (1,3-propanodiol deshidrogenasa) y de hidroxibutiril- CoA (3-hidroxibutiril-coa deshidrogenasa) en la ruta oxidativa.

En *Clostridium* sp. se ha reportado la presencia de tres de las proteínas identificadas (Aspartato- semialdehído deshidrogenasa, Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa y Aconitato hidratasa) con base en información obtenida a partir de análisis genómicos, sin embargo; no se encontraron estudios en los que se reporte su caracterización a nivel bioquímico y funcional.

7.2 Recomendaciones

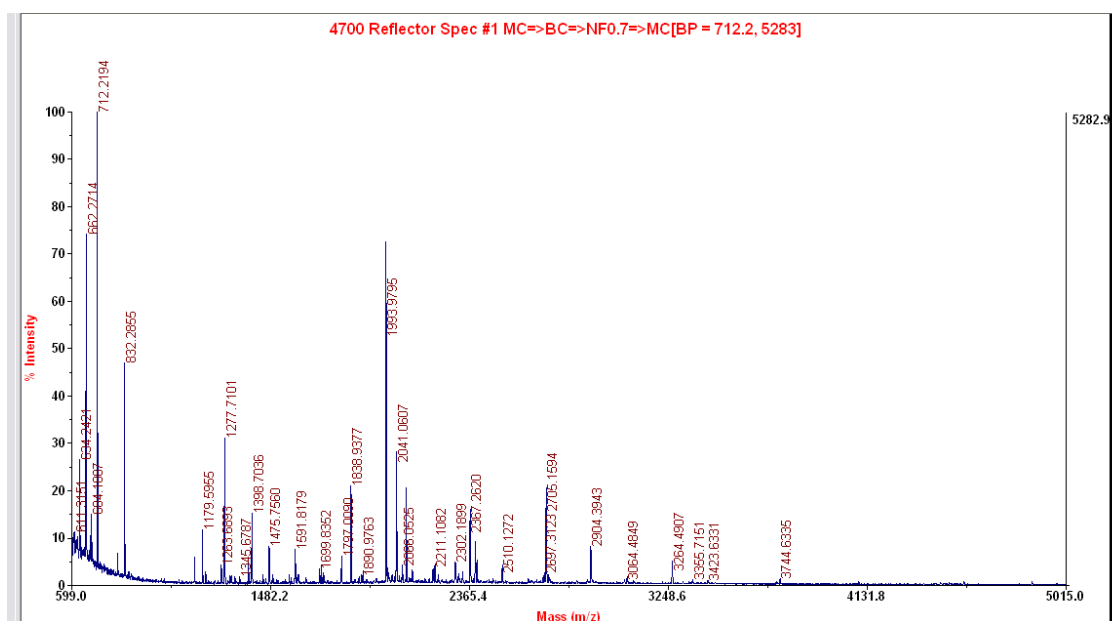
El enfoque de este trabajo, es un aporte novedoso al estudio de las proteínas intracelulares expresadas en dos fases del crecimiento del microorganismo de interés. Es importante continuar con la identificación por espectrometría de masas de todas las proteínas diferencialmente expresadas, con lo cual se podría tener información útil para alimentar el diseño del metaboloma y obtener cepas mutantes hiperproductoras de 1,3-PD.

Es importante llevar a cabo análisis proteómicos en diferentes puntos del crecimiento bacteriano, evaluando desde el inicio hasta el final de la fermentación, en condiciones de producción de 1,3-PD, con el fin de determinar otras diferencias en los perfiles de proteínas expresadas incluso a nivel de puntos pertenecientes a la misma fase de crecimiento, en cepas productoras del solvente de interés.

Realizar análisis que permitan la determinación de posibles modificaciones post-traduccionales a nivel de las proteínas diferencialmente expresadas entre las fases de crecimiento de la cepa nativa.

A. Anexo: Espectros de masas

Anexo 1: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Aspartato-semialdehído deshidrogenasa



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.242126, 662.271362, 684.188660, 690.320435, 712.219360, 1143.618896, 1274.685181, 1323.676514, 1344.678711, 1398.703613, 1448.848389, 1563.801636, 1572.831665, 1587.796997, 1591.817871, 1600.812012, 1604.820190, 1797.009033, 1837.970581, 1873.962524, 1885.945313, 1890.976318, 2004.018921, 2021.009277, 2033.972412, 2038.009277, 2041.060669 ions(583.547180, 595.512390, 652.593262, 706.645264, 723.647888, 773.768127, 776.614990, 794.706665, 842.540527, 870.756409, 877.689697, 895.798523, 1008.693787, 1008.947510, 1018.879883, 1033.643066, 1033.946167, 1146.942627, 1171.978394, 1247.996826, 1249.133667, 1301.101929, 1318.940918, 1372.160645, 1391.103638, 1459.112305, 1572.296265, 1723.335083, 1842.485840, 1914.652344), 2055.105713, 2066.052490, 2084.056396 ions(175.114822, 532.427673, 577.394714, 603.448792, 650.418457, 678.482788, 706.452454, 709.581604, 731.568481, 733.364197, 749.565979, 786.615662, 787.287903, 804.433655, 804.596619, 805.569763, 813.606262, 885.539368, 889.612061, 894.665405, 896.771362, 903.622803, 995.716370, 999.611816, 1002.555298, 1002.744385, 1047.574829, 1053.676758, 1066.897583, 1082.766113, 1089.587524, 1100.722046, 1164.773682, 1172.605347, 1181.855347, 1191.800415, 1280.931885, 1379.968872, 1483.039795, 1510.056885, 1554.089355, 1637.131714, 1640.741821, 1808.339111, 1809.209595) 2112.042969, 2203.044434, 2300.265869, 2318.177979, 2334.164551, 2390.283691, 2697.312256, 2716.387451, 2721.285645, 2902.410400, 3053.589355, 3064.484863, 3264.490723, 3354.715088, 3422.633057, 3744.633545

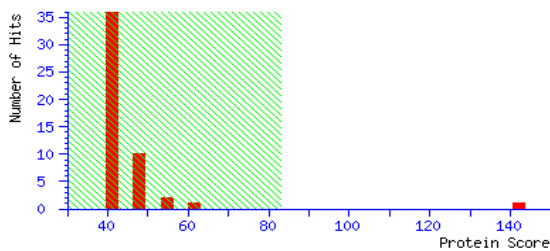
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.1 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications: Carbamidomethyl (C),
Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.05 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

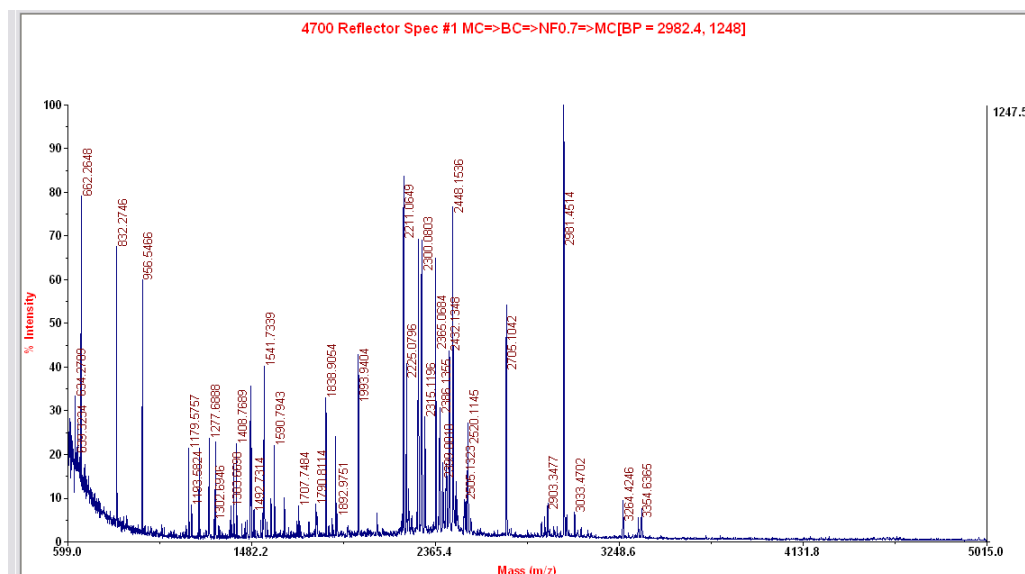
Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 182416538	40190	142	aspartate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Clostridium butyricum</i> 5521]

Anexo 2: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Aconitasa hidratada.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.278931, 662.264771, 956.546631 ions(86.135254, 112.141235, 116.110016, 158.171494, 175.177795, 187.173004, 215.175735, 229.196457, 243.214081, 271.251007, 272.234833, 288.289612, 328.270691, 342.299316, 356.299896, 370.375397, 387.389221, 414.366089, 437.385925, 441.374847, 443.349304, 455.426819, 457.340118, 459.391235, 468.172852, 470.337708, 499.411133, 499.538116, 516.452271, 556.434998, 557.404602, 558.315552, 570.426575, 574.423096, 578.587219, 582.255798, 629.537292, 641.495605, 651.684875, 662.406189, 668.561157, 669.494812, 673.621155, 720.438171, 742.628601, 743.553223, 753.504150, 819.526794, 821.642090, 823.710876, 838.676331, 841.695251, 849.388489, 857.809814, 870.644043, 892.712158, 895.728638, 897.561096), 1228.634644, 1323.643311, 1377.765259, 1395.767578, 1408.768921, 1460.746460, 1478.713989, 1492.731445, 1526.795898, 1536.864380, 1540.762695, 1574.803223, 1589.797363, 1756.835083, 1790.811401, 1793.828735, 1796.995361, 1837.934204, 1868.883667, 1884.821533, 1892.975098, 2282.056152, 2296.077881, 2313.093994, 2365.068359, 2403.055908, 2415.115723, 2418.080322, 2430.102051, 2447.108154 ions(175.159256, 373.253143, 373.419495, 460.236237, 460.374725, 502.373230, 526.293152, 545.384460, 545.510559, 546.511108, 601.486633, 614.449524, 655.356873, 678.536316, 730.508789, 754.530273, 801.643616, 802.479919, 817.618469, 838.706421, 884.659912, 915.597961, 915.777649, 986.618591, 1087.893677, 1222.911377, 1238.812134, 1239.063477, 1248.881348, 1253.946411, 1256.017090, 1270.040894, 1273.919800, 1439.124512, 1453.190674, 1464.071899, 1499.145996, 1612.262573, 1668.347778, 1694.297852, 1764.384766, 1767.376465, 1781.444946, 1825.392822, 1826.294800, 1845.401611, 1889.460938, 1896.486816, 1960.517944, 2314.560547, 2319.664307, 2321.510010, 2328.696777, 2329.505371, 2367.273926, 2383.245117, 2386.077637, 2388.202881, 2388.966797), 2462.170654, 2505.132324, 2519.132324, 2888.322998, 2902.347656, 2980.455078 ions(112.110176, 175.165482, 255.178680, 271.032013, 271.186279, 272.216827, 275.177002, 277.178101, 329.237000, 343.257050, 369.230560, 370.196320, 370.303558, 386.297058, 388.264313, 400.332062, 446.261475, 460.299713, 470.318512, 488.429230, 501.415833, 520.435364, 522.431946, 541.409912, 557.434448, 559.314087, 568.226868, 569.467041, 572.521118, 600.711365, 601.389709, 616.676514, 628.413696, 631.289124, 631.496338, 632.360046, 638.573792, 656.380981, 656.548767, 662.406494, 665.288147, 675.454529, 689.397339, 702.471802, 726.447693, 727.566040, 729.350525, 732.396790, 744.365601, 744.592529, 764.418945, 770.535950, 776.379517, 777.458435, 778.632446, 789.719971, 803.436340, 814.588196, 817.936157, 819.297913, 819.602600, 820.130920, 820.522095, 821.602478, 840.795593, 843.777222, 854.033813, 860.593872, 868.651978, 889.466248, 889.816528, 890.448669, 890.755188, 891.667847, 894.361755, 895.839722, 896.620544, 899.459778, 906.290344, 907.402344, 907.581665, 907.762268, 909.529602, 916.711548, 918.690125, 919.580505,

927.814453, 928.478210, 929.676697, 933.671387, 935.972473, 936.540955, 936.743347, 938.915649, 957.890686, 1002.911865, 1014.572144, 1017.709229, 1020.663940, 1020.941040, 1021.793152, 1032.817627, 1045.196411, 1049.681763, 1050.838135, 1072.005615, 1102.082642, 1103.613892, 1119.741577, 1120.007202, 1120.595581, 1120.876587, 1121.142944, 1152.884766, 1191.079102, 1204.579102, 1209.102295, 1252.022217, 1326.938843, 1378.100708, 1449.130249, 1449.946533, 1487.138916, 1503.885986, 1505.131348, 1505.414063, 1506.891479, 1507.241821, 1549.688232, 1550.301758, 1552.174805, 1573.947266, 1589.385132, 1591.756226, 1592.272705, 1593.153198, 1605.166260, 1643.169434, 1660.797974, 1677.005737, 1691.958252, 1760.982666, 1775.281006, 1776.410034, 1844.969849, 1852.269165, 1863.355469, 1864.731934, 1963.519775, 2081.645752, 2708.974365, 2710.840332, 2713.107178, 2714.382324) , 2981.451416, 2995.448730, 3032.470215, 3264.424561, 3338.677002, 3353.636475

7.1.2 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Protein Summary Report

Format As Protein Summary (deprecated) [Help](#)

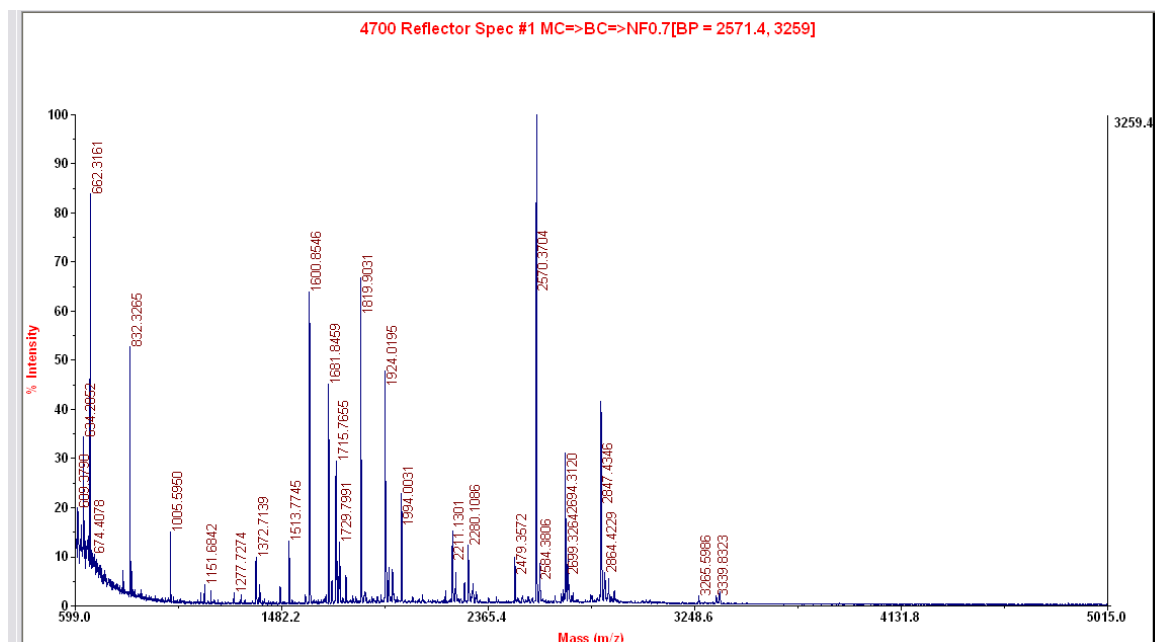
Significance threshold $p <$ 0.05 Max. number of hits 20

Re-Search All Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi1182420018	69100	168	putative aconitate hydratase [Clostridium butyricum 5521]

Anexo 3: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Glutamina sintetasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.285156, 662.316101, 1135.684814, 1151.684204, 1371.711426, 1387.711914, 1513.774536, 1599.863892, 1681.845947, 1695.849121, 1711.825806, 1715.765503, 1725.838013, 1729.799072, 1755.955933, 1819.903076, 1924.019531, 1928.010986, 1956.002930, 2263.065674, 2279.057129, 2315.203125, 2479.357178, 2570.370361 ions(112.119743, 129.119553, 175.146851, 341.192444, 342.202118, 359.262482, 371.213928, 428.224915, 431.250549, 456.232513, 456.342834, 473.320007, 502.287262, 543.361450, 544.432739, 571.388367, 599.452209, 658.335083, 672.397766, 672.604004, 682.455078, 684.373779, 699.466614, 768.450256, 769.425964, 786.455566, 786.592346, 899.606079, 956.579285, 956.796814, 1069.680908, 1069.869141, 1156.716431, 1156.933838, 1157.820557, 1257.914429, 1313.965942, 1356.952026, 1357.141602, 1440.111816, 1458.121460, 1618.186157, 1788.275879, 1828.368164, 1872.385010, 1899.401123, 2029.449951, 2098.624756, 2100.490234, 2175.580078, 2212.699951, 2213.545654, 2329.680664, 2332.571533), 2584.380615, 2694.312012, 2710.315430, 2727.333252, 2847.434570, 2861.434082, 2879.423096, 2904.440918, 3264.598633, 3338.832275, 3353.825439

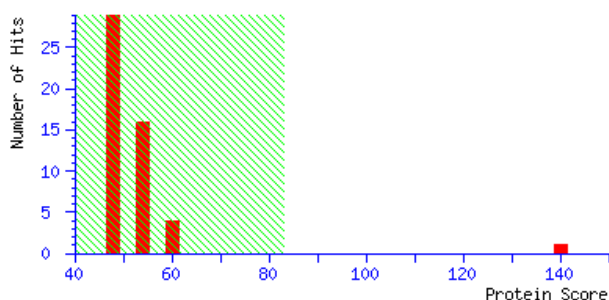
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.3 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

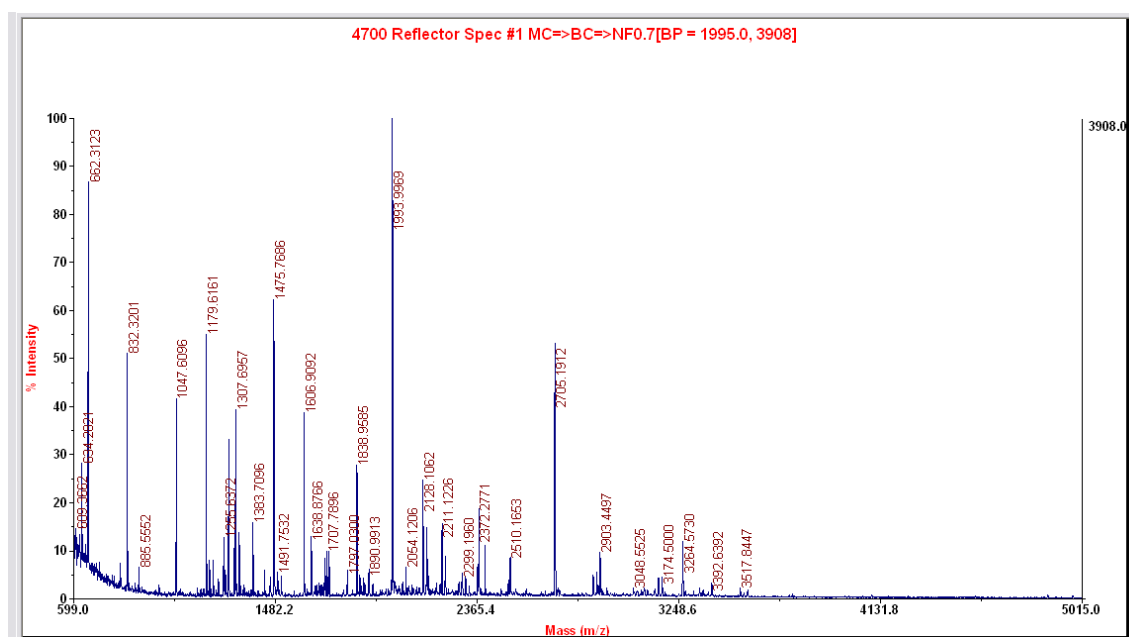
Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 182420112	71763	140	glutamine synthetase [Clostridium butyricum 5521]

Anexo 4: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Inosin-5' monofosfato- deshidrogenasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.282104, 662.312317, 885.555176, 1047.609619 ions(86.120064, 112.125214, 129.152878, 175.162048, 200.185791, 219.168564, 228.205139, 230.160828, 247.202286, 287.257019, 288.288177, 311.228027, 328.284576, 346.290894, 398.314636, 399.273926, 415.312988, 416.264221, 429.345123, 456.361511, 467.378754, 473.368896, 474.399170, 476.403412, 528.410339, 532.453796, 557.438232, 574.480652, 599.347595, 632.469604, 668.617004, 685.549988, 702.527405, 703.554504, 711.391296, 749.639587, 766.585327, 784.655518, 828.365295, 848.137756, 861.200195, 901.869263, 917.779724, 958.448425, 986.797302), 1209.631592, 1231.664307, 1255.637207, 1323.688721, 1458.744873, 1606.909180, 1797.030029, 1837.978271, 1890.991333, 2053.120605, 2128.106201, 2144.106689, 2315.191162, 2372.277100, 2501.287354, 2888.424072, 2896.424072, 2902.465088, 2932.560547, 3048.552490, 3142.527832, 3158.513184, 3174.500000, 3264.572998, 3276.653076, 3313.396484, 3338.801270, 3354.753174, 3376.627441, 3392.639160, 3517.844727, 3550.778564

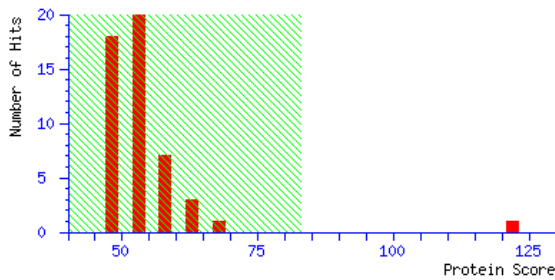
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.4 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

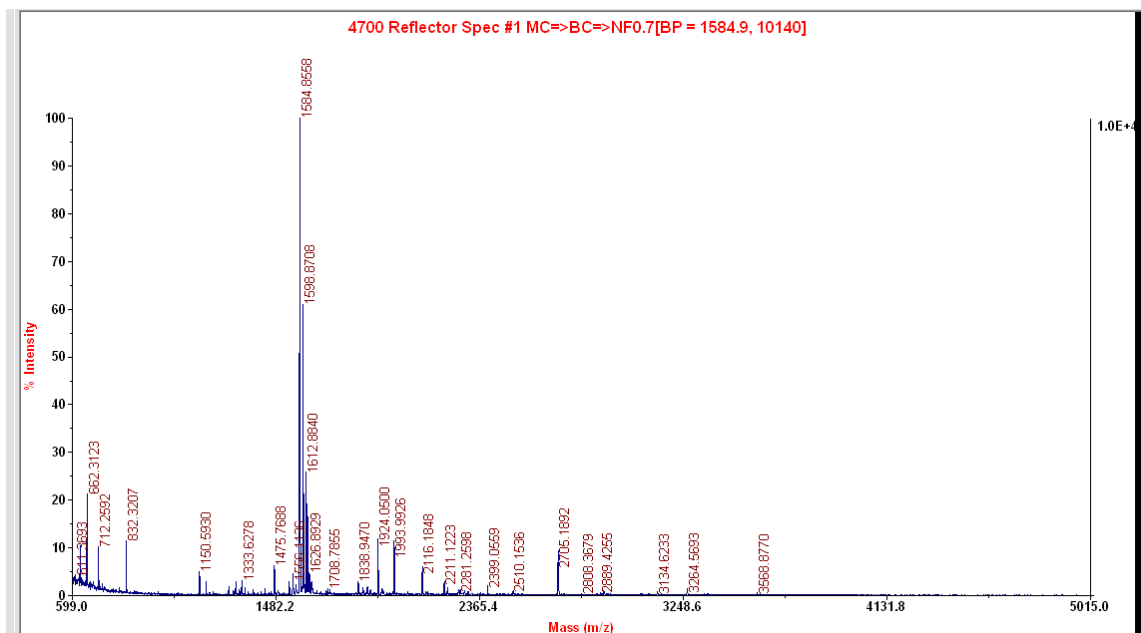
Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 182419398	52133	122	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [Clostridium butyricum 5521]

Anexo 5: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como 3-hidroxi-butiril-coA deshidrogenasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.282104, 662.312317, 712.259155, 1150.593018, 1297.721558, 1323.697266, 1333.627808, 1347.658081, 1435.774780, 1539.807251, 1553.864258, 1566.841675, 1584.855835 ions(70.086967, 72.106506, 112.114212, 129.142563, 155.106079, 158.137436, 171.124664, 175.155899, 199.157120, 229.162308, 272.179413, 274.196136, 289.244537, 298.223236, 302.190735, 326.218719, 371.246552, 373.278046, 383.232239, 388.279663, 399.307526, 401.276917, 425.303253, 427.283234, 470.386078, 472.343262, 487.378296, 498.386200, 500.368927, 502.338440, 508.350220, 526.388367, 569.379517, 571.386047, 573.429688, 597.434814, 601.398804, 614.442017, 631.509033, 632.463135, 634.470703, 672.487976, 696.506836, 698.454895, 701.478149, 708.475586, 726.499817, 746.570618, 753.558960, 754.540283, 771.562073, 779.506653, 788.578918, 797.547791, 817.658325, 842.580933, 859.648804, 951.646057, 988.716492, 1059.771851, 1098.772705, 1158.858276, 1287.925171, 1387.010132, 1484.002197) 1591.859497 1598.870850 ions(70.090805, 112.114197, 129.152618, 158.145111, 175.155548, 199.159882, 215.138992, 272.168732, 289.201385, 298.209595, 302.193024, 326.222565, 371.288269, 373.294983, 388.283997, 401.284180, 425.324280, 427.300415, 441.300598, 443.308105, 472.287537, 487.378967, 496.420837, 500.381622, 514.356384, 526.347900, 540.414978, 587.395203, 597.444763, 611.444946, 615.464417, 634.499329, 641.423889, 668.513306, 701.512756, 712.518433, 740.513794, 771.576965, 788.601501, 811.606201, 842.602539, 859.658691, 1002.723145, 1059.767212, 1073.804199, 1158.810425, 1172.877808, 1301.958374, 1400.992310, 1484.041016, 1498.009399) 1606.833740, 1612.884033, 1619.815186, 1626.892944, 1635.821289, 1641.849609, 1860.099854, 1877.915649, 1890.962646, 1924.050049, 1946.045044, 2116.184814, 2273.129639, 2281.259766, 2314.196533, 2728.250732, 2808.367920, 2889.425537, 2903.452881, 3134.623291, 3264.569336, 3568.876953

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.5 Search Parameters

Type of search : Sequence Query

Enzyme : Trypsin

Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Methyl (DE)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da

Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da

Max Missed Cleavages : 1

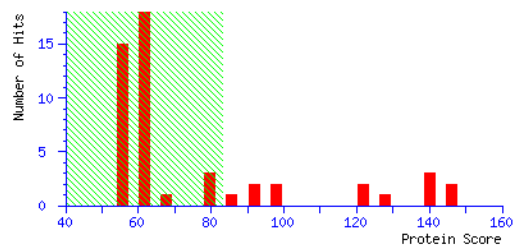
Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

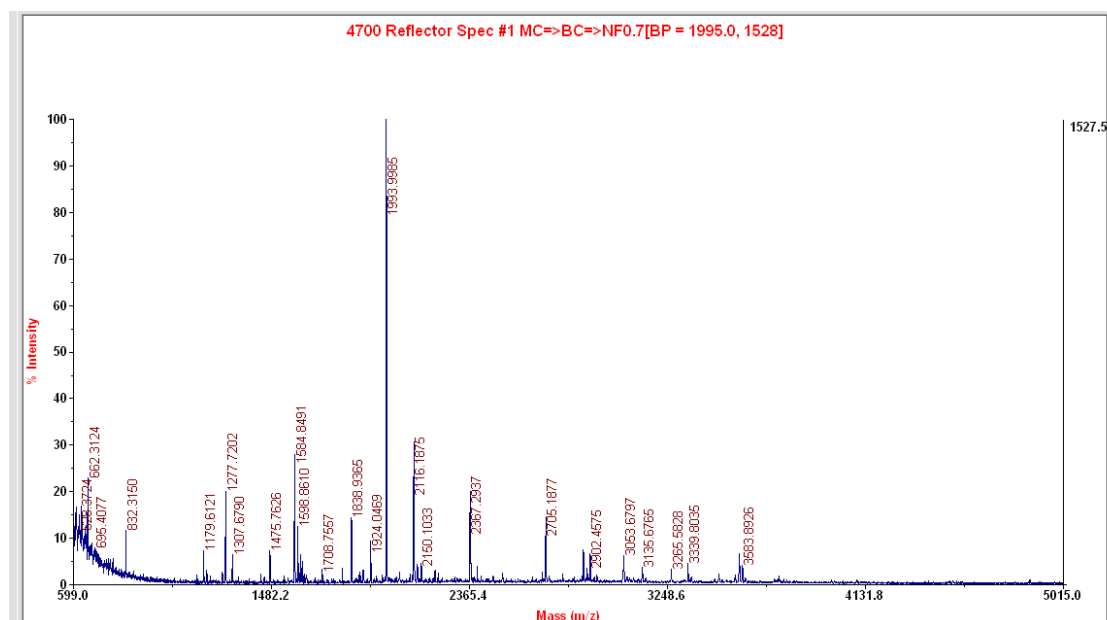
Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 182419365	30437	146	3-hydroxybutyryl-coa dehydrogenase [Clostridium butyricum 5521]
2.	gi 193230762	30523	146	beta-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenase [Clostridium butyricum]
3.	gi 242027234	28615	142	hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Clostridium sp. IBUN 158B]
4.	gi 18311279	30474	137	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Clostridium perfringens str. 13]
5.	gi 11080336	30504	137	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Clostridium perfringens SM101]

Anexo 6: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como 3-hidroxi-butiril-coA deshidrogenasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

662.312378, 1584.849121 ions(112.114418, 129.144180, 175.151611, 272.175018, 302.193726, 326.245300, 371.290314, 388.365814, 401.298157, 427.282623, 526.367371, 597.465149, 634.501526, 726.541382, 771.553772, 788.601257, 797.536865, 842.615906, 859.654175, 1059.765625, 1158.847656, 1387.007324, 1436.067627, 1484.070190), 1598.860962, 1612.877441, 1619.813599, 1797.019653, 1837.986816, 1877.922485, 1890.990234, 1924.046875, 2116.187500 ions(374.331451, 631.492432, 744.582275, 757.567322, 789.591980, 829.656067, 857.658936, 920.557251, 999.808960, 1004.810059, 1005.648193, 1011.664429, 1033.711548, 1034.735107, 1083.837036, 1105.793091, 1106.932861, 1176.898438, 1179.031738, 1260.028931, 1308.098877, 1372.897217, 1376.858643, 1400.023315, 1420.025757, 1422.218994, 1516.103271, 1686.415039, 1714.295166, 1777.394897, 1779.296021, 1780.173462, 1893.407593, 1895.123413, 1926.567017, 2052.200439, 2053.066895, 2053.907959), 2132.189209, 2371.291992, 2888.464600, 2902.457520, 3049.553467, 3134.676514, 3264.582764, 3338.803467, 3567.884033, 3583.892578

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.6 Search Parameters

Type of search : Sequence Query

Enzyme : Trypsin

Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Methyl (DE)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da

Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da

Max Missed Cleavages : 1

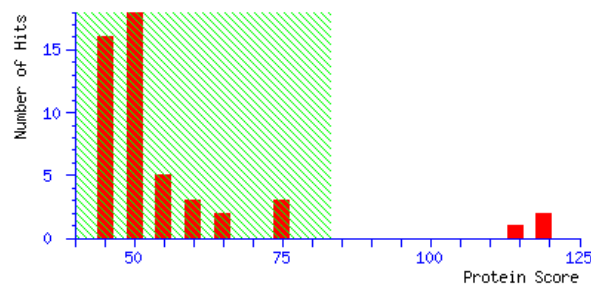
Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

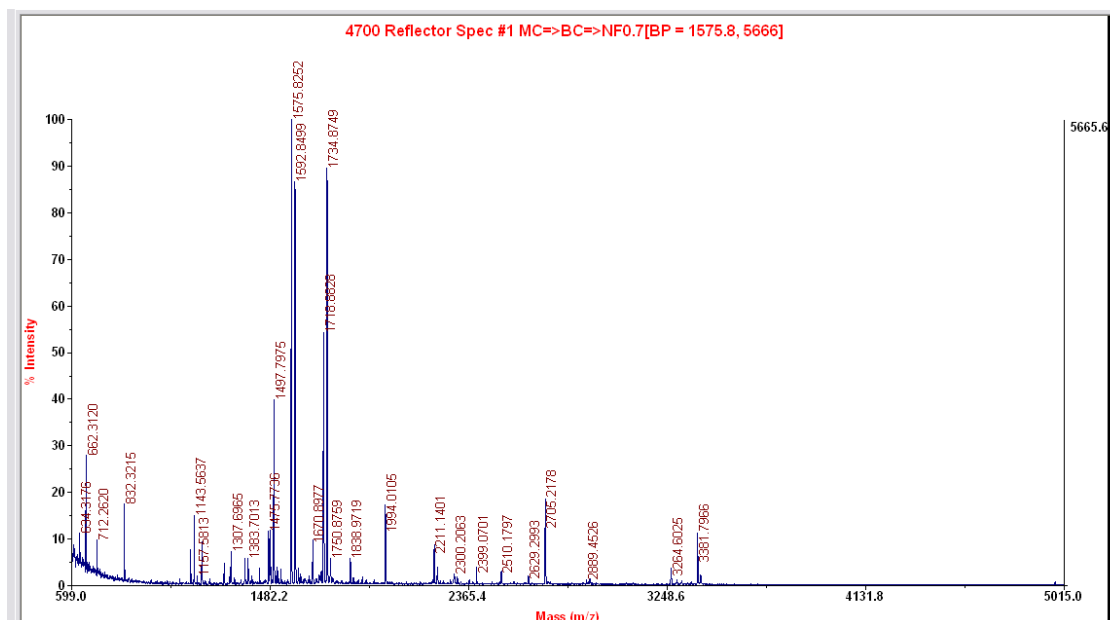
[Help](#)

Significance threshold $p <$
 Max. number of hits

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 182419365	30437	119	3-hydroxybutyryl-coa dehydrogenase [Clostridium butyricum 5521]
2.	gi 193230762	30523	118	beta-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenase [Clostridium butyricum]
3.	gi 242027234	28615	113	hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Clostridium sp. IBUN 158B]

Anexo 7: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Proteína Ribosomal S2



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.317627, 662.312012, 712.261963, 1127.573120, 1143.563721, 1177.661743, 1369.677246, 1386.711060, 1480.777466, 1497.797485, 1513.792603, 1529.789673, 1575.825195 ions(86.130234, 110.107445, 175.158798, 195.134964, 257.181244, 266.185974, 276.228241, 285.190247, 294.244202, 323.211700, 324.225037, 338.246490, 342.214874, 370.190613, 371.223755, 387.275879, 404.323639, 414.307281, 442.311798, 451.235443, 467.329803, 470.324188, 479.289246, 524.345154, 538.333008, 538.439514, 541.401794, 581.395508, 595.424255, 598.445923, 607.468384, 728.468933, 745.545837, 803.608398, 806.501038, 831.604370, 865.601013, 882.636597, 950.687988, 978.697937, 981.708496, 1021.713318, 1035.757324, 1038.765381, 1092.791748, 1109.808960, 1144.850220, 1172.865601, 1238.822876, 1272.924316, 1300.942749, 1351.977173, 1384.001587, 1402.004883, 1403.848511, 1419.035889, 1419.988770) 1592.849854, 1606.864258, 1670.897705, 1708.868286, 1718.882813, 1734.874878 ions(175.139404, 255.189194, 270.201447, 271.241821, 272.222198, 299.213257, 327.253326, 370.200470, 387.272766, 541.467529, 554.414978, 583.460022, 615.370911, 714.483948, 744.486572, 746.590759, 747.416687, 771.547302, 825.484375, 842.540466, 1120.749023, 1137.700562, 1239.874146, 1328.988892, 1330.892944, 1392.972656, 1399.958862, 1463.967041, 1600.087769, 1600.959473, 1628.997192, 1670.868652, 1672.707275) 1748.896484, 1750.875854, 1837.988159, 2207.218018, 2284.223633, 2298.208740, 2303.217773, 2314.230957, 2629.299316, 2889.452637, 2902.482178, 3264.602539, 3312.408936, 3381.796631, 3395.769531

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.7 Search Parameters

Type of search : Sequence Query

Enzyme : Trypsin

Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Gln->pyro-Glu (N-term Q)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da

Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da

Max Missed Cleavages : 1

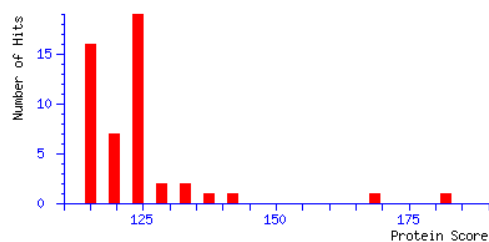
Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

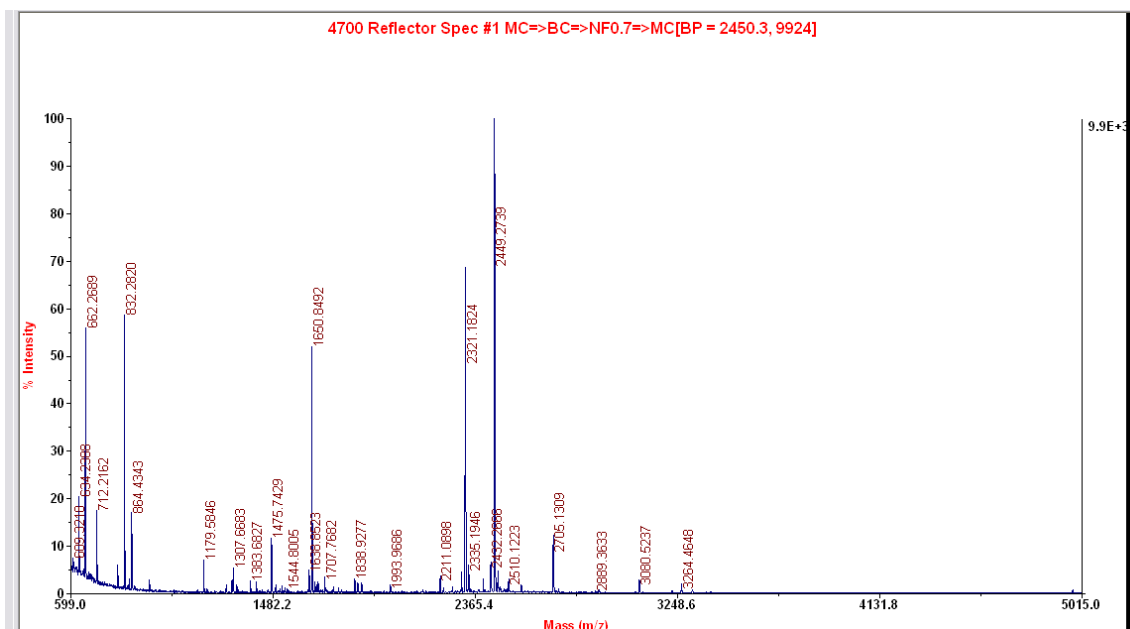
Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 237668205	26294	182	ribosomal protein S2 [Clostridium butyricum E4 str. BoNT E BL5262]
2.	gi 150016072	26299	168	30S ribosomal protein S2 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]
3.	gi 299823055	28621	144	30S ribosomal protein S2 [Listeria grayi DSM 20601]
4.	gi 268607901	27729	139	30S ribosomal protein S2 [Ruminococcus flavefaciens FD-1]
5.	gi 114566417	26766	134	ribosomal protein S2 [Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei str. Goettingen]

Anexo 8: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Proteína Ribosomal L10



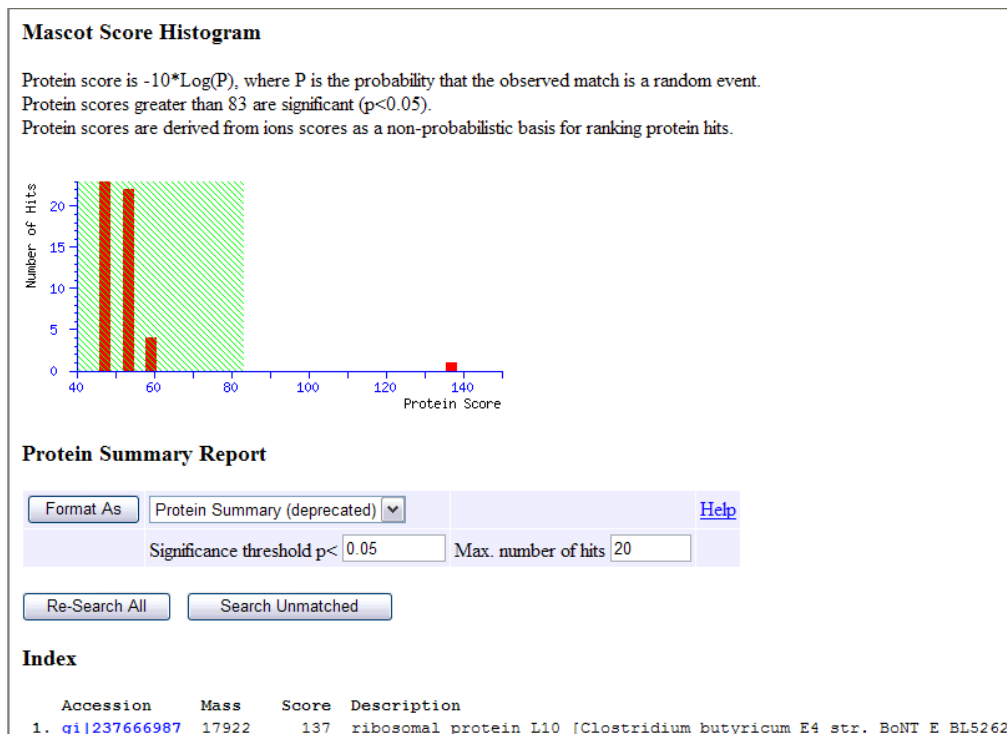
Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.238831, 662.268921, 712.216187, 864.434265, 1151.713989, 1323.662476, 1329.699707, 1409.676636, 1434.751343, 1456.743896, 1510.909058, 1520.786377, 1532.868042, 1544.800537, 1632.874878, 1650.849243, 1664.860596, 1672.828979, 1678.871704, 1744.857178, 1837.953247, 1867.914795, 2264.212402, 2304.169678, 2321.182373, 2335.194580, 2432.266602, 2449.273926 ions(72.099800, 175.145020, 201.147034, 273.159912, 286.211456, 303.252350, 354.237427, 372.155426, 372.259796, 387.320251, 399.326080, 416.339905, 453.314789, 471.335602, 488.369995, 515.438965, 556.339478, 568.363586, 572.393250, 572.525757, 574.376526, 584.389465, 598.484192, 599.447144, 603.454590, 616.509155, 618.402649, 714.511230, 731.550293, 843.515198, 860.620850, 972.602356, 989.681763, 1088.781128, 1171.777588, 1172.760376, 1189.835327, 1302.946899, 1342.955200, 1360.006836, 1362.166626, 1488.079590, 1634.231689, 1651.163208, 1762.231323, 1779.270142, 1849.286987, 1866.307373, 1980.387085, 2078.465576, 2177.536133, 2247.564697, 2264.561035, 2277.630615, 2278.516113, 2303.512939, 2321.476807, 2324.372559, 2463.285889, 2471.248047, 2502.233398, 2565.320068, 2728.219482, 2888.363281, 2904.351074, 3080.523682, 3223.253662, 3264.464844, 3312.268066, 4972.711426

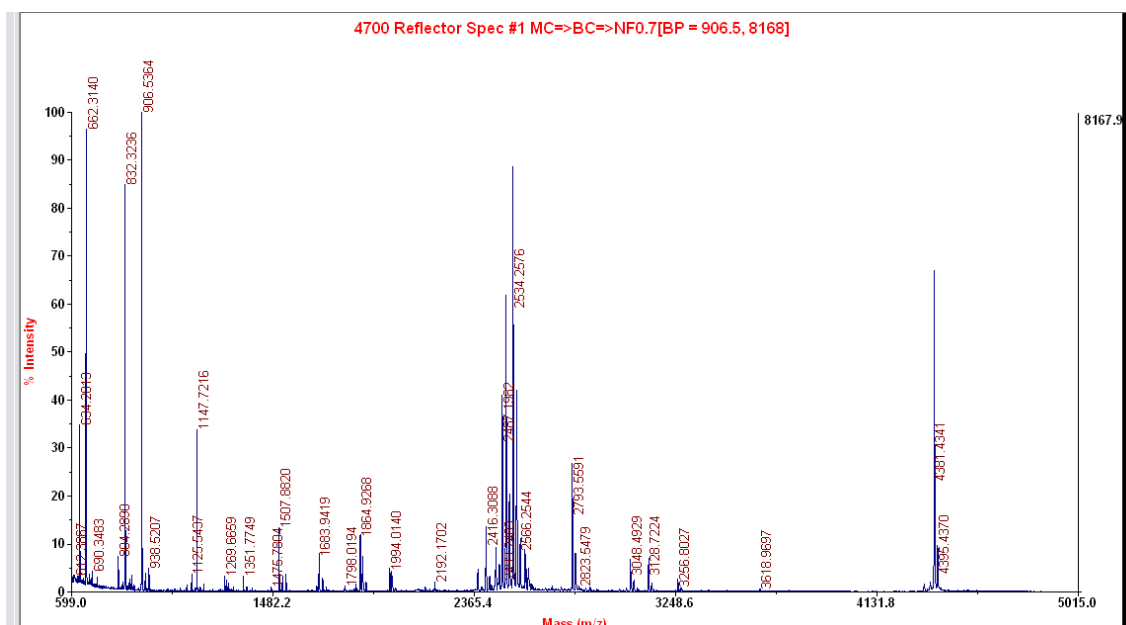
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.8 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF



Anexo 9: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como 1,3-propanodiol deshidrogenasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

634.281250, 662.313965, 690.348328, 854.310913, 862.511108, 922.520752, 938.520691, 1103.727783, 1147.721558, 1163.715210, 1269.665894, 1283.686157, 1286.691650, 1351.774902, 1367.765869, 1391.730225, 1523.870483, 1539.911987, 1674.852539, 1683.941895, 1715.933228, 1797.019653, 1846.918213, 1864.926758, 1875.013306, 1889.029419, 2003.111328, 2019.106445, 2190.668701, 2380.156738, 2416.308838, 2432.293945, 2459.208008, 2473.225342, 2486.324951, 2501.204590, 2517.246338, 2534.257568 ions(112.099976, 129.125656, 175.134933, 272.197205, 284.176086, 286.193542, 304.229858, 361.214935, 392.206207, 398.236938, 410.160400, 443.291351, 460.295166, 491.275269, 497.262085, 517.291565, 523.352966, 545.305176, 555.349426, 559.296631, 559.432068, 573.237610, 646.334229, 646.494080, 658.357849, 676.468079, 686.359619, 691.408875, 745.511719, 785.389038, 785.539368, 786.396667, 788.606506, 804.493530, 814.520508, 832.469238, 832.642822, 862.542175, 864.430908, 929.576538, 946.633484, 947.508057, 947.742859, 1005.575256, 1017.786072, 1074.760742, 1205.860596, 1352.751343, 1352.980347, 1353.868286, 1432.877686, 1449.978149, 1467.026978, 1566.097168, 1733.176880, 1750.173340, 1849.251465, 1962.324585, 2108.381104, 2125.440186, 2223.418457, 2240.482910, 2470.942383) 2548.267822, 2564.270020, 2587.290039, 2592.289063, 2601.305664, 2608.290283, 2617.313721, 2793.559082, 2823.547852, 2873.440186, 3048.492920, 3064.496094, 3081.517090, 3128.722412, 3142.724609, 3256.802734, 3271.843750, 3617.969727, 4338.464355, 4364.541016, 4381.434082, 4395.437012

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.9 Search Parameters

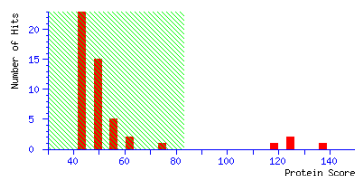
Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications: Carbamidomethyl (C),
Oxidation (M),
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

(MATRIX) *(SCIENCE)* Mascot Search Results

User : rd
 Email : duran@pasteur.edu.uy
 Search title :
 Database : NCBI nr 20101210 (12478334 sequences: 4262199788 residues)
 Timestamp : 13 Dec 2010 at 17:53:30 GMT
 Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
 Top Score : 137 for [gi|1158427702](#), 1,3-propanediol dehydrogenase [Clostridium sp. IBUN 13A]

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 * \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

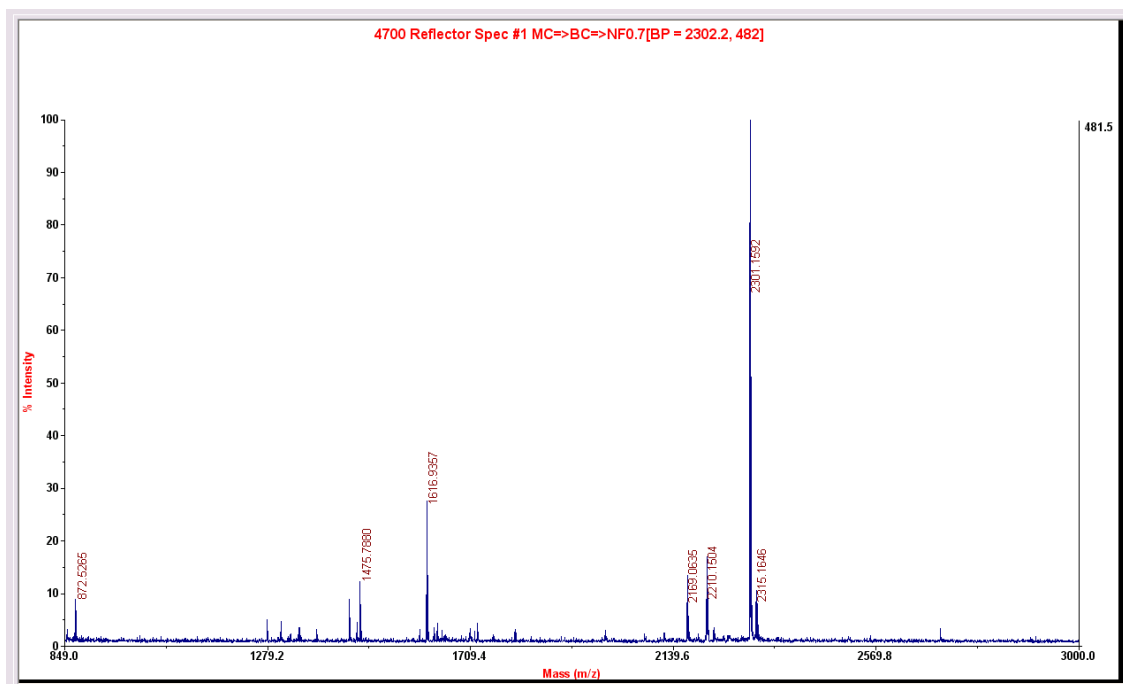
Significance threshold $p <$ 0.05 Max. number of hits AUTO

Re-Search All Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 1158427702	41521	137	1,3-propanediol dehydrogenase [Clostridium sp. IBUN 13A]
2. gi 127461237	41531	127	1,3-propanediol dehydrogenase [Clostridium butyricum]
3. gi 1161340051	41505	127	1,3-propanediol dehydrogenase [Clostridium butyricum]

Anexo 10: Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como Triosafato isomerasa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

872.526489, 1452.739380, 1616.935669, 2169.063477, 2301.159180 ions(110.082512, 175.119186, 303.128906, 365.126160, 432.103180, 470.155731, 498.127197, 545.170044, 612.092468, 612.218689, 646.239624, 697.258789, 698.274841, 725.069397, 725.270203, 808.255798, 809.307739, 826.298279, 832.274841, 992.291748, 1037.329712, 1152.297607, 1265.407593, 1458.406616, 1475.475098, 1478.485962, 1560.483398, 1576.524048, 1689.572876, 1786.660522, 1803.571167, 1924.645996, 1941.679199, 1998.666870, 2127.671143, 2145.620605), 2315.164551

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

7.1.10 Search Parameters

Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications: Oxidation (M),
Carbamidomethyl (C)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Mascot Search Results

User : ubypa
 Email : servicioubypa@gmail.com
 Search title :
 Database : NCBI nr 20110101 (12597337 sequences; 4300284291 residues)
 Timestamp : 4 Jan 2011 at 16:54:15 GMT
 Warning : **A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.**
 Top Score : 108 for [gi|183585360](#), triosephosphate isomerase [*Clostridium perfringens*]

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 84 are significant ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p <$ 0.05 Max. number of hits 20

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 183585360	16554	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
2.	gi 183585372	16466	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
3.	gi 183585364	16497	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
4.	gi 183585366	16429	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
5.	gi 183585368	16471	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
6.	gi 183585374	16485	108	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium perfringens</i>]
7.	gi 52082963	16330	107	triosephosphate isomerase [<i>Clostridium butyricum</i>]

Bibliografía

Alén, C., Sonenshein, A., 1999. *Bacillus subtilis* aconitases an RNA-binding protein. *Microbiology*. 96, 10412-10417.

Al- Khaldi, S., Mossoba, M., 2004. Gene and bacterial identification using high-throughput technologies: genomics, proteomics, and phonemics. *Nutrition*. 20 (1), 32-38.

Amaya, J., Pardo, J., 2009. Evaluación de la actividad deshidratasa de un extracto crudo enzimático a partir de cepas de *Clostridium* spp. en medio con glicerol. Tesis para optar al título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 102 pp.

Anderson, N., Matheson, A., Steiner, S., 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 408-412.

Aragón, O. 2007. Estudio de la viabilidad técnica de la producción de 1,3-Propanodiol (1,3-PD) a partir de glicerol con nuevas cepas colombianas de *Clostridium* sp. a nivel de laboratorio. Tesis para optar al título de Master Scientae en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 72 pp.

Arévalo, C., Arrieta, A., Aguilera, G., Aristizabal, F., Montoya, D., 2002. Caracterización de cepas nativas colombianas de clostridios solvengénicos por perfiles plasmídicos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 31, 51-59.

Baumgart, M., Bott, M., 2010. Biochemical characterization of aconitase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. *In press*.

Biebl, H., Marten, S., Hippe, H., Deckwer, W., 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology Biotechnology*. 36, 592-597.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A., Deckwer, W., 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology Biotechnology*. 52, 289-297.

Bunai, K., Yumane, R., 2005. Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography B*. 815, 227-236.

Canacki, M., Sanli, H., 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35, 431-441.

Cañas, B., Piñeiro, C., Calvo, E., López, D, Gallardo, O., 2007. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*. 1153, 235-258.

Cárdenas, D., Pulido, C., Aragón, O., Aristizabal, F., Suárez, Z., Montoya, D., 2006. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiesel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 35 (1),120-137.

Cordwell, S., 2006. Technologies for bacterial surface proteomics. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 320-329.

Curien, G., Biou, V., Mas-Droux, C., Robert, M., Ferrer, J., Dumas, R., 2008. Amino acid biosynthesis: new architectures in allosteric enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 325-339.

Champomier, M., Maguin, E., Mistou, M., Anglade, P., Chinch, J., 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography*. 771, 329-342.

Chávez, R., Arias, L., Alamaras, M., Hernandez, R., Guillen, N., Vargas, M., 2003. L10 ribosomal protein from *Entamoeba histolytica* share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 127, 151-160.

Chen, Z., Hongjuan, L., Dehua, L., 2011. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH- dependent alcohol dehydrogenase. *Biochemical Engineering Journal*. *In press*.

Chiou, S., Wu, S., 1999. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analytica Chimica Acta*. 383, 47-60.

Cho, W., 2007. Proteomics technologies and challenges. *Genomic Proteomics and Bioinformatics*. 5 (2), 77-85.

Da Silva, P., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 27, 30-39.

Denger, K., 1996. Anaerobic desulfonation of 4-tolylsulfonate and 2-(4-sulfophenyl) butyrate by a *Clostridium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1526- 1530.

Dhalluin, A., Lemée, L., Pestel, M., Mory, F., Leluan, G., Lemeland, F., Pons, J., 2003. Genotypic Differentiation of Twelve *Clostridium* Species by Polymorphism Analysis of the Triosephosphate Isomerase (*tpi*) gene. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 90-96.

Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fu, Z., 2005. New frontiers in proteomics research: a perspective. *International Journal of Pharmaceutics*. 299, 1-18.

Dunbar, B., 1987. Two Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques. Plenum Press. New York, 370 pp.

Everley, R., Mott, T., Toney, D., Croley, T., 2009. Characterization of *Clostridium* species utilizing liquid chromatography / mass spectrometry of intact proteins. Journal of Microbiological Methods. 77, 152-158.

Faehle, C., Ohren, J., Viola, R., 2005. A new branch in the family: structure of aspartato- β - semialdehyde dehydrogenase from *Methanococcus jannaschii*. Journal of Molecular Biology. 353, 1055-1068.

Faehle, C., Le, E., Coq, J., Liux, C., Viola, R., 2006. Examination of key intermediates in the catalytic cycle of aspartate- β - semialdehyde dehydrogenase from a Gram- positive infectious bacteria. The Journal of Biological Chemistry. 28 (41), 31031-31040.

Flengsrud, R., Skejeldal, L., 1998. Two dimensional gel electrophoresis separation and N-terminal sequence analysis of proteins from *Clostridium pasteurianum* W5. *Electrophoresis*. 19, 802-806.

Fonseca, P., Ferreira, T., Cardozo, G., Zarur, M., 2009. Glycerol valorization: New biotechnological routes. Food and Bioproducts Processing. 30, 1-8.

Gheshlaghi, R., Scharer, J., Moo-Young, M., Chou, C., 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology Advances. 27, 764-781.

González, M., Andrade, J., Vasconcelos, I., 2004. Production of 1,3- propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 31, 442-446.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2, 1037-1053.

Grandi, G., 2001. Antibacterial vaccine designs using genomics and proteomics. Trends in Biotechnology. 19 (5), 181-188.

Gudkov, A., Tumanova, L., Gongadze, G., Bushuev, V., 1980. Role of different regions of ribosomal proteins L7 and L10 in their complex formation and in the interaction with the ribosomal 50S subunit. FEBS LETTERS. 109 (1), 1-10.

Gupta, P., Lee, K., 2007. Genomics and proteomics in process development: opportunities and challenges. Trends in Biotechnology. 25 (7), 324-330.

Gygi, S., Aebersold, R., 2000. Using mass spectrometry for quantitative proteomics. Proteomics: A Trends Guide, 1471-1931.

Hartmanis, M., Gatenbeck, S., 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. Applied and Environmental Microbiology. 47 (6), 1277-1283.

Hebestreit, H., 2001. Proteomics: an holistic analysis of nature's proteins. Current Opinion in Pharmacology. 1, 513-520.

Hongwen, C., Baishan, F., Zongding, F., 2005. Optimization of process parameters for key enzymes accumulation of 1,3-propanediol production from *Klebsiella pneumoniae*. Biochemical Engineering Journal. 25, 47-53.

Jaimes, C., Aristizabal, F., Bernal, M., Suárez, Z., Montoya, D., 2006. AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium* spp. strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. Journal of Microbiological Methods. 67, 64-69.

Johnson, E., Lin, E., 1987. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-Propanediol NAD⁺ Oxidoreductase. Journal of Bacteriology. 169 (5), 2050-2054.

Jordan, P., Tang, Y., Bradbury, A., Thomson, A., Guest, J., 1999. Biochemical and spectroscopic characterization of *Escherichia coli* aconitases (AcnA and AcnB). *Biochemical Society*. 344, 739-746.

Jin, L., Li, X., Cong, W., Hwang, C., Choi, J., 2008. Previsible silver staining of protein in electrophoresis gels with mass spectrometry compatibility. *Analytical Biochemistry*. 383, 137-143.

Karlsson, S., 2003. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infective Immunology*. 71, 1784- 1786.

Kashino, Y., Harayama, T., Pakrasi, H., Satoh, K., 2006. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 849, 282-292.

Kim, Y., Yoshizawa, M., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K., 2002. Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93 (6), 584-588.

Koga, K., 2008. G-electrode- loading method for isoelectric focusing, enabling separation of low-abundance and high-molecular-mass proteins. *Analytical Biochemistry*. 382, 23-28.

Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich A., Liebl, W., Gottschalk, G., Dürre, P., 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 29 (107), 13087-13092.

Krishnan, I., Ramji, D., 1985. *Clostridium pasteurianum* glutamine synthetase mechanism: evidence for active site tyrosine residues. *Federation of European Biochemical Societies*. 185 (2), 267-271.

Laalami, S., Grentzmann, G., Bremaud, L., Cenatiempo, Y., 1996. Messenger RNA translation in prokaryotes: GTPase centers associated with translational factors. *Biochimie*. 78, 577-589.

Lee, K., 2001. Proteomics: a technology-driven and technology- limited discovery science. *Trends in Biotechnology*. 19 (6), 217-223.

Lefkovits, I., 2003. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. *Journal of Chromatography B*. 787, 1-10.

López, D., Cañas, B., Vázquez, J., Lodeiro, C., Rial, R., Morua, I., Capelo, J., 2006. Sample treatment for protein identification by mass spectrometry- based techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 25 (10), 996-1005.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D., 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, Twelfth edition. Pearson Education, San Francisco, 1050 pp.

Mao, S., Luo, Y., Zhang, T., Li, J., Bao, G., Zhu, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Li, Y., Ma, Y., 2009. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. *Journal of Proteome Research*. 4 (6), 3046-3061.

McClane, B., Rood, J., 2001. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. In Bahl, H., Dürre, P. (Eds.), *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 169 pp.

McLean, J., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S., Stanton, M., Hedstrom, L., 2004. Inosine 5- monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochimie*. 379, 243-251.

Mizushina, Y., Dairaku, I., Yanaka, N., Takeuchi, T., Ishimaru, C., Sugawara, F., Yoshida, H., Kato, N., 2007. Inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on IMP dehydrogenase. *Biochimie*. 89, 581-590.

Montoya, D., 2008. Producción de solventes de alto valor agregado por cepas nativas de *Clostridium* spp. Revista Colombiana de Biotecnología. 10 (1), 139-142.

Montoya, D., Arévalo, C., González, S., Aristizabal, F., Schwarz, WH., 2001. New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27, 329-335.

Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., Schwarz, W., 2000. Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. Journal of Biotechnology. 79, 117-126.

Montoya, J.D., 2009. Determinación de la secuencia de genes putativamente involucrados en la producción de 1,3-propanodiol en la cepa nativa colombiana *Clostridium* sp. IBUN 158B. Tesis para optar al título de Magíster en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 95 pp.

Moore, R., Bocik, W., Viola, R., 2002. Expression and purification of Asparatate β -semialdehyde dehydrogenase from infections microorganisms. Protein Expression and Purification. 25, 189-194.

Muetzelburg, M., Hofmann, F., Pinch, J., 2009. Identification of biomarkers indicating cellular changes after treatment of neuronal cells with the C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* using the iTRAQ protocol and LC-MS/MS analysis. Journal of Chromatography B. 877, 1344-1351.

Mukherjee, K., 2002. Proteins released during high toxin production in *Clostridium difficile*. Microbiology UK. 148, 2245- 2247.

Nakamura, C., Whited, G., 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. Current Opinion in Biotechnology. 14, 454-459.

Narberhaus, F., Pich, A., Bahl, H., 1994. Synthesis of heat shock proteins in *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (*Clostridium thermosulfurogenes* EM1). *Current Microbiology*. 29, 13-17.

Natarajan, S., Xu, C., Cregan, P., Caperna, T., Garrett, W., Luthria, D., 2009. Utility of proteomics techniques for assessing protein expression. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 54, 532-536.

Nichols, C., Dhaliwai, B., Lockyer, M., Hawkins, A., Stammers, D., 2004. High-resolution structures reveal details of domain closure and half of sites reactivity in *Escherichia coli* aspartate β -semialdehyde dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*. 341, 97-806.

Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M., Makarova, K., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., GTC Sequencing Center Production., Finishing and Bioinformatics Teams., Wolf, Y., Tatusov, R., Sabathe, F., Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M., Bennett, G., Koonin, E., Smith, D., Genome Sequence and Comparative., 2001. Analysis of the Solvent- Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*. 138 (16), 4823-4838.

Ogorzalek, L., Hayes, R., Yung, Y., Hung, F., Ramachandran, P., Kim, N., Gunsalus, R., Loo, J., 2005. Top-down, bottom-up, and side-to-side proteomics with virtual 2-D gels. *International Journal of Mass Spectrometry*. 240, 317-325.

Osman, K, Ali, M., Radwan, M., Kyu, H., Han, J., 2009. Comparative proteomic analysis of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella enteritides* exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. *Journal of Proteomics*. 72, 815-821.

Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou, M., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., 2008. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*. 32, 60-71.

Pérez, X., 2009. Estandarización de la concentración de glicerol industrial y de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo para la producción de 1,3-propanodiol utilizando una cepa nativa de *Clostridium* sp. Tesis para optar al título de Master Scientae en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 70 pp.

Pich, A., Narberhaus, F., Bahl, H., 1990. Induction of heat shock proteins during initiation of solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33, 697-699.

Ping, A., Biebl, H., 2002. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3- propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 74, 240-257.

Powers, T., Stern, S., Changchein, L., 1988. Probing the assembly of the 3' major domain of 16S rRNA. Interactions involving ribosomal proteins S2, S3, S10, S13 and S14. *Journal of Molecular Biology*. 201, 697-716.

Quilaguy, D., Suárez, Z., Aristizabal, F., Bernal, M., Montoya, D., 2006. Genome analysis of thirteen Colombian strains by pulsed field gel electrophoresis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9 (5), 542-550.

Reimann, A., Abbad, S., Biebl, H., Petitdemange, H., 1998. 1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. *Journal for Applied Microbiology*. 84, 1125-1130.

Rentier, F., Mande, S., Moyens, S., Terpstra, P., Mainfroid, V., Goraj, K., Mion, M., Hol, W., Martial, J., 1993. Cloning and overexpression of the triosephosphate isomerase genes from psychrophilic and thermophilic bacteria: structural comparison of the predicted protein sequences. *Journal of Molecular Biology*. 229, 85-93.

Resing, K., Ahn, N., 2005. Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Letters*. 579, 885-889.

Resto, M., Yaffe, J., Gerratana, B., 2009. An ancestral glutamine-dependent NAD⁺ synthetase revealed by por kinetic synergism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1794, 1648-1653.

Rozovosky, S., McDermott, A., 2001. The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*. 310, 259-270.

Sawires, Y., Songer, J., 2006. *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe*. 12, 23-43.

Saxena, R., Anand, P., Saran, S., Isar, J., 2009. Microbial production of 1,3- propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*. 27, 895-913.

Schwarz, K., Fiedler, T., Fischer, R., Bahl, H., 2007. A Standard Operating Procedure (SOP) for the preparation of intra and extracellular proteins of *Clostridium acetobutylicum* for proteome analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 68, 396-402.

Sebahia, M., Peck, M., Minton, N., Thomson, N., Holden, M., Mitchell, W., Carter, A., Bentley, S., Mason, D., Crossman, L., Paul, C., Ivens, A., Wells, M., Davis, I., Cerdeño, A., Churcher, C., Quail, M., Chillingworth, T., Feltwell, T., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Jagels, K., Larke, N., Maddison, M., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, L., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., White, B., Whithead, S., Parkhill, J., 2007. Genome sequence of a proteolytic (group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genomic Research*. 17, 1082-19092.

Serio, A., Pechter, K., Sonenshein, A., 2006. *Bacillus subtilis* aconitasa is required for efficient late- sporulation gene expression. *Journal of Bacteriology*. 188 (7), 6396-6405.

Shaffer, S., 2002. Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis*. 23,110-115.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H., 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (2), 996-1001.

Shing, Y., Akagi, J., Himes, R., 1975. Psychrophilic, Mesophilic and Thermophilic Triosephosphate Isomerases from Three Clostridial Species. *Journal of Bacteriology*. 122 (1), 177-184.

Sullivan, L., Bennett, G., 2005. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33, 298-308.

Terracciano, J., Rapaport, E., Kashket, E., 1988. Stress and growth phase-associated proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 1989-1991.

Tsuchiya, D., Shimizu, N., Tomita, M., 2008. Cooperativity of two active sites in bacterial homodimeric acotinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 379, 485-488.

Usdin, P., Zappe, H., Jones, D., Woods, D., 1986. Cloning, expression, and purification of Glutamine Synthetase from *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52 (3), 413-419.

Vega, M., Foster, M., 1992. 1,3-Propanediol: NAD⁺ Oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (6), 2005-2010.

Vishwanath, P., Favaretto, P., Hartman, H., Mohr, S., Smith, T., 2004. Ribosomal protein-sequence block structure suggests complex prokaryotic evolution with implications for the origin of eukaryotes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33, 615-625.

Wang, Z., Xu, X., Fan, K., Jia, C., Yang, K., 2007. Sample preparation for two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the identification of *Streptomyces coelicolor* cytoplasmic protein complexes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70, 565-572.

White, D., 1995. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. New York, Oxford University Press. 378 pp.

Yamakawa, K., 1996. Enhancement of *Clostridium difficile* toxin production in biotin-limited conditions. *Journal of Medical Microbiology*. 44, 111-113.

Youngleson, J., Jones, D., Woods, D., 1989. Homology between hydroxybutyryl and hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase enzymes from *Clostridium acetobutylicum* fermentation and vertebrate fatty acid β -oxidation pathways. *Journal of Bacteriology*. 171 (12), 6800-6807.

Zhang, X., He, K., Duan, Z., Zhou, J., Yu, Z., Ni, L., Lu, C., 2009. Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microbial Pathogenesis*. 47, 267-273.

Zheng, P., Sun, J., Heuvel, J., Zeng, A., 2006. Discovery and investigation of a new, second triose phosphate isomerase in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biotechnology*. 125, 462-473.