

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**Caracterización estructural de enzimas proteolíticas extracelulares
de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal
de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), a través de una plataforma de
aproximación proteómica funcional.**

Autor:

Bachiller Dávila Delgado Diana Karen

Para optar el título profesional de

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

Coautor:

Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

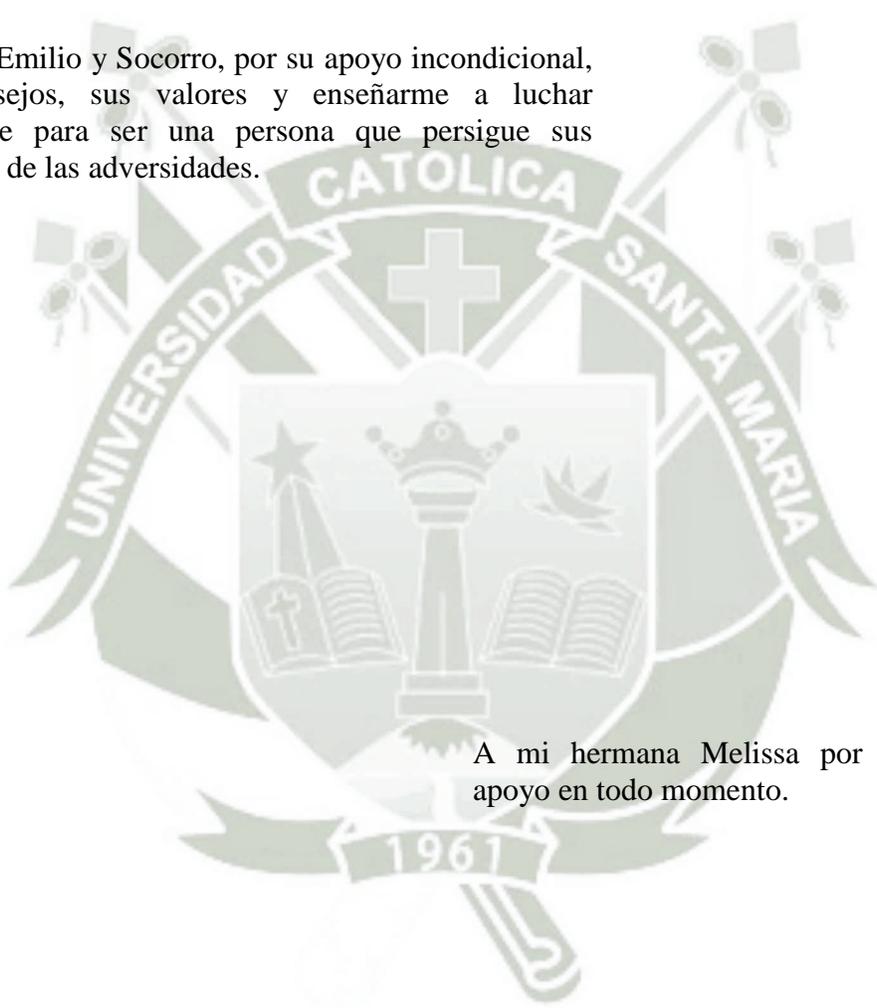
Dr. Gonzalo Dávila del Carpio

AREQUIPA - PERÚ

2015

DEDICATORIA

A mis padres Emilio y Socorro, por su apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores y enseñarme a luchar constantemente para ser una persona que persigue sus sueños a pesar de las adversidades.



A mi hermana Melissa por brindarme su apoyo en todo momento.



Todas las batallas de la vida sirven para enseñaros algo,
inclusive aquellas que perdemos.

Paulo Coelho.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María y a la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica por haberme dado la oportunidad de formarme como profesional.

Al Instituto de Biología de la Universidad de Campinas, en Sao Paulo, Brasil, por brindarme su apoyo en la realización de algunos experimentos.

A la empresa Camposol S.A. y al centro de Biotecnología BIOTEC CMC, por permitirme a lo largo de un año, la realización del presente trabajo de tesis, a través de los Proyectos:

Proyecto 2012-00060: “Bioprospección de genes, lipasas y proteasas de la microbiota (bacteriana) de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) de interés en la industria de la harina y aceite de pescado”

Convenio N° 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012: “Aplicación de la Espectrometría Doble Masa MALDI-TOF/TOF para el análisis de aceites de Anchoveta y procesos Biotecnológicos de valorización”

Al Dr. Gonzalo del Carpio, por apoyarme como asesor del presente trabajo de investigación.

Al Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D., docente credenciado del Departamento de Bioquímica del Instituto de Biología de la Universidad del Estado de Campinas. Sao Paulo – Brasil, por el apoyo incondicional como co-asesor del presente trabajo de investigación. Por su amistad, paciencia y saber que en él puedo contar como amigo y colega en todo momento.

A todos mis profesores, docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, por haber contribuido con mi formación profesional a lo largo de mi vida académica, por su inspiración, amistad y confianza.

Un especial agradecimiento a la Mblga. Nélide Velezmoro Casanova y a la Ing. Cynthia Rodríguez Vásquez, por brindarme su amistad incondicional durante mi estancia en la ciudad de Trujillo y su apoyo en todo momento a lo largo del desarrollo de este proyecto, fueron un eje fundamental para lograr mis objetivos y metas.

Y por sobre todo, a Dios y a mi familia, por creer en mí y tenerlos a mi lado siempre y por su comprensión en esta larga espera.



ÍNDICE

	Pág.
Introducción.	1
Objetivos.	3
1. Objetivo General.	3
2. Objetivo Específico.	3
Hipótesis.	3
Capítulo I: Marco teórico.	4
1.1. <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana).	4
1.1.1. Taxonomía	4
1.1.2. Características de la especie	5
1.1.3. Distribución y abundancia de <i>Engraulis ringens</i>	5
1.1.4. Edad y crecimiento	6
1.1.5. Reproducción	6
1.1.6. Alimentación	7
1.1.7. Importancia Alimentaria	7
1.1.8. Usos Potenciales	8
1.2. Enzimas bacterianas extracelulares.	8
1.2.1. <i>Pseudomonas</i>	8
1.2.1.1. Características	9
1.2.1.2. Hábitat	9
1.2.2. Enzimología	9
1.2.2.1. Propiedades de las enzimas	10
1.2.2.2. Clasificación de las enzimas	10
1.2.2.3. Proteasas	11
1.3. Estudio Bioinformático en la Aproximación Proteómica.	11
1.4. Plataforma Proteómica en la era Post Genómica.	12
1.4.1. Fraccionamiento de proteínas	13
1.4.1.1. Electroforesis Bidimensional.	13
1.4.1.2. Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa	14

1.5.	Espectrometría de Masas.	15
1.5.1.	Elaboración previa de la muestra	16
1.5.2.	Bombardeo Láser (ionización)	16
1.5.2.1.	MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)	17
1.5.3.	Determinación de Masas	17
1.5.3.1.	Analizadores de Cuadrupolo	17
1.5.3.2.	Analizadores de Tiempo de Vuelo (ToF)	18
1.6.	Aproximación al Proteoma Funcional en la era Post Genómica.	19
1.6.1.	Estudio de homología secuencial vía espectrometría de masas MS/MS	19
1.6.2.	Secuencia de <i>novο</i> y estudio Bioinformático	20
1.6.3.	Análisis estructural de Proteínas	21
1.6.4.	Importancia del grupo R de los aminoácidos	22
1.6.5.	Plegamiento de Proteínas	22
Capítulo II:	Materiales y métodos	23
2.1.	Ubicación	23
2.2.	Materiales	23
2.2.1.	Materiales Biológicos	23
2.2.2.	Materiales de Laboratorio	23
2.2.3.	Equipos, Aparatos e Instrumentos	24
2.2.4.	Reactivos	25
2.2.5.	Materiales Varios	26
2.2.6.	Software y Herramientas Bioinformáticas	27
2.3.	Métodos	27
2.3.1.	Muestreo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana)	27
2.3.2.	Obtención del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana)	28
2.3.3.	Aislamiento y caracterización parcial de cultivos bacterianos presentes en la microbiota gastrointestinal de <i>Engraulis Ringens</i> (Anchoveta peruana)	28

2.3.4.	Detección y selección de microorganismos con mayor actividad proteolítica en medio sólido	29
2.3.5.	Identificación molecular del género <i>Pseudomonas sp.</i>	29
2.3.6.	Producción de enzimas extracelulares	32
2.3.7.	Purificación de enzimas extracelulares por Cromatografía en HPLC de fase reversa	32
2.3.8.	Electroforesis en SDS-PAGE	33
2.3.9.	Determinación de actividad proteolítica con sustrato cromogénico BApNA	33
2.3.10.	Caracterización de péptidos por Espectrometría de Masas en Tandem	35
2.3.11.	Secuenciamiento “ <i>de novo</i> ” de péptidos trípticos	35
2.3.12.	Estudio de homología secuencial	36
2.4.	Flujograma de Procesos	37
Capítulo III:	Resultados y Discusión	38
Capítulo IV:	Conclusiones – Sugerencias	59
Capítulo V:	Referencias Bibliográficas	62
Capítulo VI:	Anexos	68
Anexo 1:	Muestreo de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	68
Anexo 2:	Composición de medios de cultivo para aislamiento de bacterias	69
Anexo 3:	Caracterización parcial de cultivos bacterianos de la microbiota gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	70
Anexo 4:	Halos proteolíticos de las cepas seleccionadas según tinciones	71
Anexo 5:	Secuenciamiento macrogen de las cepas con mayor actividad proteolítica	73
Anexo 6:	Tutorial de acceso BLAST	75
Anexo 7:	Tutorial DNA Star	80
Anexo 8:	Presupuestos de los proyectos	99
Anexo 9:	Certificado Camposol S.A - Biotec C.M.C	101
Anexo 10:	Certificado Copeinca S.A.C – Biotec C.M.C y programa de ciencia y Tecnología Perú	102

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N°1	Clasificación del género <i>Engraulis ringens</i> 4
Tabla N°2	Clasificación del género <i>Pseudomonas</i> 9
Tabla N°3	Clasificación de las enzimas 11
Tabla N°4	Tamaños de halo de actividad proteolítica 29
Tabla N°5	Cepas puras aisladas de la microbiota de <i>Engraulis ringens</i> 39 (Anchoveta peruana)
Tabla N°6	Tinción Gram de cepas puras aisladas de la microbiota de <i>Engraulis ringens</i> 40 (Anchoveta peruana).
Tabla N°7	Evaluación de halos proteolíticos después de 96 horas. 41
Tabla N°8	Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del esófago de <i>Engraulis ringens</i> 49
Tabla N°9	Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del estómago de <i>Engraulis ringens</i> 49
Tabla N°10	Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del ciego pilórico de <i>Engraulis ringens</i> 49
Tabla N°11	Secuenciamiento de péptidos y masa molecular 50
Tabla N°12	Composición del medio TSA (Agar Tripticasa Soya) 69
Tabla N°13	Composición del medio AM (Agar Marino) 69
Tabla N°14	Selección de cepas mediante tinciones Wirtz y Maneval. 70
Tabla N°15	Medición de halos a distintas horas. 72
Tabla N°16	Presupuesto del Proyecto 2012-00060 99
Tabla N°17	Presupuesto del Convenio N° 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012 100

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N°1 <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	5
Figura N°2 Distribución de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	6
Figura N°3 Esquema de la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por papaína	34
Figura N°4 Tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana)	38
Figura N°5 Microbiota gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana)	39
Figura N°6 Cepa pura aislada del ciego pilórico del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	40
Figura N°7 Halos proteolíticos de las cepas seleccionadas según tinciones.	41
Figura N°8 Producción de proteasas extracelulares en Medio Suplementado	44
Figura N°9 Cromatografía del contenido gástrico a nivel del <i>esófago</i> de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.	45
Figura N°10 Cromatografía del contenido gástrico a nivel del <i>estómago</i> de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.	46
Figura N°11 Cromatografía del contenido gástrico a nivel del <i>ciego pilórico</i> de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.	47
Figura N°12 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %) procedente de <i>Pseudomonas sp</i> , de las tres regiones en estudio: Esófago, estómago y ciego pilórico del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana). (1) Marcadores de masa molecular (kDa), (2) Muestra procedente de esófago, (3) De estómago y (4) de ciego pilórico.	48
Figura N°13 Masa molecular del pico 5 procedente del área del esófago de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa.	51
Figura N°14 Masa molecular del pico 5 procedente del área del estómago de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa.	52
Figura N° 15 Masa molecular del pico 5 procedente del área del ciego pilórico de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa.	53

Figura N° 16	Alineamiento del péptido 242975, aislado del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	54
Figura N° 17	Alineamiento del péptido 38408, aislado del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	54
Figura N° 18	Alineamiento del péptido 33374, aislado del tracto gastrointestinal de <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana).	55
Figura N° 19	Desembarque de la carga <i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta Peruana)	68
Figura N° 20	<i>Engraulis ringens</i> (Anchoveta peruana) listas para ser transportadas	68
Figura N° 21	Secueciamiento Macrogen de la cepa Esófago TSA 10 ⁴ (II) 1	73
Figura N° 22	Secueciamiento Macrogen de la cepa Estómago TSA 10 ² (I) 4	74

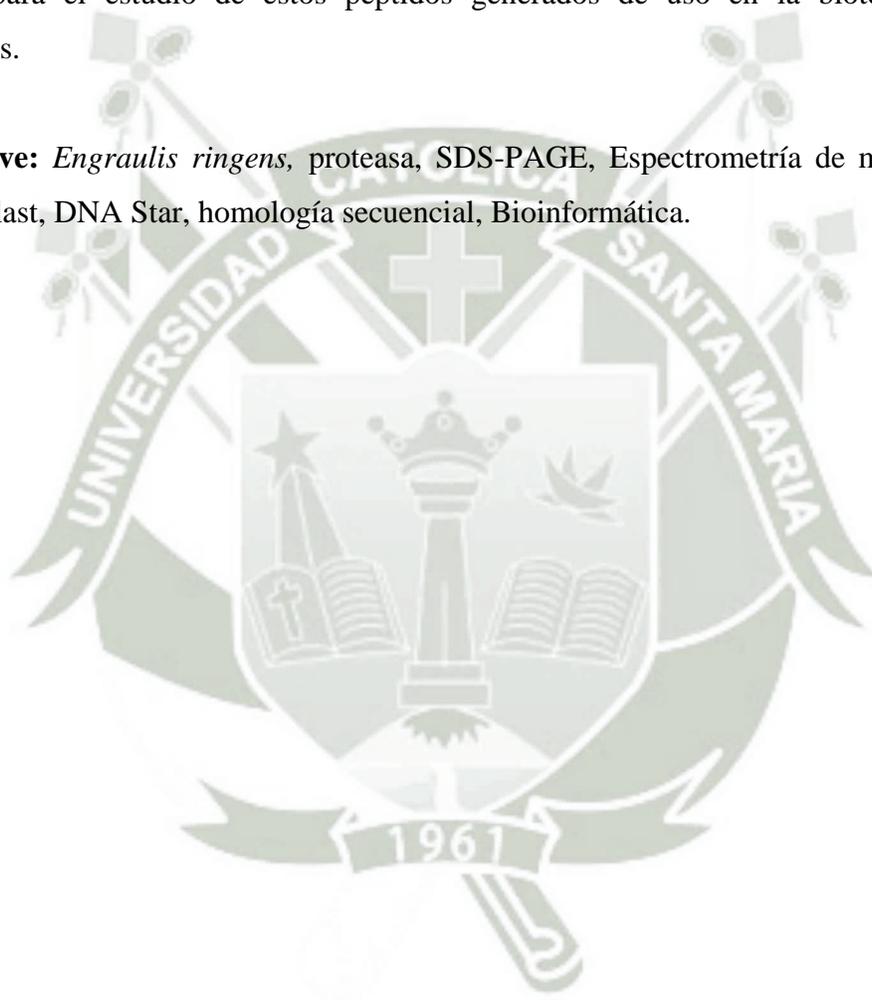


RESUMEN:

Se purificó bacterias correspondientes al grupo de *Pseudomonas sp*, a partir del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), de tres regiones diferentes: esófago, estómago y ciego pilórico. Posteriormente fueron caracterizadas molecularmente este grupo de bacterias por su secuencia ribosomal 16S. Seguidamente fueron purificadas proteasas procedentes de este grupo bacteriano por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa, revelando la presencia de un perfil cromatográfico muy semejante, de donde a partir del cual se caracterizó un pico proteico común entre los tres cromatogramas procedentes de las tres regiones del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) denominado como pico 5. Las masas calculadas por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF), fueron: Para la proteasa correspondiente a la región del esófago mostró una masa de 23102.66 Da, la proteasa correspondiente a la región del estómago mostró una masa de 22942.91 Da y finalmente la proteasa procedente del ciego pilórico mostró una masa de 23101.18 Da respectivamente. Seguidamente se realizaron estudios de homología secuencia por bioinformática de la secuencia de digestos trópticos de cada proteasa procedente de regiones diferentes con la ayuda de la base de datos disponible en la red como fue el BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), y con la ayuda del software DNA Star Ver 5.0; realizando un análisis de secuencia “de novo” de un péptido tróptico correspondiente al pico 5 del tracto gastrointestinal de

Engraulis ringens, (esófago, estómago y ciego pilórico), en la base de datos SWISS-PROT: *Annotated protein sequence database*, revelando un alto grado de homología con otras proteasas procedentes de gammaproteobacterias presentes en el ambiente marino, tal como se reporta de acuerdo a los códigos de acceso. Estos resultados alentadores sugieren que las proteasas procedentes de este grupo de gammaproteobacterias presentes en el tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), podrían contribuir con la generación de péptidos bioactivos hidrolizados a partir del músculo de *Engraulis ringens*, lo cual mostraría una valiosa información para el estudio de estos péptidos generados de uso en la biotecnología para diferentes fines.

Palabras Clave: *Engraulis ringens*, proteasa, SDS-PAGE, Espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF), Blast, DNA Star, homología secuencial, Bioinformática.



ABSTRACT:

Purified corresponding bacteria *Pseudomonas sp* group, from the gastrointestinal tract of *Engraulis ringens* (Peruvian anchovy), from three different regions: esófago, stomach and pyloric blind. Subsequently they were molecularly characterized by this group of bacteria 16S ribosomal sequence. Then they were purified proteases from the bacterial group by high performance liquid chromatography (HPLC) on reversed phase, revealing the presence of a very similar chromatographic profile, from which from which a common protein peak was characterized of the three chromatograms from the three regions of the gastrointestinal tract of *Engraulis ringens* (Peruvian anchovy) referred to as peak 5. The calculated masses by mass spectrometry (MALDI TOF / TOF) were: For the amount of the protease region of the esophagus showed a mass of 23102.66 Da, corresponding to the stomach region protease showed a mass of 22942.91 Da and finally protease from the pyloric caecum showed a mass of 23101.18 Da respectively. Then sequence homology studies were performed bioinformatics sequence of tryptic digests each protease from different regions with the help of the database available on the network as was the BLAST the National Center for Biotechnology Information (NCBI) , and software help DNA Star View 5.0; performing sequence analysis "de novo" of a tryptic peptide corresponding to peak 5 *Engraulis ringens* digestive tract (esophagus, stomach and pyloric blind), at the base of SWISS-PROT data: Annotated protein sequence database, revealing a high degree of homology with other proteases from Gamma-Proteobacteria in the marine environment, as reported under the access codes. These encouraging results suggest that proteases from the Gamma-Proteobacteria group present in the gastrointestinal tract of *Engraulis ringens* (Peruvian anchovy), could contribute to the generation of bioactive peptides from hydrolyzed muscle *Engraulis ringens*, which show valuable information for the study of these generated peptides used in biotechnology for other purposes .

Keywords: *Engraulis ringens*, protease SDS-PAGE, mass spectrometry (MALDI TOF / TOF), Blast, DNA Star, sequence homology, Bioinformatics.

INTRODUCCIÓN

La prospección e identificación de proteasas de origen microbiano ha sido tema de investigación de varios grupos de trabajo en biotecnología. Ghasemia et al. 2011 (51), aisló e identificó molecularmente bacterias productoras de proteasas extracelulares del lago salado Maharloo. Varios parámetros nutricionales y medioambientales (pH, temperatura) pueden afectar la producción de proteasas microbianas extracelulares, el almidón y la maltosa reportaron ser los mejores sustratos para la producción de proteasas (1). Metodologías cromatografías son comúnmente usadas para la purificación y caracterización bioquímica de las enzimas (23). Debido a la importancia de enzimas proteolíticas en la industria Abbasi-Hosseini SM. et al. en el 2011 desarrollo una cepa recombinante de *Bacillus subtilis* a partir de una cepa nativa de *Bacillus clausii*. Estudios de solubilización de vísceras de bacalao utilizando enzimas comerciales hidrolíticas con resultados positivos fueron reportados por Ivar S. et al. 2005 (47)

Se ha reportado que la microbiota gastrointestinal podría tener efectos positivos en el proceso digestivo de peces, lográndose identificar y aislar diferentes microorganismos productores de enzimas presentes en la microbiota perteneciente a los géneros *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, anaerobios no definidos y levaduras (40).

El proyecto se inicia como resultado del análisis de valor agregado de los productos que oferta nuestro país al mercado internacional, resultando en productos de muy poco valor agregado y por ende de bajo valor comercial. Ante esta situación, se plantea una propuesta biotecnológica por hidrólisis enzimática para incrementar el valor agregado de estos productos. En ese sentido, es necesario seleccionar y caracterizar enzimas de naturaleza hidrolítica del tipo proteasas capaces de cortar a nivel de enlaces peptídicos, de manera que sean útiles en la valorización de los posibles péptidos bioactivos.

Engraulis ringens (Anchoveta peruana), es un recurso marino abundante en el litoral peruano de alto valor proteico y contenido de omega-3, sin embargo los productos que se

obtienen luego de su procesamiento (harina y aceite) son de bajo valor comercial y vienen siendo utilizados como materia prima para otras industrias. Según la literatura las proteínas de peces poseen un valor intrínseco único, ya que a partir de ellas es posible obtener moléculas peptídicas con propiedades funcionales específicas para aplicaciones a nivel industrial. La aplicación de un proceso biotecnológico de hidrólisis enzimática requiere de una gama de enzimas proteolíticas capaces generar productos con propiedades funcionales dirigidos a mercados específicos. La aplicación de biotecnologías enzimáticas utilizando proteasas de origen bacteriano para la generación de péptidos bioactivos, incrementará el rendimiento del proceso conservando sus propiedades funcionales. Por lo tanto para la implementación de estas biotecnologías se hace necesario disponer de enzimas hidrolíticas del tipo proteasas, las cuales serán seleccionadas y caracterizadas molecularmente a partir de la microbiota de la anchoveta peruana *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), comenzando su estudio desde una aproximación proteómica.

En ese sentido la presente investigación tiene como objetivo caracterizar estructuralmente enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (anchoveta peruana), a través de una plataforma de aproximación proteómica, que va desde la caracterización estructural y funcional de las proteasas con la ayuda de la plataforma bioinformática.

Objetivos:**1. Objetivo General:**

- Caracterizar estructuralmente enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (anchoveta peruana), a través de una plataforma de aproximación proteómica funcional.

2. Objetivos Específicos:

- Aislar y caracterizar *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).
- Purificar y caracterizar bioquímicamente enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), a través de HPLC de fase reversa, electroforesis en SDS PAGE, BA_pNA y espectrometría de masas.
- Estudio bioinformático a través de homología secuencial de las enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (anchoveta peruana).

Hipótesis:

Siendo *Engraulis ringens* (anchoveta peruana), un alimento con altas propiedades nutritivas, como contenido proteico; es probable que caracterizando enzimas proteolíticas extracelulares procedentes de *Pseudomonas sp.*, presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens*, altamente eficientes, se obtengan hidrolizados enzimáticos proteicos a partir del músculo de *Engraulis ringens*; maximizando su biotransformación en la generación de hidrolizados de mayor valor comercial.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. *Engraulis ringens* (ANCHOVETA PERUANA)

El mar peruano se encuentra ubicado en el área de afloramiento más importante del mundo, tiene niveles de productividad no superados por ningún otro ecosistema marino, y que son la base de una inmensa cadena trófica lo que favorece el desarrollo de grandes volúmenes de recursos pesqueros (3) (37) (6).

Entre estos recursos, la anchoveta tiene particular relevancia para la economía del Perú, por sustentar la industria pesquera más importante para el país y una de las principales del mundo. Debido a su magnitud, variabilidad e importancia económica para el país, la anchoveta requiere de estudios permanentes en diferentes aspectos de su biología, como: alimentación, crecimiento, reproducción, distribución, etc.

1.1.1. Taxonomía

Engraulis ringens (Anchoveta Peruana), es un pez de la familia Engraulidae, que vive en la zona sudeste del océano Pacífico frente a las costas de Perú y Chile. En la tabla 1, se detalla la clasificación de este género:

Tabla N°1: Clasificación del género *Engraulis ringens*.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Clupeiformes
Familia	<i>Engraulidae</i>
Género	<i>Engraulis</i>
Especie	<i>Engraulis ringens</i>

Fuente: Jennyns, 1842

1.1.2. Características de la especie

La anchoveta es una especie pelágica, de talla pequeña, que puede alcanzar hasta los 20 cm de longitud total. Su cuerpo es alargado poco comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes. Su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre.

Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16° y 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno. La salinidad puede variar entre 34,5 y 35,1 unidades prácticas de salinidad (UPS).

La anchoveta tiene hábitos altamente gregarios formando enormes y extensos cardúmenes que en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud (21).

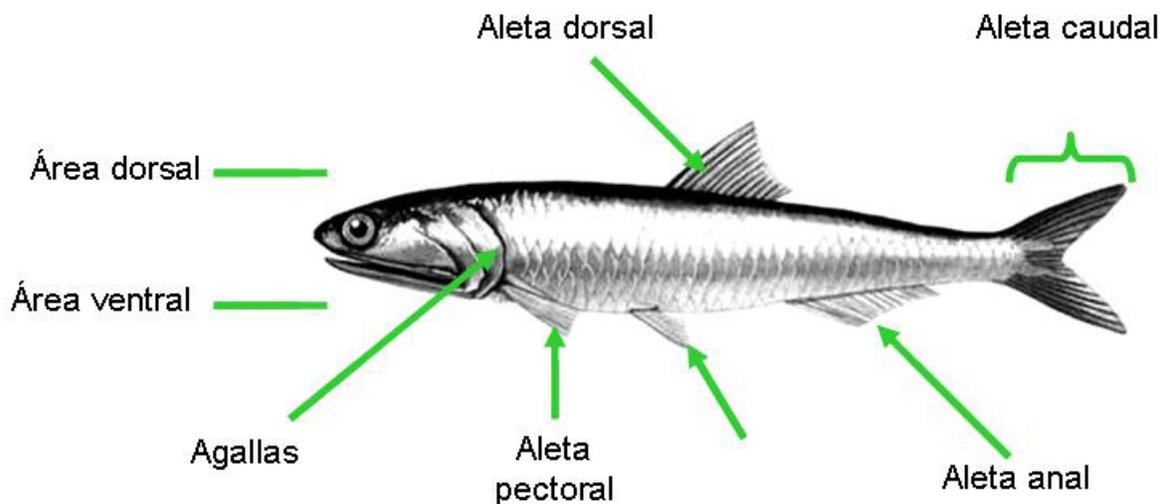


Figura N°1: *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana)

1.1.3. Distribución y abundancia de *Engraulis ringens*.

En el Pacífico Sudeste su distribución geográfica abarca el litoral peruano y chileno, entre los 03°30' y 37°00'S; diferenciándose dos stocks: norte-centro de Perú (03°30' – 16°00'S) que registra las mayores concentraciones y el stock sur Perú – norte Chile (16°01' – 24°00'S).

En periodos normales es capturada en la franja costera, dentro de las 60 millas náuticas y a profundidades menores de 100 metros. Su distribución vertical está en relación con las condiciones ambientales (21).

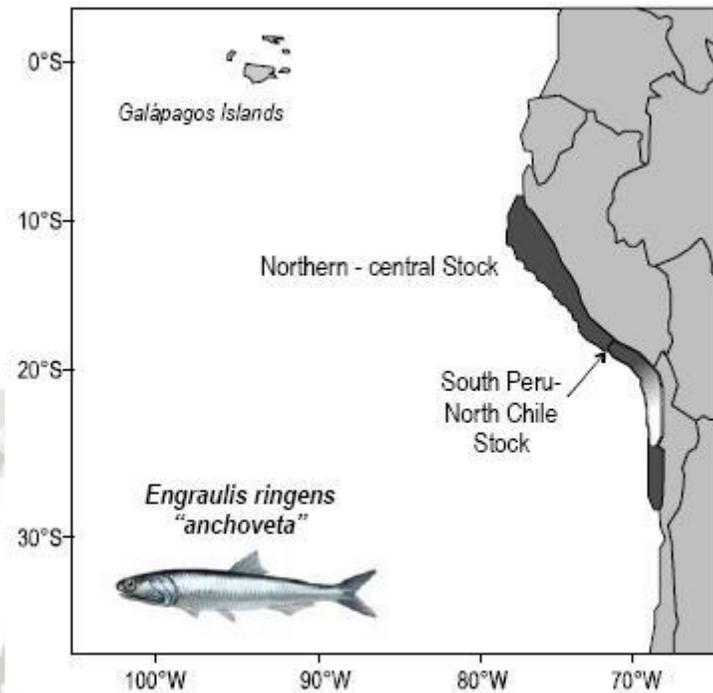


Figura N°2: Distribución de *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana)

1.1.4. Edad y crecimiento

Engraulis ringens (Anchoveta Peruana), es una especie de crecimiento rápido, su ingreso a la pesquería se da a una talla entre 8 a 9 cm de longitud total (5 a 6 meses de edad), principalmente entre diciembre y abril, siendo los grupos de edad de uno y dos años los que constituyen mayormente las capturas (21).

1.1.5. Reproducción

Engraulis ringens (Anchoveta Peruana), tiene sexos separados, alcanza su madurez sexual a los 12 cm y se reproduce mediante la producción de huevos por parte de las hembras, que

son fertilizados por el macho en el agua y el embrión se desarrolla fuera del cuerpo de la hembra.

El desove de la anchoveta abarca casi todo el año, con dos periodos de mayor intensidad, el principal en invierno (agosto-setiembre) y otro en el verano (febrero-marzo) (21).

1.1.6. Alimentación

Engraulis ringens (Anchoveta Peruana), es planctófaga por excelencia, es decir que se alimenta exclusivamente de plancton (fitoplancton y zooplancton).

Durante eventos El Niño, la anchoveta se alimenta mayormente de copépodos y eufausidos; disminuyendo el consumo de fitoplancton en su dieta (21).

1.1.7. Importancia Alimentaria

Este recurso es una valiosa fuente de proteína animal de alta calidad. Su alto contenido de lisina y otros aminoácidos esenciales la hacen particularmente adecuada para el complemento de dietas ricas en carbohidratos. Es rico en minerales como: potasio, hierro, fósforo y calcio. Su componente graso cuenta con una notable presencia de vitamina A y D, constituyendo una valiosa fuente de ácidos grasos muy necesarios para un adecuado desarrollo del cerebro y el cuerpo. La anchoveta, en particular es la especie que presenta los más altos contenidos de omega -3, principalmente ácidos grasos polinsaturados (EPA y DHA).

En los últimos años, el descubrimiento que el consumo de este tipo de ácidos grasos proporciona beneficios en fisiología humana disminuyendo los niveles de colesterol en la sangre y previniendo la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares; han hecho que a la anchoveta se le preste un mayor interés en su utilización, ya que puede contribuir significativamente a la mejora de la calidad nutritiva del alimento y el valor biológico de la dieta, en particular cuando se trata de niños que no tienen facilidades para la digestión de carbohidratos (21).

1.1.8. Usos potenciales

Se utiliza la anchoveta y también la sardina y otras especies para producir harina y aceite de pescado. Los grandes recursos de anchoveta fueron descubiertos en el Perú en los años 1950/60 y la industria harinera se desarrolló en los años 1960/70.

Hasta 2000 se utilizó solo una muy pequeña parte de las capturas para fabricar anchoas, sobre todo en Pisco utilizando capturas de pequeñas embarcaciones artesanales. Desde 2000 se comenzó a utilizar a la anchoveta también en forma fresca, enlatada y congelada. El Instituto Tecnológico Pesquero (ITP) con apoyo de la FAO había investigado la posibilidad de aprovechar la anchoveta para consumo humano directo. Luego el Gobierno del Perú lanzó una campaña promocionaría. Ahora la anchoveta se encuentra en supermercados y restaurantes. Existe una página web especial para fomentar el consumo humano directo de la anchoveta (<http://www.anchoveta.info/>) y todos los años hay una semana de la anchoveta (21).

1.2. Enzimas bacterianas extracelulares

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (26).

1.2.1. *Pseudomonas*

El grupo de *Pseudomonas* aisladas del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), materia de estudio en la presente tesis, literalmente significa “falsa unidad”. Debido a su amplia distribución en la naturaleza, las Pseudomonadaceae fueron observadas en los inicios históricos de la microbiología. El nombre genérico *Pseudomonas* creado para estos organismos estaba definido en términos relativamente vagos en 1894, es un género de bacteria gram negativa, bacilos con flagelo polar. Las pseudomonadaceae eran

aisladas de un variado número de nichos ecológicos de modo que un grandísimo número de especies recibían el nombre del género (10).

Tabla N° 2: Clasificación del género *Pseudomonas*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	Pseudomonas

Fuente: Migula, 1894.

1.2.1.1. Características:

Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen, son catalasa positivos y no forman esporas (27).

El género demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos (30). Son de fácil cultivo in vitro y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas.

1.2.1.2. Hábitat:

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medioambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas.

1.2.2. Enzimología

Las enzimas son catalizadores de las reacciones químicas en los seres vivos, es decir, son sustancias que sin consumirse en una reacción, incrementan notablemente su velocidad (34).

En una reacción catalizada por una enzima:

- a) La sustancia sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato.
- b) El sustrato se une a una región específica de la enzima, llamada centro activo y forma un estado intermedio denominado complejo enzima-sustrato.
- c) El centro activo comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de reacción.
- d) Una vez formados los productos, la enzima regresa a su forma inicial y puede comenzar un nuevo ciclo de reacción.

1.2.2.1. Propiedades de las enzimas

Por tener una estructura proteica, las enzimas poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles, en la cual son funcionales, de modo que los cambios en la conformación de las enzimas suelen ir asociados con alteraciones en su actividad catalítica.

Las enzimas son catalizadores específicos, cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Tienen una alta eficiencia y no se consumen en las reacciones, por tales razones, con poca cantidad de ellas se pueden transformar en producto grandes cantidades de sustrato. En las reacciones reversibles, las enzimas pueden actuar tanto en un sentido de la reacción como en el otro, dependiendo de la concentración del sustrato (8).

1.2.2.2. Clasificación de las enzimas

En el origen del estudio de las enzimas se utilizaron nombres referentes al órgano o tejido dónde se descubrieron (así la pepsina, de péptico o relativo a la digestión), o bien al sustrato o a la actividad desarrollada por la enzima, añadiéndole el sufijo -asa para darle un nombre (el caso de la “ureasa”, que cataliza la hidrólisis de la urea). Desde 1961, la Unión Internacional de Bioquímica, utiliza un sistema de clasificación y denominación, adoptado por convenio, que clasifica las enzimas en seis grandes grupos:

Tabla N°3: Clasificación de las enzimas (35).

Número	Clase	Reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
3	Hidrolasas	Rotura de enlaces incorporando una molécula de agua
4	Liasas	Rotura de enlaces covalentes por adición o eliminación de grupos
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización: transferencia de grupos dentro de la misma molécula
6	Ligasas	Formación de enlaces covalentes mediante reacciones de condensación

Fuente: Unión Internacional de Bioquímica

1.2.2.3. Proteasas:

Las proteasas, conocidas también como peptidasas o enzimas proteolíticas, catalizan reacciones de hidrólisis, que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas o de las cadenas polipeptídicas y dan como resultado péptidos más pequeños o aminoácidos libres.

Las proteasas que se encuentran en los organismos vivos, están implicadas en una gran variedad de reacciones fisiológicas; desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos altamente regulados, como la coagulación sanguínea, la muerte celular y la diferenciación de tejidos (16).

1.3. Estudio Bioinformático en la Aproximación Proteómica.

A medida que la tecnología proteómica mejora en sensibilidad y resolución se hace necesario el uso de herramientas adecuadas que permitan almacenar, analizar e interpretar los datos generados en los experimentos, tareas en las que la bioinformática juega un papel esencial. La combinación de técnicas como la electroforesis bidimensional y cromatografía, usadas para la separación de proteínas; y la espectrometría de masas, para su identificación, generan una enorme cantidad de datos muy complejos que han de ser convenientemente almacenados para que puedan ser consultados y analizados de manera eficiente (33).

1.4. Plataforma Proteómica en la Era Post Genómica.

La secuenciación del genoma de un alto número de especies ha conducido a lo que se llama la era de la post-genómica. En 1994, Wilkins introdujo el término de proteoma como equivalente lingüístico al concepto del genoma (45), el proteoma define el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma.

La proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo; en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, cómo en la enfermedad, en los factores ambientales y fisiológicos como la edad, el estrés, agentes tóxicos y/o fármacos (22). Ésta también puede ser considerada como una caja de herramientas, dotada de un conjunto de técnicas e instrumentos con un alto poder de resolución. La ampliación de esta caja de herramientas no sólo requiere la optimización de las tecnologías actuales, sino también del desarrollo y evaluación de las mismas, con la finalidad de aplicar estas técnicas como análisis de rutina (29).

La forma más adecuada para realizar el análisis y la caracterización del proteoma, dependerá de las adecuadas estrategias que se apliquen para la preparación de las muestras biológicas complejas y los métodos de análisis a utilizar que dependerán de la sensibilidad de los equipos. De esta forma, se alcanza a obtener la máxima resolución en los resultados; por lo tanto, las muestras deberán ser fraccionadas antes de la identificación de proteínas por espectrometría de masas (2).

Actualmente, la espectrometría de masas (MS) es una técnica indispensable para la caracterización del proteoma de manera reproducible, gracias a su velocidad, precisión y sensibilidad (31).

Las tecnologías que se aplican en la proteómica van encaminadas a separar, identificar y caracterizar un gran conjunto de proteínas con el objetivo de conocer la abundancia de las mismas, su localización, modificación e interacciones entre diferentes proteínas.

No existen métodos o instrumentos que sean capaces de identificar y cuantificar los componentes de una muestra compleja de proteínas en una única manipulación.

1.4.1. Fraccionamiento de Proteínas

La mayoría de muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas, las cuales no pueden ser analizadas directamente por espectrometría de masas dada su complejidad, por lo tanto es necesario realizar un paso previo e importante de “Fraccionamiento”, permitiendo así incrementar el número de proteínas identificadas y a la vez favorezca la detección de aquellas presentes en menor cantidad.

Actualmente las técnicas de proteómica combinan varias técnicas de separación de proteínas previo al análisis de MS, lo que permite ganar resolución en la identificación del proteoma. Los dos métodos más utilizados para el fraccionamiento de proteínas son la electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE) y la cromatografía líquida.

1.4.1.1. Electroforesis Bidimensional.

La tecnología más utilizada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Para muchas aplicaciones proteómicas, la electroforesis en una dimensión es el método de elección. Las proteínas se separan de acuerdo a su masa y las proteínas son solubilizadas en dodecil sulfato sódico (SDS). Es una técnica sencilla, reproducible y permite la separación de proteínas de 10-300 kDa.

Uno de los pilares de la proteómica fue el desarrollo de la electroforesis bidimensional 2DPAGE, que permite separar hasta miles de proteínas en un sólo experimento, y está basada en una separación de las proteínas en función de la carga, seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular. La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS. La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes (19). En cuanto a la detección de las

proteínas, tradicionalmente se ha venido empleando la tinción con azul de Coomassie, o con plata, o tinciones fluorescentes para conseguir mayor sensibilidad.

Para un buen análisis de la imagen de los geles bidimensionales, es necesario que estos sean escaneados y guardados en alta resolución con la finalidad de obtener una imagen digital que permita llevar a cabo una serie de análisis como son la detección de los puntos (especies proteicas), eliminación del ruido de fondo, determinación de la intensidad de cada uno de los puntos, cuantificación y comparación del patrón de expresión de cada uno de los puntos generados en cada uno de los geles analizados.

Obteniendo como resultado una comparación cualitativa de los perfiles de expresión de las proteínas y la identificación de los cambios en la expresión de estas, en cada una de las muestras estudiadas. La complejidad de los geles bidimensionales requiere el empleo de paquetes informáticos especializados para su análisis (17).

1.4.1.2. Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa.

En la actualidad el uso de la cromatografía como técnica de fraccionamiento ha aumentado su uso, dada su capacidad de superar algunas de las limitaciones de los métodos de fraccionamiento por electroforesis bidimensional, lo que permite abordar proteínas difíciles de analizar dada su estructura y composición, como las proteínas con puntos isoelectricos extremos (ácidos y básicos) y las proteínas hidrofóbicas, ya que dada su composición y escasa solubilidad están poco representadas en los mapas electroforéticos bidimensionales obtenidos hasta el momento.

Otras que son difíciles de analizar son las de baja abundancia que dada su escasez no puedan apreciarse por la presencia de proteínas mayoritarias que opacan o se sobreponen ante estas, imposibilitando de este modo su fácil detección.

La cromatografía líquida es una técnica de fraccionamiento que puede utilizarse para separar proteínas o péptidos según las propiedades físicas y/o químicas de estos.

La cromatografía multidimensional se lleva a cabo mediante la aplicación de sucesivos fraccionamientos, utilizando diferentes clases de columnas tales como: las de fase reversa (RP, “reverse Phase”), las de exclusión molecular (SEC, “Size Exclusion Chromatography”), las de intercambio catiónico (SXC, Strong catión Exchange”) o aniónico (SAX, “Strong Anion Exchange”), y las de afinidad.

La técnica de fase reversa es el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada en HPLC que son las siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography. La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza presiones elevadas para hacer pasar un flujo de fase móvil a través de una columna empacada con partículas micrométricas. Sin la aplicación de presión sería prácticamente imposible que el eluyente pasara a través de la columna.

Dadas las características de una columna de cromatografía de fase reversa, se requerirá de un equipo de HPLC para realizar la separación. Así que es relevante comentar de forma general cómo está conformado este equipo.

Un equipo de HPLC básicamente debe contar con un sistema de bombeo que impulse el flujo de la fase móvil a través de la columna, una columna que separe los componentes de la muestra, un detector que mida alguna característica de dichos componentes conforme van saliendo de la columna y un procesador que convierta la señal electrónica del detector en un cromatograma (12).

1.5. Espectrometría de Masas.

Mediante espectrometría de masas es posible obtener información estructural de las proteínas tal como secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos.

Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comparando los resultados con bases de datos. La espectrometría de masas también resulta útil para identificar y localizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas (50). La recopilación de la información por medio de MS se divide en 3 etapas:

1.5.1. Elaboración previa de la muestra.

Como se mencionó previamente, la proteína se resuelve de una mezcla proteica empleando generalmente técnicas electroforéticas. Debido a que la conversión de la proteína en sus constituyentes peptídicos proporciona mayor información que la obtenida con la proteína completa, es necesario llevar a cabo una fragmentación de la misma por los métodos que ya se describieron en este trabajo. Una vez obtenidos los constituyentes peptídicos estos pueden ser purificados por RP-HPLC, utilizando ZipTips (Millipore) o material de perfusión Poros R2 (50).

1.5.2. Bombardeo Láser (ionización).

Para el análisis de muestras biológicas por MS es necesario que las moléculas estén cargadas eléctricamente y secas. Este requisito se cumple convirtiendo las moléculas en iones desolvatados.

Han sido varias las técnicas que se han desarrollado con este fin, las primeras de ellas se basaron en el impacto de electrones y en la ionización química. Estas técnicas resultaron efectivas para ionizar moléculas pequeñas pero no para la ionización de moléculas de alto peso molecular, como las biomoléculas.

La espectrometría de masas se revolucionó en 1981 gracias a la introducción del bombardeo rápido de átomos (FAB, fast atom bombardment) por Barber. Esta técnica posibilitó la ionización y detección de biomoléculas con relativamente buena sensibilidad.

Hoy en día, los métodos más comúnmente empleados para generar iones desolvatados son el MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) y el ESI (electrospray ionization), estos han reemplazado por completo al FAB. Tanto el MALDI como el ESI son métodos de ionización suaves donde se mantiene relativamente la integridad de la muestra (50).

1.5.2.1.MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).

Este método fue introducido en 1988 por Karas y Hillenkamp. En el MALDI la muestra se incorpora en una matriz de moléculas y posteriormente es sometida a radiación con un láser. El láser promueve la formación de iones moleculares. La matriz, capaz de absorber luz de la longitud de onda emitida por el láser, está constituida por una molécula pequeña tal como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico. Tanto la muestra como la matriz se colocan en una placa de metal y se dejan evaporar, propiciando la formación de cristales. La placa de metal se coloca en el espectrómetro y el láser es dirigido automáticamente a sitios específicos de la placa. La luz emitida por el láser, generalmente con una longitud de onda de 337 nm, causa la desorción y la ionización de la muestra tanto por protonación como por desprotonación generando iones predominantemente monovalentes. Los iones producidos son posteriormente acelerados hasta el analizador.

El proceso puede estar automatizado desde la aplicación de la muestra hasta la recolección y el análisis de los datos, lo que constituye la principal ventaja del MALDI. Adicionalmente, no siempre es necesario que las muestras a analizar sean sometidas a procesos de purificación después de la digestión en gel, lo que constituye otra ventaja de este método sobre el ESI (Electrospray Ionization) (50).

1.5.3. Determinación de masas.

Después de la conversión de proteínas o péptidos en iones moleculares, estos son acelerados desde la fuente de iones hacia el analizador de masa. En el analizador de masa los iones son separados de acuerdo a su relación carga-masa (m/z) en el vacío (50).

1.5.3.1.Analizadores de Cuadrupolo.

Uno de los analizadores de masa más comunes es el analizador de cuadrupolo. En él los iones son conducidos a través de un campo eléctrico creado por un arreglo de 4 barras

metálicas paralelas, el cuadrupolo. Un cuadrupolo puede transmitir todos los iones, o bien actuar como un filtro másico que permita la transmisión de iones con una cierta relación m/z . Un solo analizador de cuadrupolo no brinda información útil en análisis de proteómica, sin embargo al combinar tres cuadrupolos en serie y acoplarlos a un sistema de ESI es posible obtener información acerca de la secuencia de amino ácidos de un péptido. Empleando esta configuración, el primer y tercer cuadrupolo actúan como filtros de masa, mientras que el segundo funciona como una celda de colisión en la cual se produce la información sobre la estructura proteica. A esta configuración se le denomina “tandem space” o MS/MS (50).

1.5.3.2. Analizadores de Tiempo de vuelo (ToF).

Éste es uno de los analizadores más simples. Mide la relación m/z de un ión determinando el tiempo requerido para recorrer la longitud de un tubo de vuelo desde que el ión abandona la fuente de iones; el ión es impulsado con una velocidad inicial, la cual depende directamente de su masa. El tiempo de vuelo del ión es proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z dada una aceleración constante provocada por el voltaje.

$$Tiempo\ de\ vuelo = k \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Algunos analizadores de masa de ToF incluyen un espejo de iones o reflectrón al final del tubo de vuelo, el cual repele los iones a través de este tubo y los dirige al detector. De esta forma, se ve incrementada la longitud del tubo de vuelo con lo que mejora la resolución. El reflectrón sirve también para corregir las pequeñas diferencias en la energía cinética que existe entre iones de la misma masa. Estas diferencias se deben a la posición que guarda cada ión en la fuente de iones al momento que son acelerados al aplicar una diferencia de potencial. Las diferencias en la energía cinética de los iones se reducen debido a que los iones con energía cinética mayor viajan más lejos en el reflectrón que los iones con energía cinética menor. Esto ocasiona que los iones con la misma masa se enfoquen mejor en el detector mejorando considerablemente la resolución y la precisión del cálculo de masas (50).

1.6. Aproximación al Proteoma Funcional en la era Post Genómica.

Los datos generados en un espectrómetro de masas, son visualizados en forma de picos; a la representación gráfica de los datos se le denomina espectro de masas. Cada uno de los picos de un espectro de masas representa valores de m/z y la intensidad de cada señal.

Definir la identidad o secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa es un procedimiento común en estudios de proteómica. Utilizando la información contenida en bases de datos es posible identificar rápidamente un gran número de proteínas con gran precisión.

La identificación exitosa de proteínas depende de la calidad de los datos generados en el espectrómetro de masas, de los datos contenidos en la base de datos y, del método empleado en la búsqueda de datos. En general, existen diversas estrategias para el manejo de datos obtenidos por MS (18).

1.6.1. Estudio de homología secuencial vía espectrometría de masas MS/MS.

Como se mencionó previamente, la fragmentación de péptidos utilizando la técnica *ion product scan* o de decaimiento post-fuente de masas proporciona información acerca de la secuencia. La información obtenida a partir de una secuencia es indudablemente más precisa que la proporcionada por la masa molecular. Por tanto, la secuencia de un péptido suficientemente largo puede ser suficiente para identificar una proteína que ha sido caracterizada previamente.

Es posible llevar a cabo un análisis manual del espectro de masa para determinar la secuencia tomando como base los iones (de la serie b y y) generados.

Los datos también pueden interpretarse en bases de datos, a este tipo de búsqueda se le denomina MS/MS no interpretado (uninterpreted MS/MS). Y generalmente basta con obtener la secuencia de 2 péptidos para identificar una proteína de un genoma conocido.

Son muchas las bases de datos disponibles para realizar búsquedas de este tipo, sin embargo presentan problemas en el análisis cuando existen modificaciones y polimorfismo en las proteínas (11).

1.6.2. Secuencia de *novo* y estudio Bioinformático.

El objetivo de esta aproximación es obtener secuencias completas de aminoácidos que se deduzcan *de novo* de los espectros MS/MS (bien mediante interpretación manual o con ayuda de algoritmos) y buscar homologías frente a proteínas presentes en bases de datos.

La secuenciación de *novo* es necesaria cuando el análisis por MFP o MS/MS no interpretado no produce resultados confiables. Esto es común en casos en que el genoma del organismo del cual procede la proteína no ha sido caracterizado completamente. Aunque la proteína de interés pueda no ser identificada o sea una proteína desconocida, la información de la secuencia puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente.

En condiciones de baja energía, el ión precursor se fragmenta para producir iones $-b$ y $-y$ de longitudes variadas. La secuencia de los iones de ambas series es complementaria, de manera que es posible obtener una secuencia completa aun cuando existan *gaps* en la secuencia de una u otra serie.

Cuando los péptidos son obtenidos por digestión con tripsina, el extremo C-terminal de los mismos es arginina o lisina. En un espectro MS/MS, el residuo C-terminal se puede observar en el fragmento correspondiente al ión- $y1$. Por tanto, el punto de inicio de la serie y siempre será conocido. A la masa observada del ión- $y1$ hay que añadir la masa de una molécula de agua y de un protón. Si la masa del ión- $y1$ es de 175 Da, entonces el residuo es arginina; en cambio, si la masa es de 147 Da el residuo es lisina. Una vez identificado el ión- $y1$ en el espectro, la secuencia de la serie puede iniciarse a partir de ese punto (50).

1.6.3. Análisis estructural de Proteínas.

Hasta el momento se cree que la estructura primaria de una proteína induce a establecer las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria ya que el ADN no sólo determinaría la estructura primaria sino también los niveles superiores de estructura. Sin embargo, la actividad biológica de la proteína depende en gran medida de su estructura terciaria específica mantenida por los enlaces mencionados anteriormente, de tal manera que cuando una proteína se somete a: calor, determinadas sustancias químicas, cambios bruscos de pH, etc. su estructura terciaria se desorganiza y las cadenas peptídicas adquieren una conformación al azar que induce a la pérdida de su actividad biológica especialmente cuando actúa como enzima.

Las temperaturas elevadas, rompen muy fácilmente los puentes débiles de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas a causa del aumento en la energía cinética de las moléculas. La alteración del pH puede cambiar el patrón de ionización de los grupos carboxilo y amino en las cadenas laterales de los aminoácidos desorganizando el patrón de atracciones y repulsiones iónicas que contribuyen a la estructura terciaria normal.

La pérdida de la estructura terciaria se denomina desnaturalización, y siempre se acompaña de la alteración de las funciones biológicas normales de las proteínas. La desnaturalización se puede originar por calor o concentraciones altas de sustancias polares y solventes no polares tales como la urea que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura de la proteína.

Generalmente la desnaturalización es irreversible, particularmente si muchas proteínas desnaturalizadas interactúan en eventos no específicos al azar, como se presenta en los cuerpos de inclusión característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en algunos casos la desnaturalización es reversible, y una vez las condiciones del ambiente vuelvan a su estado normal, la proteína puede adquirir su forma activa (ejemplo la lisosima). En este caso se habla de renaturalización (48).

1.6.4. Importancia del grupo R de los aminoácidos.

Las cadenas de polipéptidos que forman una proteína se encuentran enrolladas o plegadas de modo que forman una macromolécula con una conformación específica, tridimensional. Esta conformación determina la función de la proteína. Por ejemplo, la conformación única de una enzima le permite "identificar" y actuar sobre su sustrato, sustancia que dicha enzima regula. La forma de una proteína hormonal le permite combinarse con su receptor en el sitio de la célula blanco (La célula sobre la cual la hormona está diseñada para actuar).

Las proteínas se clasifican en fibrosas o globulares. En las proteínas fibrosas, las cadenas de polipéptidos están dispuestas en láminas largas; en las proteínas globulares las cadenas de polipéptidos se encuentran plegadas en forma estrecha a fin de producir una molécula compacta, de forma esférica. La mayor parte de las enzimas son proteínas globulares (4).

1.6.5. Plegamiento de proteínas.

El plegamiento de proteínas es el proceso por el que una proteína alcanza su estructura tridimensional. La función biológica de una proteína depende de su correcto plegamiento. Si una proteína no se pliega correctamente será no funcional y, por lo tanto, no será capaz de cumplir su función biológica.

El proceso inverso es conocido como desnaturalización de proteínas. Una proteína desnaturalizada no es más que una cadena de aminoácidos sin una estructura tridimensional definida ni estable. A menudo, las proteínas desnaturalizadas pierden su solubilidad y precipitan. En algunos casos los procesos de plegamiento y desnaturalización son reversibles, aunque en otros no.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación:

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios ubicados en las instalaciones de centro de investigación BIOTEC CMC, en planta de Camposol S.A.C., Distrito de Chao, Provincia de Virú, Departamento de La Libertad.

Las pruebas realizadas en el laboratorio, formaron parte de los componentes de los siguientes proyectos:

- Proyecto 2012-00060: “Bioprospección de genes, lipasas y proteasas de la microbiota (bacteriana) de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) de interés en la industria de la harina y aceite de pescado”
- Convenio N° 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012: “ Aplicación de la Espectrometría Doble Masa MALDI-TOF/TOF para el análisis de aceites de Anchoveta y procesos Biotecnológicos de valorización”

2.2. Materiales:

2.2.1. Material Biológico:

- *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

2.2.2. Materiales de Laboratorio:

- Placas Petri.
- Tubos de 16x150mm.
- Asa de digralski.
- Frasco transparente con tapa rosca de 50ml.
- Frasco transparente con tapa rosca de 100ml.
- Frasco transparente con tapa rosca de 500ml.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Tubos centrífuga de 50ml.

- Tubos de ensayo 13x100mm.
- Vaso de Precipitación de 100ml.
- Vaso de Precipitación de 250ml.
- Termómetro digital.
- Termómetro digital.
- Tubos Ependorf de 1.5ml.
- Tubos Ependorf de 200ul.
- Puntas para Pipetas sin filtro 1000-5000 μ L.
- Puntas para Micropipetas con filtro 0-200 μ L.
- Puntas para Micropipetas con filtro 0-200 μ L.
- Puntas para Micropipetas con filtro 100-1000 μ L.

2.2.3. Equipos, Aparatos e Instrumentos:

- Autoclave.
- Microscopio.
- Cámara de flujo laminar.
- Sistema de Purificación de Agua Ultrapura MilliQ (MERCK).
- Congeladora a -80°C (Ilshin Biobase).
- Balanza Analítica Explorer (OHAUS).
- Centrifuga Refrigerada (PrO-Research).
- Refrigeradora (Electrolux).
- Sistema doble de placas "Owl™ Dual – Gel Vertical Electrophoresis Systems P8DS 1" (Thermo Scientific).
- Pipeta Automática - Micropipeta 0.5-10 μ L. (Axygen).
- Pipeta Automática - Micropipeta 5-50 μ L. (Axygen).
- Pipeta Automática - Micropipeta 20-200 μ L. (Axygen).
- Pipeta Automática - Micropipeta 100-1000 μ L. (Axygen).
- Pipeta Automática - Micropipeta 1000-5000 μ L. (Axygen).
- Accesorios para Formación de Geles en Electroforesis 1D: Cubeta para formación de geles (Carrier), Cristales Planos de Vidrio 10x10 cm. (placas), Peines 10cm. x 10 pozos y Separadores de 0.8 mm. De 10cm. (Thermo Scientific).

- Fuente de Poder Eléctrico (Thermo Scientific).
- Maldi Tof/Tof ABSciex 4800. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- Placa MALDI (OptiPlate-384 well Microplate).

2.2.4. Reactivos:

- Solución salina estéril.
- Agua destilada.
- Caldo Tripticasa Soya.
- Caldo Marino.
- Agar.
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Verde de malaquita.
- Rojo de congo.
- Colorante de Maneval.
- Aceite de inmersión.
- Extracto de carne.
- Extracto de levadura.
- Peptona.
- Skim Milk Powder.
- Glicerol.
- Cloruro de Sodio, NaCl grado analítico (CalBiochem).
- Etanol Absoluto 99.8% (J.T.Baker).
- Ácido Clorhídrico, HCl 36.5-38.0% (J.T.Baker).
- Hidróxido de Sodio, NaOH grado analítico (Merck).
- BSA (albumina de Suero Bovino)- (SIGMA).
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA).
- Ácido fosfórico al 85 % (J.T.BAKER).
- Agua Milli-Q (Millipore).

- Glicerol, grado molecular (JT.Baker).
- Glicina (Bio-Rad).
- Marcadores Molecular de Proteínas (Thermo Scientific).
- Acrilamida (MERCK).
- N,N-metileno-bisacrilamida (Merck KGaA - Darmstadt, Germany).
- Tris-Base (JT.Baker).
- Dodecil Sulfato de Sodio, SDS (Sodium Dodecil Sulafate) (Promega).
- N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) (Promega).
- Persulfato de amonio, PSA (Omnipure).
- Azul de bromofenol (SIGMA).
- Ditiotreititol (DTT) (Promega).
- Metanol para análisis EMSURE (MERCK).
- Ácido Acético Glacial (J.T.Baker).
- Acetonitrilo (Merck).
- Tripsina, grado secuenciamiento (Promega).
- Matriz α CHCA (Acido alfa-4-hidroxicinámico Ciano).
- Acido trifloro Acético 25% (Merck).

2.2.5. Materiales Varios:

- Cajas de tecnopor de 20 litros.
- Guantes venitex (guantes de Nitrilo, Talla 6).
- Guantes de cuero para protección de Temperaturas.
- Hielo seco y pica hielo.
- Bolsas ziplop.
- Bolsas de polipropileno transparentes.
- Cinta de embalaje.
- Marcador grueso.
- Papel toalla.
- Tabla de Picar.
- Pinzas Quirúrgicas.
- Bisturí N°4.

2.2.6. Softwares y Herramientas Bioinformáticas:

- 4000 Series Explorer™ (Software que permite la manipulación y recolección de datos provenientes del Equipo MALDI ToF/ToF ABSciex 4800 Plus).
- Protein Pilot™ (Software que simplifica la identificación de proteínas).
- DNASTar (Software que proporciona información genómica, y proteómica)
 - EditSeq (Importa y edita secuencias)
 - MegAlign (Alineamiento múltiple de secuencias)
 - Protean (Herramienta de análisis de proteínas)
- BLAST (Herramienta para la búsqueda de homólogos según alineamiento)
 - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
 - EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast>)
- SWISS-MODEL (Servidor de homología proteica estructural de modelado) (<http://swissmodel.expasy.org>)

2.3. Métodos

2.3.1. Muestreo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se colectó materia prima; *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) en la bahía de Chimbote, en el muelle CRIANI, provincia de Santa, región Ancash; desde las 11 a 13 horas, aproximadamente, hora que llegan de alta mar las embarcaciones artesanales (bolicheras).

Se utilizaron guantes de nitrilo, con el fin de evitar el contacto de la piel con la materia prima. Se seleccionaron 30 individuos adultos de aproximadamente 12cm con características de frescura, en la piel pigmentación viva y brillante con consistencia tersa y firme, el abdomen terso y liso sin flacidez ni hinchazón (7).

Los individuos seleccionados fueron transportados en hielo al laboratorio, en cajas de tecnopor, embolsados para evitar daño, en una proporción individuo/hielo 1:2 (w/w), para conservar su frescura hasta el momento de su procesamiento (25).

En el laboratorio, fueron almacenados a -80°C.

2.3.2. Obtención del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se colocaron los individuos en posición horizontal, se desinfectó la superficie de las muestras biológicas con etanol al 90%. Se colocó el pez sobre una bandeja de disección debidamente desinfectada, con el lado izquierdo del pez por arriba. Se cortó la aleta pectoral y se hizo un corte transversal hasta el punto inmediatamente anterior a la aleta anal. La disección consistió en la obtención del tracto gastrointestinal completo, desde el esófago hasta el intestino, en condiciones estériles.

Se depositaron los tractos gastrointestinales de *Engraulis ringens* sobre placas Petri estériles y limpias con S.S.E (solución salina estéril).

2.3.3. Aislamiento y caracterización parcial de cultivos bacterianos presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se segmentaron las regiones de los tractos gastrointestinales (esófago, estómago y ciego pilórico), agrupando las regiones de interés del mismo tipo las cuales se colocaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm que contenían 10 ml de Solución Salina Estéril. Se homogenizaron las muestras con la finalidad de obtener la mayor cantidad representativa de la microbiota gastrointestinal. Se tomó 1 ml del homogenizado y se realizó 5 diluciones seriadas. Se tomó 0.1mL de muestra y se colocó en placas de TSA y AM por duplicado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 24-48horas. La diseminación del aislamiento en placa se realizó con asa de drigalski.

Las colonias bacterianas visualizadas en las placas se replicaron en medio TSA/AM y se incubaron nuevamente por 2 días. Los aislados se replicaron en placas de 4 cuadrantes y con la ayuda del microscopio nos cerciorarnos que la colonia este pura. Seleccionamos una colonia y la pasamos a tubo de plano inclinado TSA/AM. Las cepas aisladas puras fueron caracterizadas a través de tinción Gram (identificación de morfología), Tinción de Wirtz (identificación de esporas) y Tinción de Maneval (identificación de cápsulas) para la caracterización parcial de los cultivos bacterianos.

2.3.4. Detección y selección de microorganismos con mayor Actividad Proteolítica en medio sólido.

La producción de proteasas fue detectada en un medio de cultivo sólido constituido por agar 15 g/L, extracto de levadura 5 g/L, Skim milk 10 g/L, con un pH inicial de 7,2 preparado en agua destilada. Se sembró una cepa en cada cuadrante por punción. Una zona clara alrededor del sitio de crecimiento de la bacteria desde las 24 hasta 96 horas a temperatura ambiente fue tomada como evidencia de actividad proteolítica (41).

Tabla N°4: Tamaños de halo de actividad proteolítica.

-	No evidencia halo
+	Tamaño del halo menor a 2mm
++	Aproximado 10mm
+++	Aproximado 15mm
++++	Aproximado 20mm
++++	Aproximado 25mm

Fuente: Sánchez. *et al.*, 2004

2.3.5. Identificación molecular del género *Pseudomonas sp.*

Extracción de ADN Genómico de bacterias:

Se extrajo 1mL de cultivo de bacteria obtenido de ceparios, los cuales fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5mL cada uno, se centrifugó a 14,000 rpm x 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se agregó 200uL de Buffer TENS (el buffer debe estar a temperatura ambiente) y suavemente se mezcló por inversión varias veces. La muestra se sometió a shock térmico; la suspensión se calentó a 65°C por 2 minutos, luego se colocó en frío (-4°C) por 2 minutos, dicho paso se repitió 2 veces; esto permitió la lisis de las células. Se adicionó 2uL de la enzima proteinasa (20mg/mL) y se incubó a 54°C por 1 hora. Se agregó 400uL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y luego se vortexó, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. La fase superior se colectó en un nuevo tubo, se adicionó 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se vortexó, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. La fase superior se colectó en un nuevo tubo (300-250uL), se adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol más 0.1 volumen de acetato de sodio 3M a pH 4.8 y

se mezcló por inversión ligera. Se incubó a -20°C por 1 hora, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 750uL de etanol al 70% (solución helada) y se mezcló bien, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante (repetimos este paso 2 veces). Se dejó secar al ambiente (con los tubos ligeramente inclinados sobre papel secante; usamos calor ligero si es necesario). Por último se resuspendió el pellet de ADN en 50uL de TE 1X y finalmente se adicionó 1uL de la enzima ARNasa y se incubó a 37°C por 30min.

Caracterización molecular a nivel genómico del ADNr:

Para la caracterización a nivel del ADNr se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la caracterización de bacterias se amplificó la región 16S. La amplificación por PCR consiste en una mezcla de reacción constituida por: 25 uL de PCR Master mix 2X (incluye buffer de PCR, dNTPs, MgCl_2 y Taq DNA polimerasa), 1 μL de iniciadores universales 16SrRNA 27F3 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 16SrRNA 1492R4 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), 1 uL de MgCl_2 , 21 μL de agua ultra pura para completar un volumen de 49 μL . Luego se adicionó 1 μL del ADN extraído.

NOTA: La reacción de amplificación se realizó en un equipo Veriti (AppliedBiosystems) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 94°C por 4 min., seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 seg., 60°C por 45 seg., y 72°C por 45 seg; con un ciclo final de 72°C por 7 min y 4°C para su conservación por tiempo indefinido.

Análisis electroforético de los productos obtenidos luego de la PCR:

Para la electroforesis de los productos amplificados en la reacción de PCR, se preparó un gel de agarosa al 1.5% como se detalla a continuación:

a) Preparación de gel de agarosa:

Se pesó 1.8 g de agarosa, disolviendo 120 mL de TAE 1X (Tris base 0.5M, EDTA 50mM, ácido acético glacial), se calentó en horno microondas hasta punto de ebullición, dejando enfriar ligeramente y luego se adicionó 5 - 7 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL) agitando circularmente para homogenizar. A continuación, se armó el molde de la cámara

electroforética, agregando el contenido de la solución TAE preparada sobre el molde de la cámara electroforética dejando enfriar hasta que solidifique por completo, se retiró las peinetas y luego se colocó el molde que contenía el gel sobre la cámara electroforética. Luego se agregó TAE 1X hasta cubrir por completo la superficie del gel de agarosa.

b) Preparación de la solución de carga de producto de amplificación:

Se colocó 2 μL de azul de bromofenol (6X) sobre el reverso de una lámina de Parafilm. Se incorporó 10 μL del producto de amplificación y se procedió a mezclar, a continuación se depositó la solución de carga sobre los pocillos del gel de agarosa.

NOTA: Adicionalmente, se cargó un marcador de peso molecular de 100bp.

c) Programación del equipo de electroforesis:

Se programó el equipo de electroforesis para que se dé la migración del producto de amplificación en un voltaje de 90V por 60 min.

d) Revelación del producto de amplificación en el trans-iluminador:

Se colocó el gel de agarosa sobre la pantalla del trans-iluminador para revelar los productos de amplificación.

NOTA: Los productos de amplificación fluorescen bajo luz ultravioleta, debido a la presencia de bromuro de etidio (molécula fluorescente que se intercala en la doble cadena del producto amplificado).

Secuenciación:

Para la secuenciación, se tuvo en cuenta la intensidad de la banda obtenida, los productos de PCR fueron diluidos al 1/2, 1/5 o al 1/10 si así lo requerían. Estas muestras se enviaron a secuenciar con sus respectivos iniciadores: forward (sentido) y reverse (anti sentido) los cuales se diluyeron a una concentración de 10 Pmol / μL ; 20 μL de primer diluido (20 μL de F y 20 μL de R) por 40 μL de muestra enviada (20 μL para F y 20 μL para R). La secuenciación se llevó a cabo en Macrogen - EE.UU. y los resultados de la secuenciación fueron recibidos vía electrónica.

Alineamiento de secuencias:

Después de tener las secuencias de ADN de las bacterias, se procedió a analizar los datos en el programa “MEGA”, alineando las secuencias producto de la amplificación, el iniciador forward con las del iniciador reverse, guiándose de los picos que se observarán en las gráficas de secuenciación.

Análisis filogenético:

Teniendo las secuencias alineadas, estas fueron analizadas utilizando el software “BLAST” (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCHTOOL), de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) la cual buscó similitud de nuestras secuencias con las secuencias que se tiene en el banco de genes “GENBANK”, este arrojó como resultado una lista de microorganismos que tienen un elevado porcentaje de homología con la muestra que se analizó.

2.3.6. Producción de enzimas extracelulares

Se sembró cada cepa en medio líquido (TSB/MB) y se evaluó su crecimiento realizando un recuento en Cámara de Neubauer a las 24-48 horas.

La producción de proteasas por los aislados se llevó a cabo en un medio constituido por extracto de carne 3g/L, peptona 5 g/L, NaCl 8g/L y skim milk 20g/L. Un volumen de 5mL de un cultivo bacteriano con crecimiento de 24-48 horas en TSB/MB fue inoculado en un matraz de 200mL con 50mL de medio para la producción de proteasas, se incubó en un shaker a T.A, 100 rpm por 72 h. Las células y el material insoluble fueron removidos por centrifugación a 12000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante libre de células fue usado como recurso de la enzima proteasa. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

2.3.7. Purificación de enzimas extracelulares por Cromatografía en HPLC de fase reversa.

Las muestras obtenidas previamente fueron re-suspendidas en tampón Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM, pH, 7.9 y luego centrifugadas a 6000 rpm. Posteriormente fue aplicado el

sobrenadante (200 μ L) en una columna μ -Bondapack C18 (0,78 X 30 cm) preparativa, previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0.1% pH 3.5 (Tampón A) acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa. El sistema cromatográfico usado fue HPLC-PDA 991 (waters), equipado con dos bombas (waters) modelo 510/B, un inyector automático de muestras U6K con un loop de 2,0 ml de capacidad. Inicialmente, la elución de la muestra se realizó a través de un gradiente lineal con Acetonitrilo 66% (Tampón B). Las fracciones fueron monitoriadas a 280 nm.

2.3.8. Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970).

Las placas de poliacrilamida fueron realizadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % se preparó utilizando un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida es fue elaborado utilizando un tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agregó SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La electroforesis PAGE-SDS se realizó en un sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Las muestras y los marcadores de masa molecular fueron disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). La corrida electroforética se realizó a 30 mA. Los geles fueron coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7%.

2.3.9. Determinación de Actividad Proteolítica con sustrato cromogénico BApNA.

La interacción específica con el sustrato (BApNA) ocurre por medio del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de la unión peptídica genera entre los productos de la reacción, la *p*-nitroanilina, de color amarillo, lo que permite acompañar espectrofotométricamente el andamiento de la reacción a través de la medición de la tasa de formación de este producto.

Con este objetivo, se midió el aumento de la absorbancia de la disolución a lo largo del tiempo, con la longitud de onda de la máxima absorción de la ρ -nitroanilina ($\lambda_{\text{max}} = 405$ nm, coeficiente de extinción molar, $\epsilon = 1.08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para diferentes concentraciones inicial de BApNA. La concentración del producto es obtenida por la aplicación de la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon/c$).

El sustrato sintético, ρ -nitroanilida, (DL-BApNA) es utilizado para el dosage de la muestra. Este sustrato es empleado para medir la actividad amidásica para enzimas proteolíticas tales como: tripsina, quimiotripsina, factor Xa, calicreína plasmática humana, trombina y plasmina humana. En este sustrato, péptidos derivados de la ρ -nitroanilida, han sido ampliamente utilizados principalmente por la alta sensibilidad fotométrica en la absorbancia de 405 nm de la ρ -nitroanilida liberada después de la hidrólisis enzimática, según el método de Erlanger, et al., (1961).

El sustrato cromogénico que se utilizó es BApNA (N α -BENZOIL-DL-ARGININA ρ -NITROANILIDA) en una solución 0,1 M para dosage de las fracciones (1 mg/ml.); se colocó 20 μl de la muestra en un medio de incubación que contenía 1000 μl de solución de sustrato previamente disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) como solución stock para ser utilizado en la proporción de 1/10 (10 μl) en tampón Tris-HCl, 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.8, más 250 μl de tampón para un volumen final de 1270 μl . Después de 30 minutos la reacción es bloqueada con ácido acético 30 % (500 μl). El monitoreamiento de la reacción fue realizado en la absorbancia de 405nm.

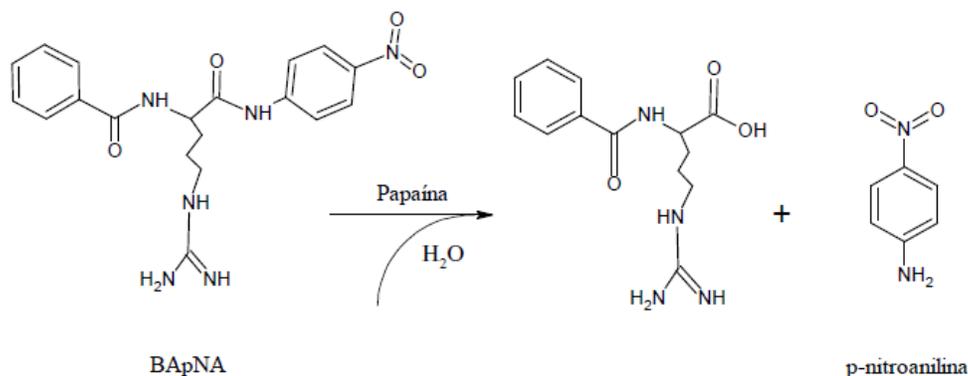


Figura N°3: Esquema de la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por papaína.

2.3.10. Caracterización de péptidos por Espectrometría de Masas en Tandem.

La espectrometría de masas en Tandem ESI-CID-MS/MS fue realizada usando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-time of flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado con una fuente de nano spray operando en modo de ionización positivo. Las condiciones de ionización fueron: voltaje capilar de 2.3 kV, un cono voltaje y lentes RF1 de 30 y 100 V, respectivamente y una energía de colisión de 10eV. La temperatura de la fuente fue de 70°C y el cono de gas fue N₂ a un flujo de 80 l/h, no fue utilizado gas nebulizador para obtener el spray. El gas argonio para la fragmentación de los iones. Fue realizada una calibración externa con yoduro sódico en una faja de masas de 50 a 3000 m/z. Todos los espectros fueron adquiridos con el analizador TOF en modo Vmode (TOF kV=9,1) y el voltaje MCP a 2150 V.

2.3.11. Secuenciamiento “*de novo*” de péptidos trípticos.

Los péptidos trípticos alquilados de las enzimas fueron separados en HPLC de fase reversa, colectados manualmente, liofilizados y re-suspendidos en 20% de acetonitrilo y 0,1% de TFA.

Cada péptido fue introducido por separado en la fuente del espectrómetro de masa con una jeringa a un flujo de 500 nl/min⁻¹. Antes de realizar los espectros de masa en tándem, fue adquirido un espectro MALDI (modo TOF/TOF), para cada pico obtenido del HPLC de fase reversa en la faja de 400-10000 m/z para seleccionar los iones de interés. Posteriormente estos iones fueron fragmentados en una célula de colisión (Modo TOF/TOF MS). Diferentes energías de colisión fueron utilizadas dependiendo del estado de carga y masa de los iones.

Los espectros resultantes fueron adquiridos en el analizador TOF y resueltos usando el software MassLynx-MaxEnt 3 algorithm. Los espectros con una carga sólo son procesados manualmente usando el aplicativo PepSeq incluido en el MassLynnx.

2.3.12. Estudio de homología secuencial.

Los estudios de homología secuencial fueron investigados utilizando varios bancos de datos disponibles en la red, tales como:

Medline/Entrez-PubMed1.htm

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ExPASy Molecular Biology Server:

<http://www.expasy.ch/>

EMBL Nucleotide Sequence Database:

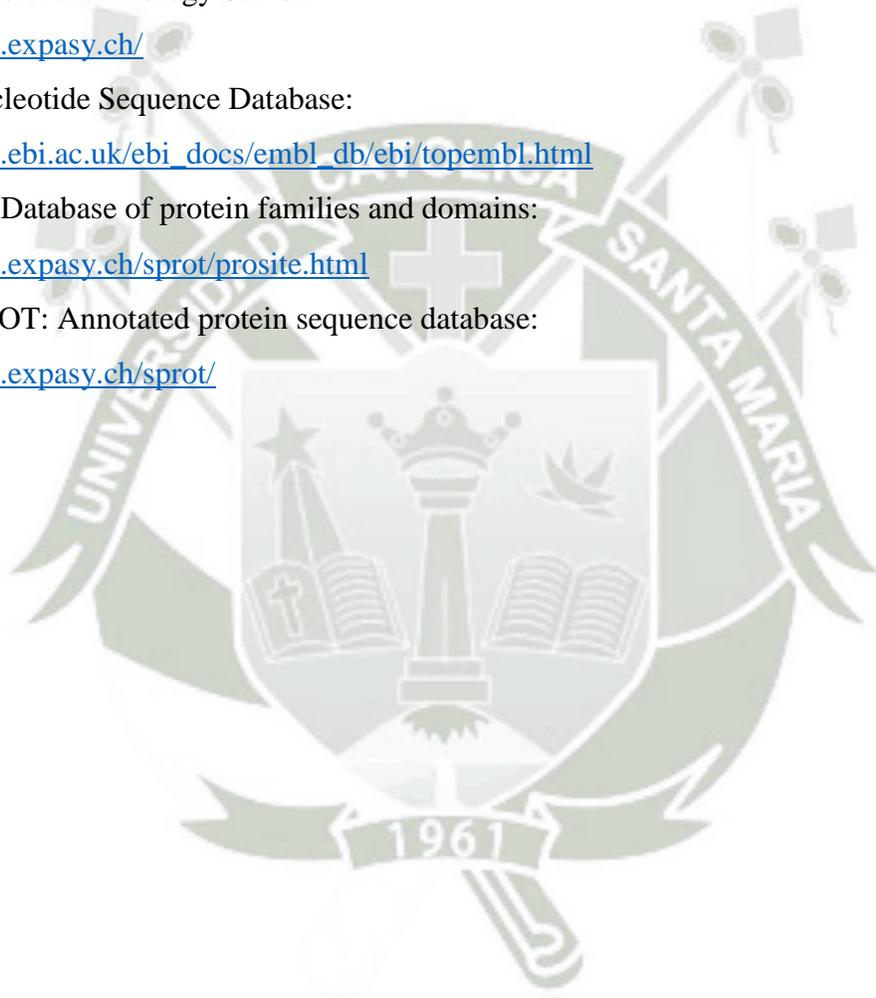
http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db/ebi/topembl.html

PROSITE: Database of protein families and domains:

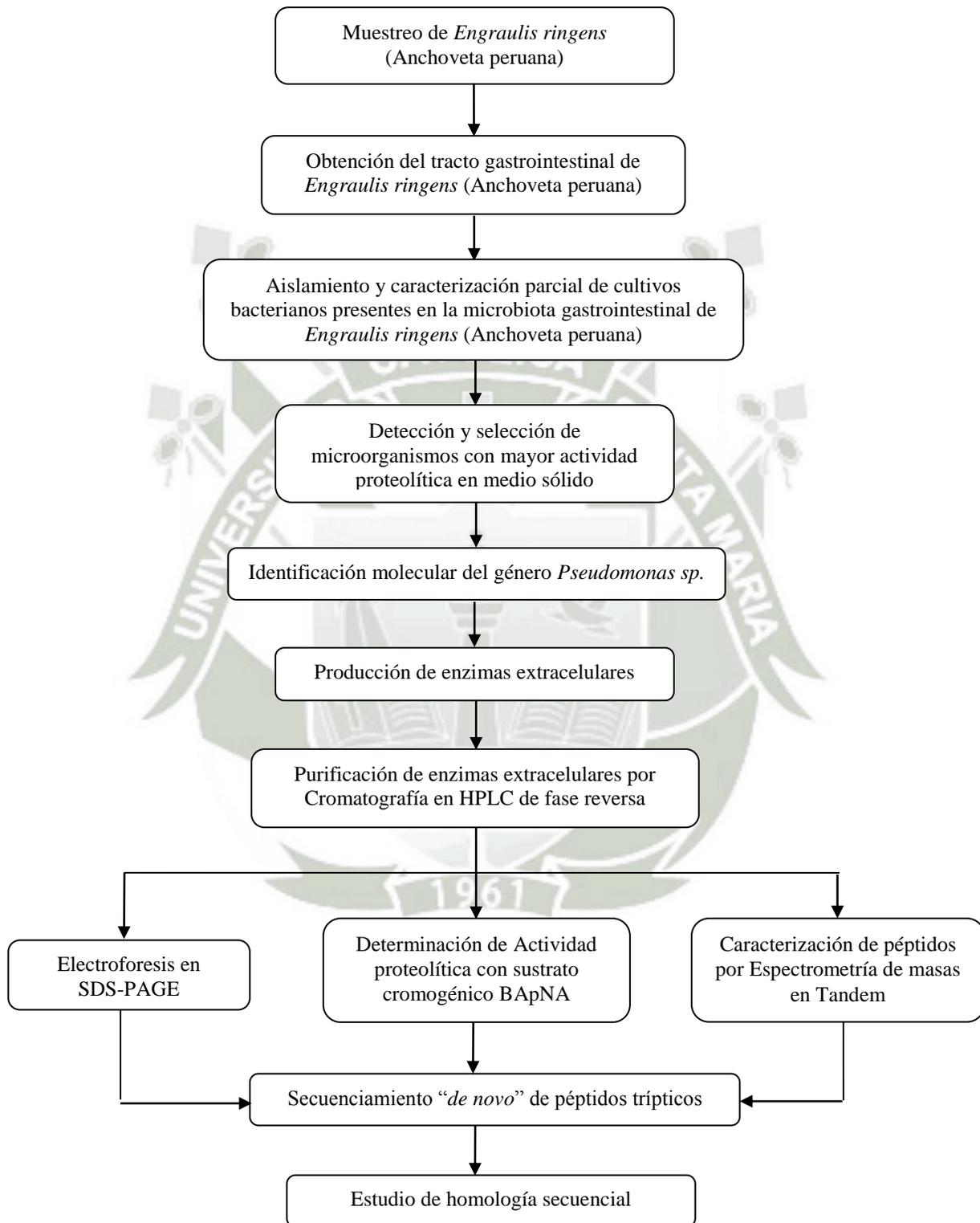
<http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html>

SWISS-PROT: Annotated protein sequence database:

<http://www.expasy.ch/sprot/>



2.4. Flujograma de Procesos:



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Preparación de la materia prima proveniente de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

En el Muestreo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana). Se colectaron un total de 30 individuos *Engraulis ringens*, con longitudes iguales o mayores a 12cm. los cuales fueron transportados con el cuidado respectivo al laboratorio; en laboratorio los individuos fueron limpiados y desinfectados.

3.2. Obtención del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

Se obtuvo un total de 30 sistemas de tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens*, los cuales fueron depositados sobre placas Petri estériles y limpias con S.S.E (solución salina estéril)



Figura N°4: Tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

3.3. Aislamiento y caracterización parcial de cultivos bacterianos presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

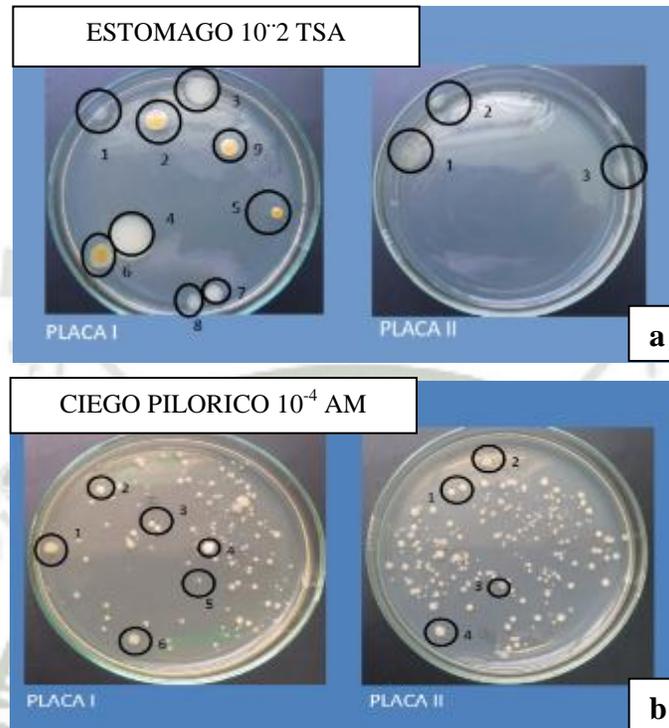


Figura N°5: Microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)
a) Bacterias provenientes del Estómago en medio TSA; **b)** Bacterias provenientes del Ciego Pilórico en medio AM.

Tabla N°5: Cepas puras aisladas del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

MUESTRAS	MEDIO DE CULTIVO	CEPAS PURAS
ESÓFAGO	TSA	5
	AGAR MARINO	0
ESTÓMAGO	TSA	7
	AGAR MARINO	3
CIEGOS PILÓRICOS	TSA	6
	AGAR MARINO	17

El total de cepas puras aisladas en medio TSA fueron 18 y en medio AM 20, las cuales se caracterizaron morfológicamente mediante tinciones.

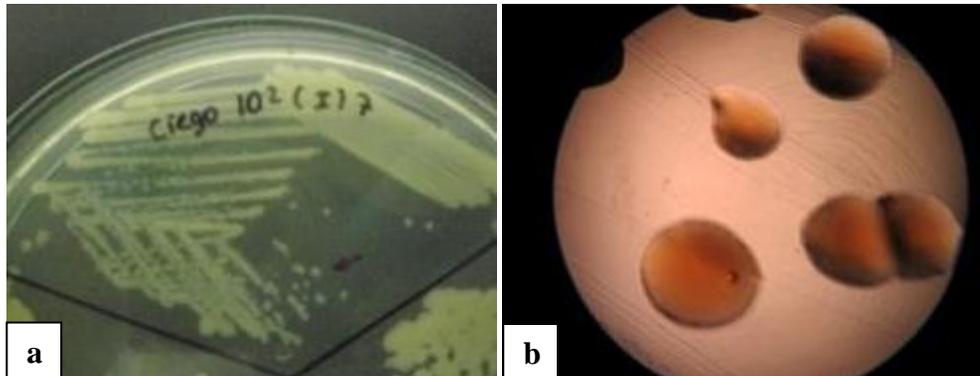


Figura N°6: Cepa pura aislada del ciego pilórico del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

a) Cepa en placa; b) Cepa observada al microscopio óptico usando aumento de 100X.

Las cepas aisladas puras, fueron caracterizadas a través de tinción Gram lo que permitió identificarlas entre Bacterias Gram-positivas y Gram- negativas; así como también la morfología de Coco o Bacilo.

Tabla N° 6: Tinción Gram de cepas puras aisladas de la microbiota de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

MUESTRAS	MEDIO DE CULTIVO	CEPAS PURAS	GRAM +	GRAM -	COCO	BACILO
ESÓFAGO	TSA	5	2	3	2	3
	AGAR MARINO	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	TSA	7	1	6	2	5
	AGAR MARINO	3	2	0	2	1
CIEGO PILÓRICO	TSA	6	1	5	1	5
	AGAR MARINO	17	8	9	11	6

Luego de realizar las tinciones Wirtz (esporas) y Maneval (cápsula), seleccionamos presuntivamente las cepas que podrían ser del género *Pseudomonas*, quedándonos así con 7 cepas.

3.4. Detección y selección de microorganismos con mayor Actividad Proteolítica en medio sólido.

Los microorganismos productores de proteasas en el medio Skim Milk, muestran una zona clara (formación de halo) alrededor de las colonias lo que indica que hubo degradación de la caseína.

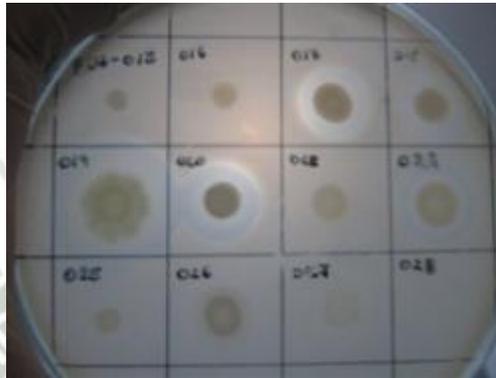


Figura N°7: Halos proteolíticos de las cepas seleccionadas según tinciones.

- Tomando en cuenta lo propuesto por *Sánchez. et al.* y según la medición de los halos proteolíticos, los resultados serían los siguientes:

Tabla N° 7: Evaluación de halos proteolíticos después de 96 horas.

CÓDIGO	HALO PROTEOLÍTICO
Esófago TSA 10 ² (I) 2	+
Esófago TSA 10 ⁴ (II) 1	++
Estómago TSA 10 ² (I) 4	+++
Estómago TSA 10 ² (II) 1	+
Ciego pilórico TSA 10 ² (I) 7	+
Ciego pilórico TSA 10 ² (II) 10	+++
Estómago AM 10 ⁴ (I)1	+

Se seleccionaron las cepas con mayor halo proteolítico, quedándonos con 3 cepas.

3.5. Identificación Molecular del Género *Pseudomonas* sp.

TGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGG
 AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC
 GCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG
 CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
 GTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTGTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACG
 GGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTT
 CGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTACCAGCACGT
 TATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATGATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCT
 AGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas sp. LS-515 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0	100%	KJ601750.1
Pseudomonas sp. LS-514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KJ601749.1
Pseudomonas sp. WCS374 genome	249500%	1497500%	100%	0%	100%	CP007638.1
Pseudomonas fluorescens strain LD161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KJ534494.1
Pseudomonas fluorescens strain PE25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KJ127244.1
Pseudomonas gessardii strain KMBMa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KF481916.1
Pseudomonas sp. J3.2C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KF317743.1
Pseudomonas sp. J3.2C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KF317741.1
Pseudomonas sp. J3.2C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KF317740.1
Pseudomonas gessardii strain SSB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	JX042465.1
Pseudomonas sp. Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KC898251.1
Pseudomonas gessardii strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249500%	249500%	100%	0%	100%	KC790322.1
Pseudomonas gessardii strain SN23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	249500%	100%	0%	100%	KC790316.1

Fuente: Macrogen

TTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGG
GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCT
GAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG
GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGA
TGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCT
TCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACG
TTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAG

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas sp. LS-515 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2499	2499	100%	0	100%	KJ601750.1
Pseudomonas sp. LS-514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KJ601749.1
Pseudomonas sp. WCS374 genome	249900%	1499700%	100%	0%	100%	CP007638.1
Pseudomonas fluorescens strain LD161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KJ534494.1
Pseudomonas fluorescens strain PE25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KJ127244.1
Pseudomonas gessardii strain KMBMa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KF481916.1
Pseudomonas sp. J3.2C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KF317743.1
Pseudomonas sp. J3.2C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KF317741.1
Pseudomonas sp. J3.2C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KF317740.1
Pseudomonas gessardii strain SSB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	JX042465.1
Pseudomonas sp. Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KC898251.1
Pseudomonas gessardii strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	249900%	249900%	100%	0%	100%	KC790322.1
Pseudomonas gessardii strain SN23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2499	249900%	100%	0%	100%	KC790316.1

Fuente: Macrogen

Luego de obtener los resultados secuenciación enviados por la empresa Macrogen - EE.UU., se obtuvo 2 cepas del género *Pseudomonas sp.*

3.6. Producción de enzimas extracelulares



Figura N° 8: Producción de proteasas extracelulares en medio suplementado.

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano. Estas bacterias al sintetizar las enzimas y metabolitos secundarios se adaptan según el tipo de sustrato o nutriente que se encuentra en el medio.

Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas y participan en variados procesos fisiológicos, al estar involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas desde su biosíntesis, control de destino y activación, hasta su degradación.

3.7. Purificación de Enzimas por Cromatografía en HPLC de fase reversa.

La figura 9 muestra el perfil cromatográfico procedente del esófago de *Engraulis ringens*, en el que se obtienen 9 picos comunes, seleccionándose el pico número 5 para los análisis posteriores en razón de mostrarse común en su expresión de los cromatogramas procedentes de estómago y ciego pilórico (figura 10 y 11).

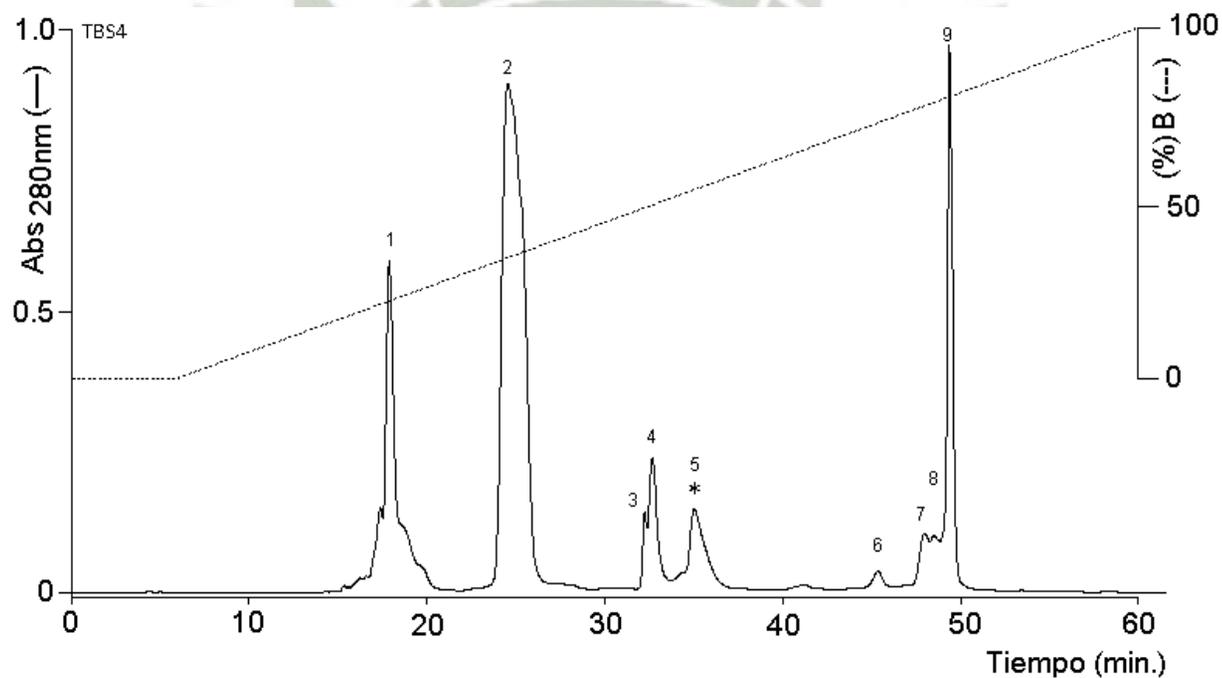


Figura N°9: Cromatografía del contenido gástrico a nivel del *esófago* de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.

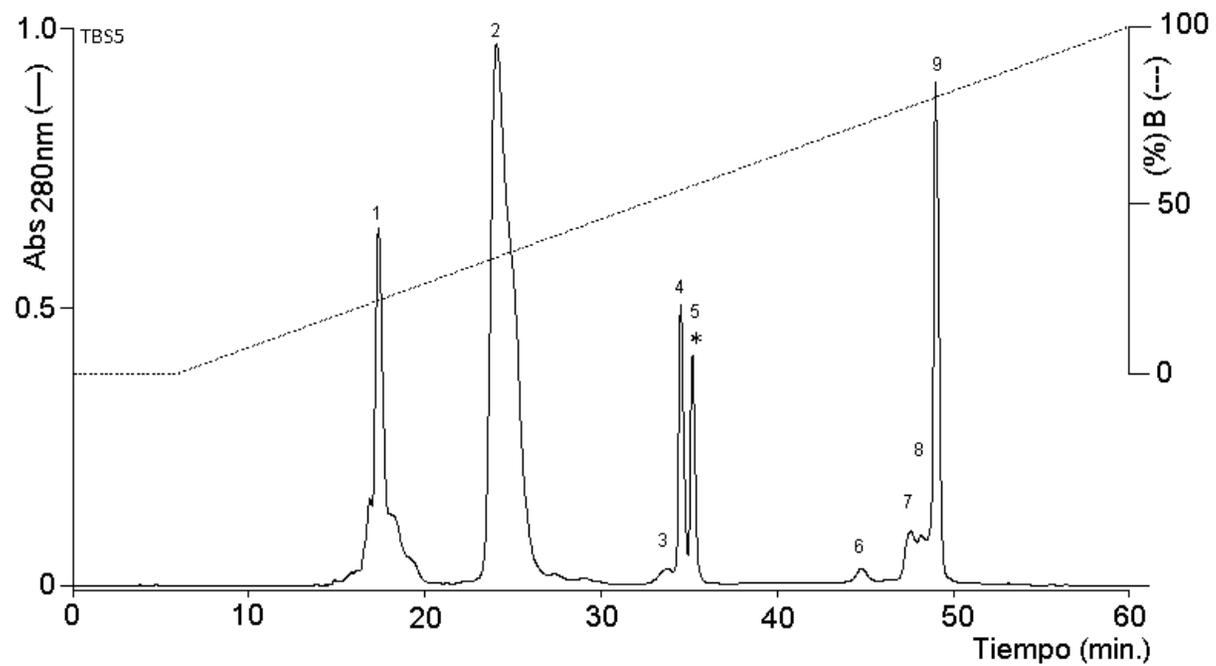


Figura N°10: Cromatografía del contenido gástrico a nivel del *estómago* de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.

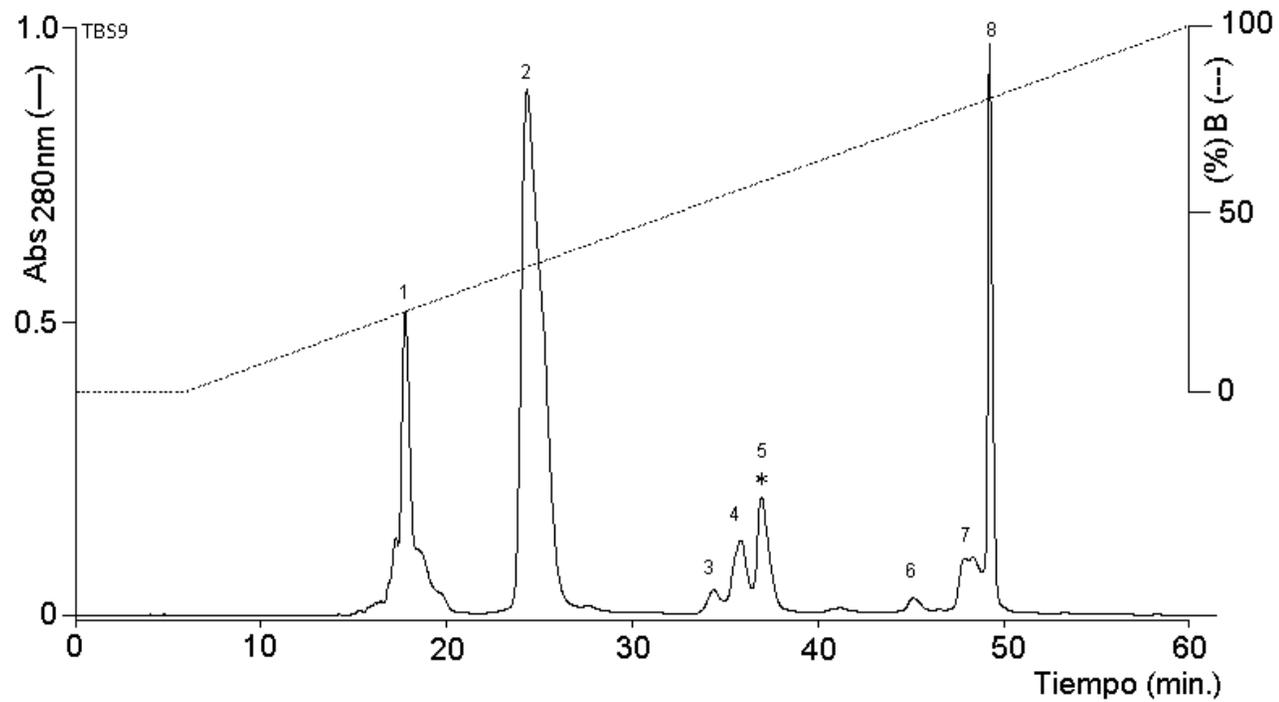


Figura N°11: Cromatografía del contenido gástrico a nivel del *ciego pilórico* de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), denominado 5 en HPLC-FR.

3.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

El perfil de masa molecular en SDS-PAGE, de la extracción de proteínas procedente de *Pseudomonas sp*, de las tres regiones en estudio: Esófago, estómago y ciego pilórico del tracto digestivo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), evidencian un grupo de proteínas en torno a los 20 kDa, para las tres regiones conforme se evidencia en la figura 12.

Este grupo de proteínas enmarcadas en el círculo rojo, fueron analizadas posteriormente, por espectrometría de masa, por ser constantes en su presencia.

Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

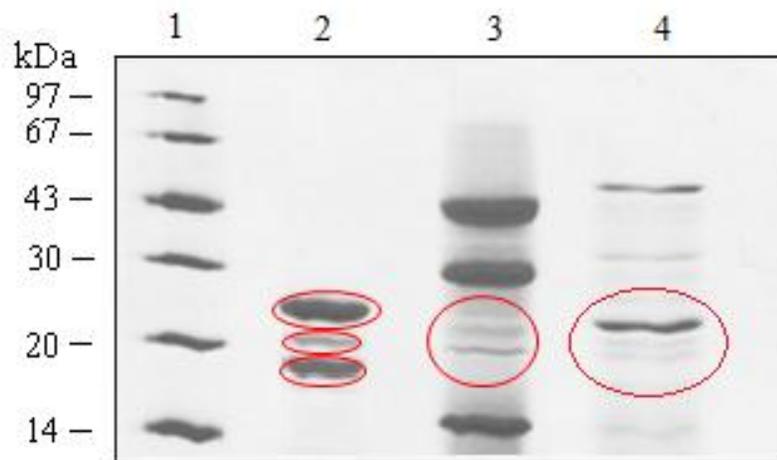


Figura N°12: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %) procedente de *Pseudomonas sp*, de las tres regiones en estudio: Esófago, estómago y ciego pilórico del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana). (1) Marcadores de masa molecular (kDa), (2) Muestra procedente de esófago, (3) de estómago y (4) de ciego pilórico.

3.9. Determinación de Actividad Proteolítica con sustrato cromogénico BApNA

Cuando fue determinada a actividad proteolítica sobre el sustrato cromogénico BApNA, encontramos registrada una actividad elevadamente marcada en los picos 4 y 5 para las muestras procedentes de los procesos de purificación de la regiones correspondientes a esófago, estómago y ciego pilórico.

Tabla N° 8: Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del esófago de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

Pico	TBS4 Actividad DL_ BAPNA
1	0.1308
2	0.1584
3	0.1885
4	0.7048
5	0.7055
6	0.1253
7	0.1365
8	0.1359
9	0.1679

Tabla N° 9: Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del estómago de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

Pico	TBS5 Actividad DL_ BAPNA
1	0.1436
2	0.1364
3	0.1297
4	0.6955
5	0.6993
6	0.1354
7	0.1234
8	0.1945
9	0.1346

Tabla N° 10: Actividad proteolítica sobre DL_ BAPNA, del área del ciego pilórico de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)

Pico	TBS9 Actividad DL_ BAPNA
1	0.1279
2	0.1356
3	0.1946
4	0.7058
5	0.6993
6	0.1398
7	0.1279
8	0.1168

3.10. Caracterización de Péptidos por Espectrometría de Masas en Tandem

Esta determinación analítica evidencia el alto grado de pureza de cada pico numerado como 5 procedente de diferentes áreas anatómicas del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), obtenidos a través de la purificación en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa. El pico proteico se muestra como siendo de una cadena polipeptídica.

Tabla N° 11: Secuenciamiento de péptidos y masa molecular

Muestra	Secuencia de Péptido	Molecular mass (Da)
TBS4-5	VPLTVCVDKVAASGGYMMACIGD	2299.76
TBS5-5	HHLELLSPARDVTIAREAILHGA	2518.88
TBS9-5	VLRLESGGMVHGYGLAASQL	2114.43

Las masas moleculares obtenidas por espectrometría de masa (MALDI TOF) revelan que la fracción 5 procedente de diferente área del tracto digestivo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), poseen una masa molecular con diferencias en masa. Así tenemos:

Pico 5, área de esófago: 23102.66 Da (Figura 13).

Pico 5, área de estómago: 22942.91 Da (Figura 14). y

Pico 5, área de ciego pilórico: 23101.18 Da (Figura 15).

Los picos menores en los espectros de masa (Figura 13, 14 y 15) representan la masa de la fracción en diferente tipo de ionización por acción del bombardeo láser con la respectiva pérdida y ganancia de masa, siendo el de mayor intensidad el correspondiente a la masa de la proteína en estudio. Esto confirma que los parámetros empleados en la determinación de tipo lineal fueron adecuadamente calibrados con el respectivo calmix 3 de acuerdo a la masa molecular.

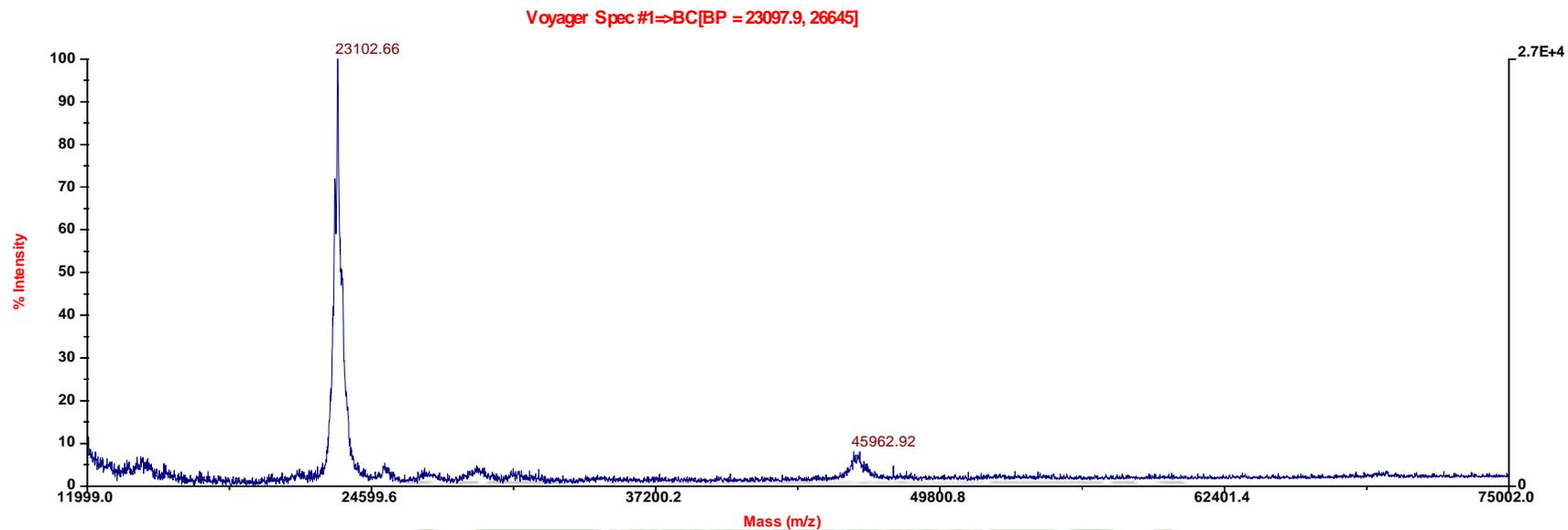


Figura N°13: Masa molecular del pico 5 procedente del área del esófago de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa

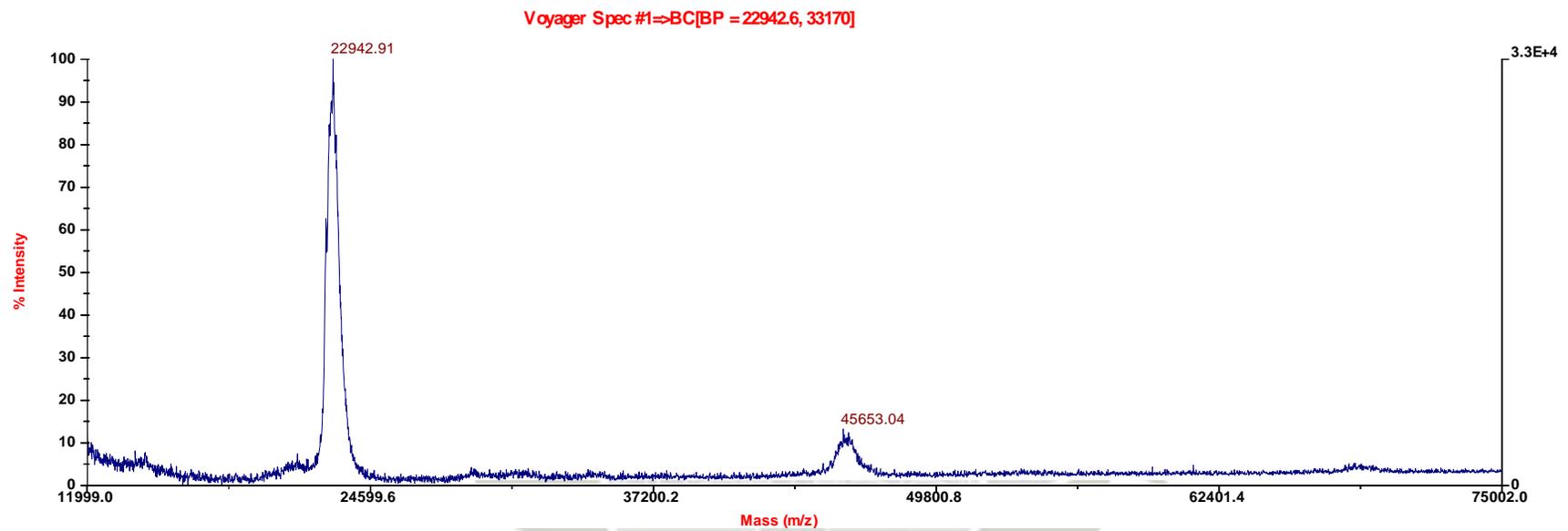


Figura N°14: Masa molecular del pico 5 procedente del área del estómago de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa.

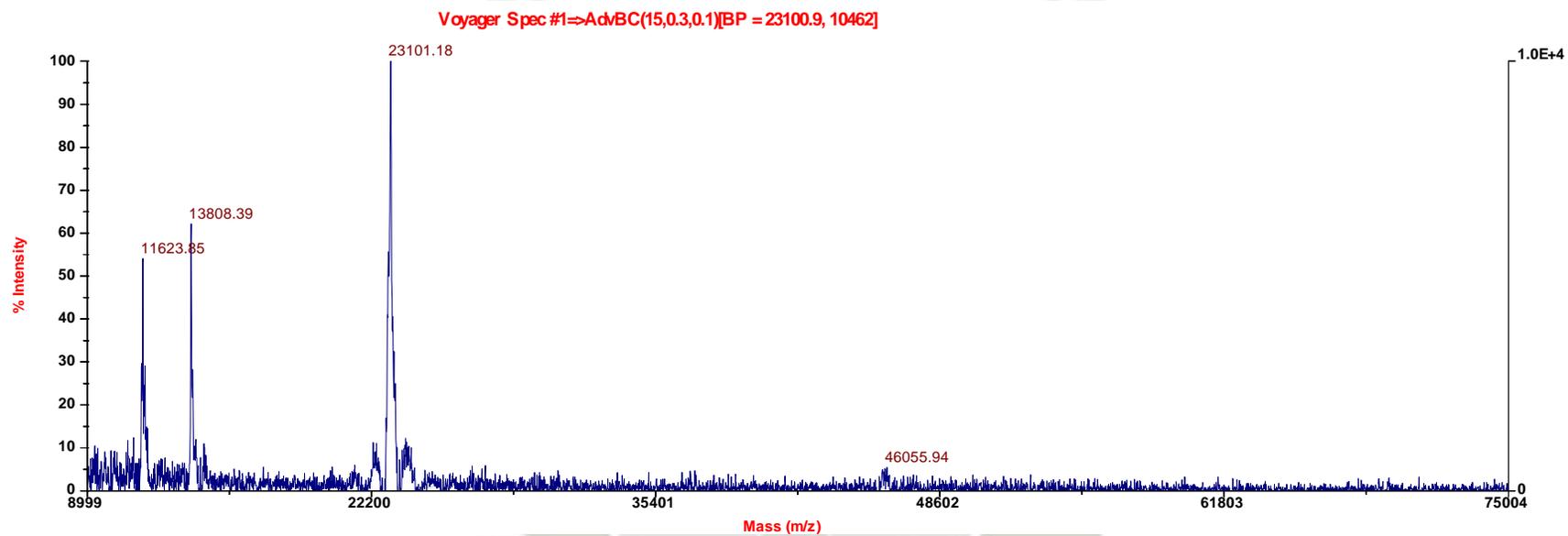


Figura N°15: Masa molecular del pico 5 procedente del área del ciego pilórico de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), analizada por Espectrometría de Masa.

3.11. Secuenciamiento “de novo” y estudio de la homología secuencial.

La Figura 16, 17 y 18 muestra la secuencia “de novo” de cada fracción 5 correspondiente a diferente área del tracto digestivo de *Engraulis ringens*, sometida a un análisis de homología secuencial, en la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasth_ome

Las fracciones 5 de las diferentes áreas del tracto digestivo, muestran homología en relación con otros.

La parte en recuadro representa la secuencia consenso entre las diferentes proteínas disponibles en la base de datos, indicando regiones conservadas con una alta homología secuencial.

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_242975	1	-----VPLTVCVDKVAASGGYMMACIGD-----	23
<input checked="" type="checkbox"/>	P0AG14	156	SQLQRLRDKNIP LTVTVDKVAAASGGYMMACVADKIVSAPFAIVGSI GVVAQMPNPNRFLKSKDIDIELHTAGQYKRTLTL	235
<input checked="" type="checkbox"/>	P45315	159	SQLSRLKQKGIK LTVAVDKVAAASGGYMMACVADKIVSAPFAVIGSI GVVAQIPNVHRLKKHVDVDMVTAGEFKRTVTV	238
<input checked="" type="checkbox"/>	Q44600	157	SQLSRLREKNI R LTVSVDKIAASGGYMMACVANYIIAAPFSVIGSI GVVAQIPNPNKLLKKNVDMELHTAGDYKRTLTV	236
<input checked="" type="checkbox"/>	P57370	145	SQI NRI RQKGI R LTVSVDKIAASGGYMMACVADYIVSAPFAITGSI GVVGQIPNPNKLLKKNIDFELHTAGDYKRTL TM	224
<input checked="" type="checkbox"/>	Q8K9P8	150	AQLERLRQNKI R L IISIDKIAASGGYMMACVADYIISAPFAIIGSI GVVGQIPNPNKLLKKNIDVELHTAGDYKRTL TM	229
<input checked="" type="checkbox"/>	Q89AL0	159	VQLQRLRSRKIF L TISIDKIATSGGYMMACVANYIIATPFSIIGSI GVVAQFPNIHKFLKKNIDVELHTAGVIKRTLTI	238

Figura N°16: Alineamiento del péptido 242975, aislado del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_38408	1	----HHLLELLSPARDVTIAREATLHGA-----	23
<input checked="" type="checkbox"/>	P76104	1	MTVSSHRELLSPARDAATAIAREATLHGADAVYIGGPGFGARHNASNSLKDIAELVPPFAHRYGAKIFVTLNLTILHDDLEP	80

Figura N°17: Alineamiento del péptido 38408, aislado del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_33374	1	-----VLRLESGGGMMIGYGLAA	18
<input checked="" type="checkbox"/>	P0AG14	79	HKQFAKAAKAKA--KIGEVATDSK-PRVWVDFKGSMDAHEVNSLREEITAVIAAFKPKQDQVLRLESPGGMMHGYGLAA	155
<input checked="" type="checkbox"/>	Q44600	79	KKTRSKINMTFL--KKNKYLLNQNPILYVLDKGNVSAEVTSLREEISAITLAAKENEVLLRLESGGGVIHGYGLAS	156
<input checked="" type="checkbox"/>	P57370	79	NK-----KELL-----LKNK-KKLFVLDKGDVYANEVWGLREEISAILLVANKHDEVLLRLESGGGVIHGYGLAA	144
<input checked="" type="checkbox"/>	Q8K9P8	78	DKEFEKKNKNNI-----VTLKK-KTLFVLDKGGIHAHEVIGLREEISAILLVANKHDEVLLRLESGGGVIHGYGLAA	149
<input checked="" type="checkbox"/>	Q89AL0	79	KRSTLLTNNKLiDKDHNIIVVRAqPTLYVDFKGGIAAEVKSLEEEISSIISVAQKHDEVLLRLESGGGTIHGYGLAA	158
<input checked="" type="checkbox"/>	P45315	81	EKQNAKKRKEKL--KKGETLEDEKkACVYVDFCGDISASETTALREEISAILLVAKSEDEVLLRLESPGGIIVNYGFAA	158
<input checked="" type="checkbox"/>	Query_33374	19	SQL-----	21
<input checked="" type="checkbox"/>	P0AG14	156	SQLQRLRDKNIPLTVTVDKVAASGGYMMACVADKIVSAPFAIVGSIQVVAQMPNFNRFLKSKDIDIELHTAGQYKRTLTL	235
<input checked="" type="checkbox"/>	Q44600	157	SQLSRIREFKNIRLTVSVDKIAASGGYMMACVANYIIAAPFSVIGSIVGVAQIPNFNKILKKNVIMFELHISGLYKRTLIV	236
<input checked="" type="checkbox"/>	P57370	145	SQLNRLRQKGIKIRLIVSVDKIAASGGYMMACVADYIVSAPFAIIGSIVGVAQIPNFNKLLKKNIDFELHTAGDYKRTLTM	224
<input checked="" type="checkbox"/>	Q8K9P8	150	AQLERLRQNKIRLIIISIDKIAASGGYMMACVADYIISAPFAIIGSIVGVAQIPNFNKLLKKNIDVELHTAGDYKRTLTM	229
<input checked="" type="checkbox"/>	Q89AL0	159	VQLQRLRSRKIFLTIISIDKIATSGGYMMACVANYIIATPFSIIGSIVGVAQIPNIHKFLKKNIDVELHTAGVHKRTLTI	238
<input checked="" type="checkbox"/>	P45315	159	SQLSRLKQKGIKLVAVDKVAASGGYMMACVADKIVSAPFAIVGSIQVVAQIPNMIIRLLKKHIDVDVDMTAGEFKRTVTV	238

Figura N°18: Alineamiento del péptido 33374, aislado del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).

El resultado de homología secuencial de cada péptido obtenido por digestión trípica como fragmentos en un rango m/z de masas que van desde 1254.47 – 2956.28 Da (Figuras 16, 17 y 18), respectivamente, al alinearse con otras secuencias de especies de proteasas de bacterias utilizando la base BLAST (NCBI BLAST de proteínas 2015), muestran una alta similitud en regiones conservadas de tripsinas de bacterias, con énfasis en Gammaproteobacterias. Este resultado confirma que las proteasas purificadas son tripsinas, cuando son comparadas con las reportadas según su código de acceso a data protein bank.

Las Gammaproteobacteria (también Gamma Proteobacteria o γ -bacteria) son una clase de bacterias que incluye diversas especies de importancia médica, ecológica y científica, como las enterobacterias (*Escherichia coli*), *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Klebsiella pneumoniae* (neumonía).

Igual que todas las proteobacterias, las Gammaproteobacteria son Gram negativas.

A esta clase pertenece gran cantidad de patógenos importantes, tales como *Salmonella* (enteritis y fiebre tifoidea), *Yersinia* (peste), *Vibrio* (cólera), *Pseudomonas aeruginosa* (infecciones intrahospitalarias o en pacientes con fibrosis quística).

Este filo de bacterias comprende a organismos muy diversos con rutas metabólicas muy variadas, como las rutas fotosintéticas con liberación de azufre, la respiración de nitratos, o el uso de metano como fuente de alimento entre muchas otras más. Bacterias de este grupo utilizan el ácido sulfhídrico de las fuentes termales que están a temperaturas de más de 100 grados en los fondos abisales, y lo transforman en ácido sulfúrico, obteniendo así la energía para vivir sosteniendo el único ecosistema con animales que no depende de la luz del sol. En este grupo se ubican la mayor parte de las bacterias patógenas, como las causantes de la salmonelosis, fiebre tifoidea, la peste o el cólera, además de otras muchas bacterias que viven en el interior de organismos, como nuestro intestino, y que se necesitan para vivir.

El bacterioplancton tiene un papel significativo como principal contribuyente en los procesos biogeoquímicos de los ambientes marinos y estuariales, y representa un componente fundamental en las cadenas alimentarias microbianas (42). En los últimos años, el concepto de la cadena trófica clásica ha cambiado a un modelo alternativo más complejo denominado microbial loop o “bucle microbiano” (5), basado en la capacidad de las bacterias heterótrofas de reciclar la materia orgánica disuelta y de hacerla circular mediante diversas interacciones ecológicas a través de los otros componentes del plancton y, en forma indirecta, también a través de los niveles tróficos superiores del ecosistema marino. En los océanos, los microorganismos son los responsables del 98% de la producción primaria e intervienen en todos los ciclos de la materia (46), con un papel fundamental, a su vez, en el destino de los contaminantes en zonas altamente antropizadas. Siguiendo el esquema trófico tradicional, el plancton es utilizado como alimento por los organismos de niveles tróficos más elevados (13). En consecuencia, la dinámica de los componentes del plancton podría explicar algunas pautas de comportamiento y distribución de organismos de niveles tróficos superiores, como por ejemplo, las variaciones espacio-temporales observadas en ciertas poblaciones de peces y sus larvas (32). El conocimiento de la estructura de la comunidad microbiana, que incluye la diversidad y la abundancia total y relativa, y de su relación con los factores ambientales es de gran importancia para comprender el papel de las bacterias en los ciclos biogeoquímicos y detectar posibles patrones predecibles, ya que esto permitiría un manejo más efectivo de los ecosistemas marinos (14).

Los estudios moleculares que comparan secuencias génicas de microorganismos han demostrado una gran diversidad bacteriana, al menos 100 veces mayor que las estimaciones basadas en técnicas dependientes del cultivo (38). Dentro de las técnicas moleculares utilizadas, las de fingerprinting como T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) y DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permiten analizar la dinámica de la estructura de las comunidades en muestras ambientales (20).

En los últimos años se han incorporado técnicas a gran escala como las metagenómicas, basadas en el análisis de fragmentos genómicos de microorganismos del ambiente (49), y dentro de ellas, el uso de metodologías alternativas de secuenciación, como la pirosecuenciación (tecnología 454, Roche), para el estudio más detallado de la diversidad de comunidades microbianas naturales (28). Mediante estas técnicas se obtienen secuencias génicas que proveen una base para la estimación de la diversidad filogenética y generan “inventarios taxonómicos” de las poblaciones microbianas marinas (15).

En trabajos anteriores se realizaron estudios de la riqueza del bacterioplancton a través de comparaciones del ARNr, y se encontraron desde unos pocos cientos de filotipos por ml en la columna de agua (43) (49), hasta 3 000 en sedimentos marinos (24).

El método de pirosecuenciación ribosomal basado en la secuenciación y el análisis de cientos de tags (pequeños fragmentos de alrededor de 100 pb de los genes 16S ARNr) brinda una información muy detallada de la diversidad de las comunidades, ya que permite detectar y cuantificar tanto los miembros más abundantes de la comunidad como aquellos componentes minoritarios, que son escasamente recuperados por cultivos tradicionales o clonación y secuenciación (9). Esta gran diversidad de microorganismos raros, también llamada “biosfera rara” (47), puede tener un papel importante en el ambiente acuático al constituir un “banco de reserva”, con el potencial de volverse dominantes en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, como por ejemplo, en la temperatura y la salinidad (39).

Debido a la escasa información existente acerca de la composición de proteasas expresas por las gammaproteobacterias presentes en el tracto digestivo de *Engraulis ringens*, (Anchoveta peruana), el presente trabajo ha concentrado sus esfuerzos en incrementar la eficiencia de los estudios de expresión de proteasas microbianas basados en una plataforma de aproximación proteómica revelando valiosas informaciones. Esta estrategia de identificación de proteasas expresas fue utilizada con la finalidad de caracterizar la diversidad no solo de proteasas, sino de bacterias y arqueas en dos zonas del litoral peruano.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

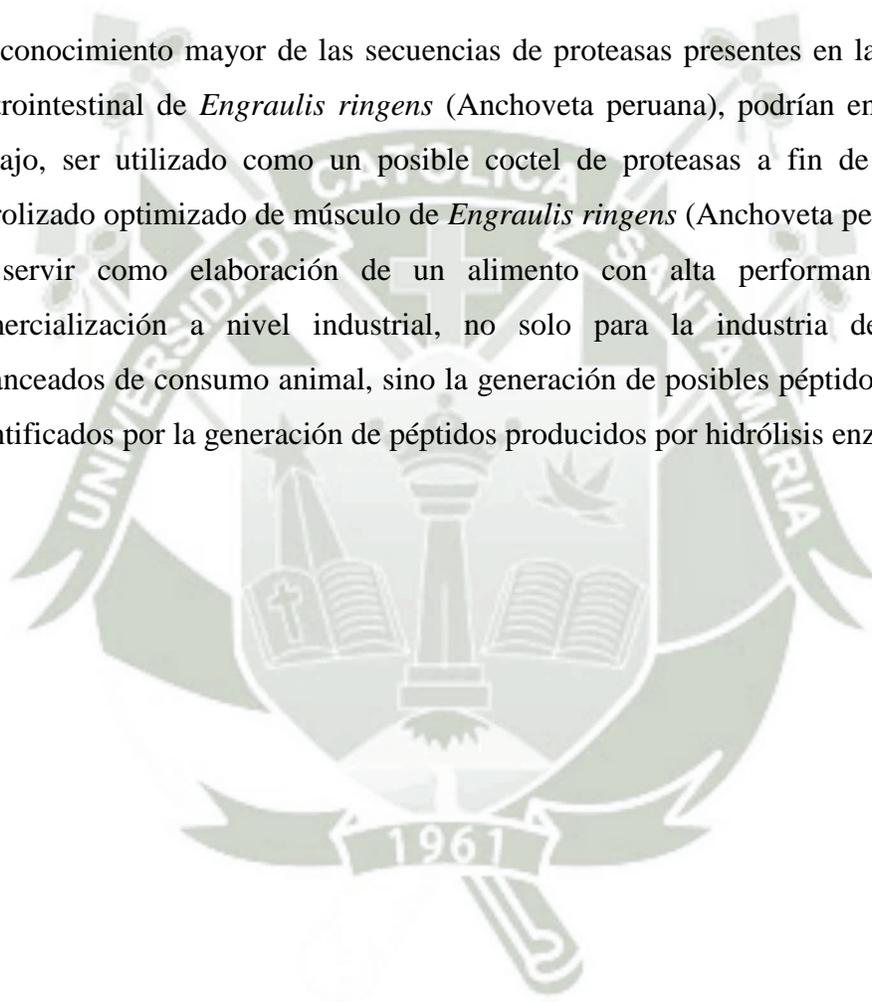
1. Fueron caracterizadas estructuralmente enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), a través de una plataforma de aproximación proteómica funcional.
2. Se aislaron y caracterizaron *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana).
3. Fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente enzimas proteolíticas extracelulares de *Pseudomonas sp.* presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), siendo caracterizadas estructuralmente 3 proteasas, a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en una columna de fase reversa. Estas proteasas fueron denominadas de la siguiente manera:
 - 3.1 Procedente de esófago: pico 5 del cromatograma, con una masa de 23102.66 Da determinada por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF).
 - 3.2 Procedente de estómago: pico 5 del cromatograma, con una masa de 22942.91 Da determinada por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF).
 - 3.3 Procedente de ciego pilórico: pico 5 del cromatograma, con una masa de 23101.18 Da determinada por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF).
4. A través de estudios de homología secuencial, utilizando la base de datos dispuesta en la red (BLAST) y con la ayuda del software DNA Star Ver 5.0, se llevó a cabo un análisis bioinformático, a través de estudios de homología secuencial realizando un análisis de secuencia “*de novo*” de un péptido tróptico correspondiente al pico 5 del tracto gastrointestinal de *Engraulis ringens*, (esófago, estómago y ciego pilórico), en la base de datos SWISS-PROT: *Annotated protein sequence database*, revelando un

alto grado de homología con otras proteasas procedentes de gammaproteobacterias presentes en el ambiente marino, tal como se reporta de acuerdo los códigos de acceso.



SUGERENCIAS

1. El presente estudio podría ser ampliado en el sentido de realizar una mayor caracterización estructural de las proteasas a través de un gel de electroforesis bidimensional (2D), con el objetivo de encontrar un mayor número de proteasas expresas en condición de isoformas, cuyas secuencias revelarían su aporte desde el punto de vista estructura-función.
2. Un conocimiento mayor de las secuencias de proteasas presentes en la microbiota gastrointestinal de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), podrían en un ulterior trabajo, ser utilizado como un posible coctel de proteasas a fin de general un hidrolizado optimizado de músculo de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana), a fin de servir como elaboración de un alimento con alta performance para su comercialización a nivel industrial, no solo para la industria de alimentos balanceados de consumo animal, sino la generación de posibles péptidos bioactivos identificados por la generación de péptidos producidos por hidrólisis enzimática.



CAPÍTULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas Akhavan Sepahy and Leila Jabalameli. 2011. Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus* sp. Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Research* 219628, 7.
2. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
3. Agüero M, Claverí M. 2007. Capacidad de pesca y manejo pesquero en América: una síntesis de casos. *FAO Documento Técnico de Pesca*. N°461:61-71.
4. Aminoácidos. Estructura de las proteínas: niveles de organización.
5. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 1983; 10: 257-3.
6. Bakun A, Weeks S. 2008. The marine ecosystem off Peru: What are the secrets of its fishery productivity and what might its future hold?. *Progress in Oceanography* 79: 290– 299.
7. Belén C.D; Moreno A.M; Medina C. y Sidovorras A. Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez Caribe Colorado (*Pygocentrus cariba* Humbolt, 1821). *Reladyc, Asociacion INTERCIENCIA*, Vol. 32, núm. 3, Marzo 2007 pp.188-194; 189.
8. Boyer, R., 2000, “Conceptos en Bioquímica”, International Thomson Editores, México, pp 141-168.

9. Brown MV, Philip GK, Bunge JA, Smith MC, Bissett A, Lauro FM, et al. Microbial community structure in the North Pacific Ocean. *Int Soc Microb Ecol* 2009; 3: 1374-86.
10. Cornelis P (editor). (2008). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology* (1st ed. edición). Caister Academic Press.
11. De Hoffmann, E; Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Third Edition. Jhon Wiley & Sons, Ltd. 2004.
12. Esquivel E. y Leal L., Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, “Cromatografía de Fase Reversa”, Cuernavaca-Morelos, 2004
13. Fenchel T. Marine plankton food chains. *Annu Rev Ecol System* 1988; 19: 19-38.
14. Fenchel T. The microbial loop-25 years later. *J Exp Mar Biol Ecol* 2008; 366: 99-103.
15. Giovannoni SJ, Sting U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 2005; 437: 343-8.
16. González, J., 2004, “Tema 11: Enzimas”, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, España.
17. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimesnsional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.
18. Graves P.R., Haystead T.A. Molecular biologis’t guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev Mar*; 66(1) 2002.pp. 39-63.

19. Gysi SP, Corthals GL, Zhang Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;97(17):9390-5.
20. Hewson I, Fuhrman JA. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3425-33.
21. IMARPE: Instituto del mar del Perú; Marzo 2015
Bouchon M., Ayón P., Moril J, Peñal C., Espinoza P., Hutchings L., Buitron B., Pereal A., Goicochea C., Messié M. Biología de la anchoveta peruana, *Engraulis ringens* Jenyns, *Bol. Inst. Mar Perú*, 25/Nos. 1 y 2/ Enero-Diciembre 2010.
22. Issaq HJ, Conrads TP, Janini GM, Veenstra TD. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis*. 2002;23(17):3048-61.
23. Joo, Han-Seung and Jang Won Choi. 2012. Purification and Characterization of a Novel Alkaline Protease from *Bacillus horikoshii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(1), 58–68.
24. Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microb Ecol* 2004; 47: 161-77.
25. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.*102:1317-27.
26. Koster M, Bitter W, y Tommassen J, 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290:325.

27. Krieg, Noel (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1*. Baltimore: Williams & Wilkins.

28. Kysela DL, Palacios C, Sogin ML. Serial Analysis of V6 Serial Analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6): A method for efficient, high-throughput analysis of microbial community composition. *Environ Microbiol* 2005; 7: 356-64.

29. Lubec G, Krapfenbauer K, Fountoulakis M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2003;69(3):193-211.

30. Madigan M; Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed. edición). Prentice Hall

31. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of protein and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437-73.

32. Marrari M, Viñas MD, Martos P, Hernández D. Spatial patterns of mesozooplankton distribution in the Southwestern Atlantic Ocean (34°-41°S) during austral spring: relationship with the hydrographic conditions. *ICES J Mar Scien* 2004; 61: 667-79.

33. Martínez-Solano, L., Nombela, C., Molero, G., Gil, C., 2006. *Proteomics* 6:S133-S144

34. Mc Cormack, L., 2007, “La Química en las ciencias de la Salud”, Universidad nacional del Comahue, Argentina.

35. Merino J. y Noriega M., “Fisiología general” Universidad de Cantabria.

36. Munk P, Hansen BW, Nielsen TG, Thomsen HA. Changes in plankton and fish larvae communities across hydrographic fronts off West Greenland. *J Plankton Res* 2003; 25: 815-30.
37. Nixon S, Thomas A. 2001. On the size of the Peru upwelling ecosystem. *Deep-Sea Research I* 48: 2521 – 2528.
38. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 1997; 274: 734-40.
39. Pedrós-Alió C. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* 2006; 14: 257-63.
40. Ray AK., GhoshK., Ringo E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture nutrition* in press.
41. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36 (3):333–340
42. Schauer M, Balagué V, Pedros-Alio C, Massana R. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat Microb Ecol* 2003; 31: 163-74.
43. Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 2005;71: 1501-6.
44. Seyed Mohsen Abbasi-Hosseini, Fereshteh Eftekhari, Bagher Yakhchali, Dariush Minai-Tehrani. 2011. Cloning and enhanced expression of an extracellular alkaline

- protease from a soil isolate of *Bacillus clausii* in *Bacillus subtilis*. *Iranian Journal of Biotechnology* 9,4.
45. Simpson DC, Smith RD. Combining capillary electrophoresis. 2005;26(7-8):1291-305.
 46. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 12115-20.
 47. Stein Ivar Aspmoa, Svein Jarle Horna, Vincent G. H. Eijsink. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry* 40: 1957–1966.
 48. Universidad Nacional de Colombia. Dirección Nacional de innovación Académica. *Biología virtual*.
 49. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. environmental genome shotgun sequence Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004; 304: 66-74.
 50. Westermeier R, Naven T. *Proteomics in Practice*. WILEY-VCH, Weinheim, Germany. 2002.
 51. Younes Ghasemia, Sara Rsoul-Aminib, Alireza Ebrahiminezhada, Aboozar Kazemia, Maryam Shahbazia, Najme Talebniaa. 2011. Screening and Isolation of Extracellular Protease Producing Bacteria from the Maharloo Salt Lake. *IJPS Summer* 2011; 7(3): 175-180.

CAPITULO VI ANEXOS

ANEXO 1: MUESTREO DE *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana)



Figura N°19: Desembarque de la carga *Engraulis ringens* (Anchoveta Peruana).

a) Embarcación pesquera (Bolichera) Santa. b) Desembarque de *Engraulis ringens* en el muelle CRIANI.



Figura N°20: *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) listas para ser transportadas

ANEXO 2: COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS.

TABLA N° 12: Composición del medio TSA (Agar Tripticasa Soya)

FORMULA DEL MEDIO TSA	Componentes (g/L)
Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro Sódico	5.0
Agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

TABLA N° 13: Composición del medio AM (Agar Marino)

FORMULA DEL MEDIO AM	Componentes (g/L)
Ácido Bórico	0.022
Calcio Cloruro	1.8
Extracto de Levadura	1.0
Magnesio Cloruro	8.8
Potasio Bromuro	0.08
Sodio Cloruro	19.4
Sodio Hidrógeno Carbonato	0.16
Sodio Silicato	0.004
Agar	15.0
Amonio Nitrato	0.0016
Estroncio Cloruro	0.034
Hierro Citrato	0.1
Peptona	5.0
Potasio Cloruro	0.55
Sodio Fluoruro	0.0024
Di-Sodio Hidrógeno Fosfato	0.008
Sodio Sulfato	3.24
pH final: 7.3 ± 0.2	

ANEXO 3: CARACTERIZACION PARCIAL DE CULTIVOS BACTERIANOS DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DE *Engraulis ringens* (ANCHOVETA PERUANA).

Tabla N° 14: Selección de cepas mediante tinciones Wirtz y Maneval.

Órgano	Medio	Dilución	Placa	Aislado	Gram	Forma	Wirtz	Maneval
Esófago	TSA	10 ²	I	1	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Esófago	TSA	10 ²	I	2	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Esófago	TSA	10 ⁵	I	1	+	Coco		
Esófago	TSA	10 ²	II	3	+	Coco		
Esófago	TSA	10 ⁴	II	1	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Estómago	Agar Marino	10 ⁴	I	2	+	Coco		
Estómago	Agar Marino	10 ⁴	I	1	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Estómago	Agar Marino	10 ⁴	II	2	+	Coco		
Estómago	TSA	10 ²	I	3	-	Coco		
Estómago	TSA	10 ²	I	4	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Estómago	TSA	10 ²	I	7	+	Bacilo		
Estómago	TSA	10 ²	I	5	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Estómago	TSA	10 ²	I	9	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Estómago	TSA	10 ²	II	1	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Estómago	TSA	10 ³	II	2	-	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	1	-	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	3	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	4	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	6	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	7	-	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ²	I	9	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ³	I	1	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ³	I	2	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ³	I	3	+	Coco		

Órgano	Medio	Dilución	Placa	Aislado	Gram	Forma	Wirtz	Maneval
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁴	I	2	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁴	I	3	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁴	I	5	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ³	II	2	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁴	II	1	-	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁶	II	1	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁶	II	4	+	Coco		
Ciego Pilórico	Agar Marino	10 ⁶	II	5	+	Coco		
Ciego Pilórico	TSA	10 ²	I	7	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	TSA	10 ³	I	1	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	TSA	10 ⁴	I	1	+	Bacilo		
Ciego Pilórico	TSA	10 ²	II	8	-	Coco		
Ciego Pilórico	TSA	10 ²	II	10	-	Bacilo	No esporulado	Encapsulado
Ciego Pilórico	TSA	10 ⁴	II	3	-	Bacilo	Esporulado	Encapsulado



ANEXO 4: HALOS PROTEOLITICOS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS SEGÚN TINCIONES

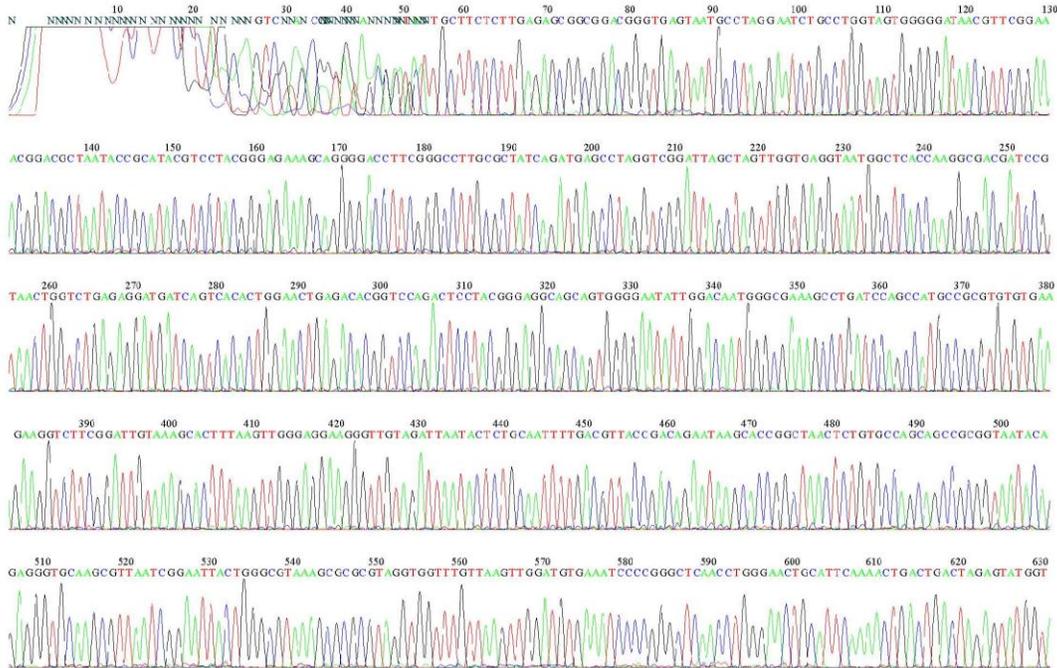
Tabla N° 15: Medición de halos a distintas horas.

CÓDIGO	HALO A DISTINTAS HORAS				HALO SEGÚN Sánchez et al, 2004
	24hr.	48hr.	72hr.	96hr.	
Esófago TSA 10 ² (I) 2	1 mm	3 mm	6 mm	8 mm	+
Esófago TSA 10 ⁴ (II) 1	2 mm	6 mm	10 mm	13 mm	++
Estómago TSA 10 ² (I) 4	3 mm	7 mm	14 mm	18 mm	+++
Estómago TSA 10 ² (II) 1	1 mm	4 mm	7 mm	9 mm	+
Ciego pilórico TSA 10 ² (I) 7	2 mm	5 mm	7 mm	10 mm	+
Ciego pilórico TSA 10 ² (II) 10	4 mm	9 mm	16 mm	20 mm	+++
Estómago AM 10 ⁴ (I)1	1 mm	3 mm	5 mm	7 mm	+

ANEXO 5: SECUENCIAMIENTO MACROGEN DE LAS CEPAS CON MAYOR ACTIVIDAD PROTEOLITICA

File: C_27F.ab1 Run Ended: 2014/11/4 19:11:49 Signal G:1021 A:104S C:825 T:834
Sample: C_27F Lane: 21 Base spacing: 14.291061 1283 bases in 16299 scans Page 1 of 2

MACROGEN
Advancing through Genomics



File: C_27F.ab1 Run Ended: 2014/11/4 19:11:49 Signal G:1021 A:104S C:825 T:834
Sample: C_27F Lane: 21 Base spacing: 14.291061 1283 bases in 16299 scans Page 2 of 2

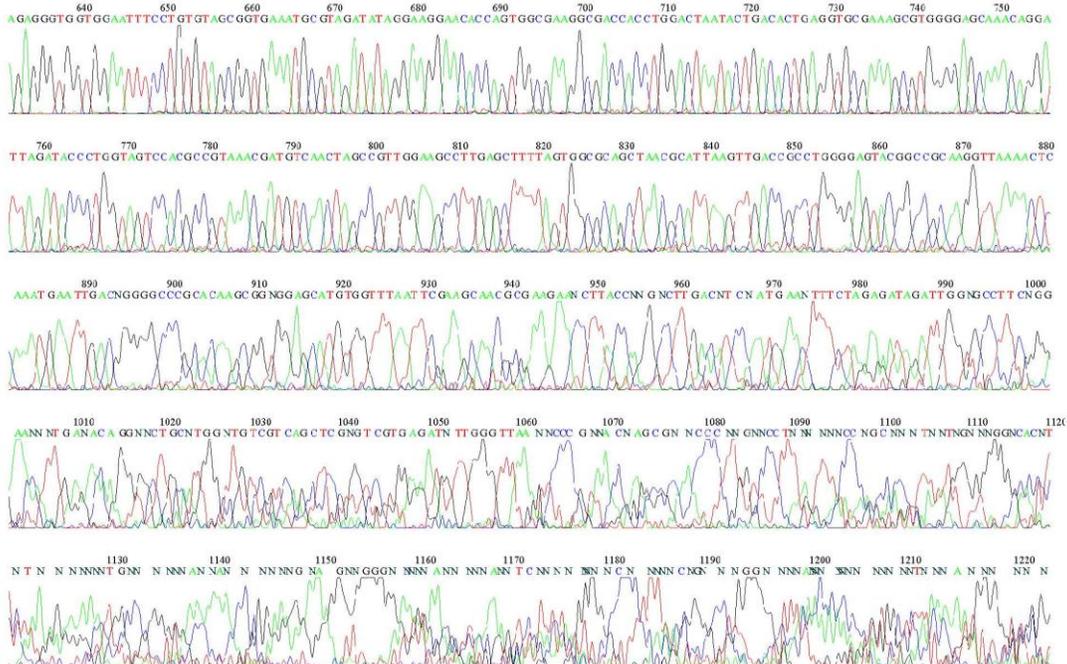
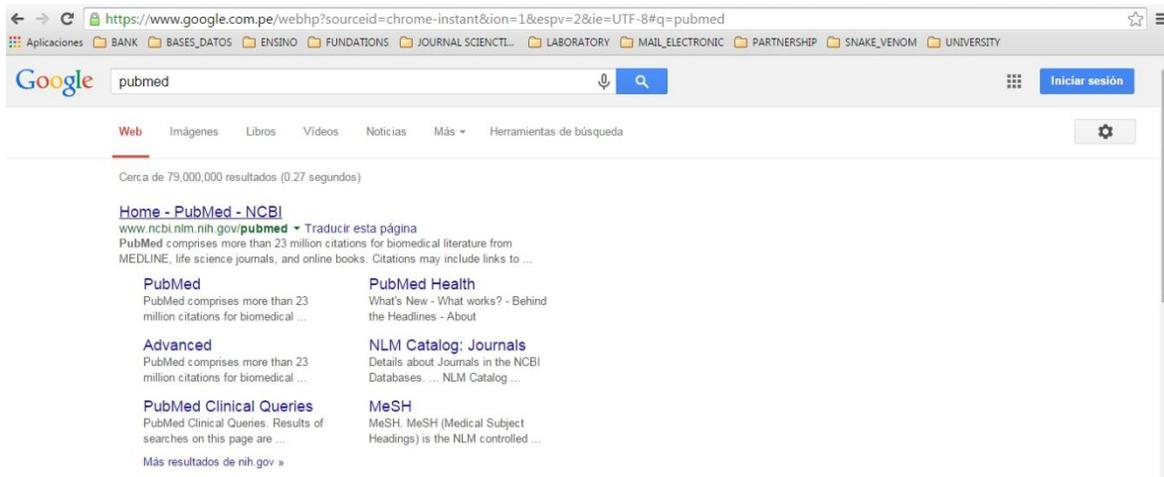


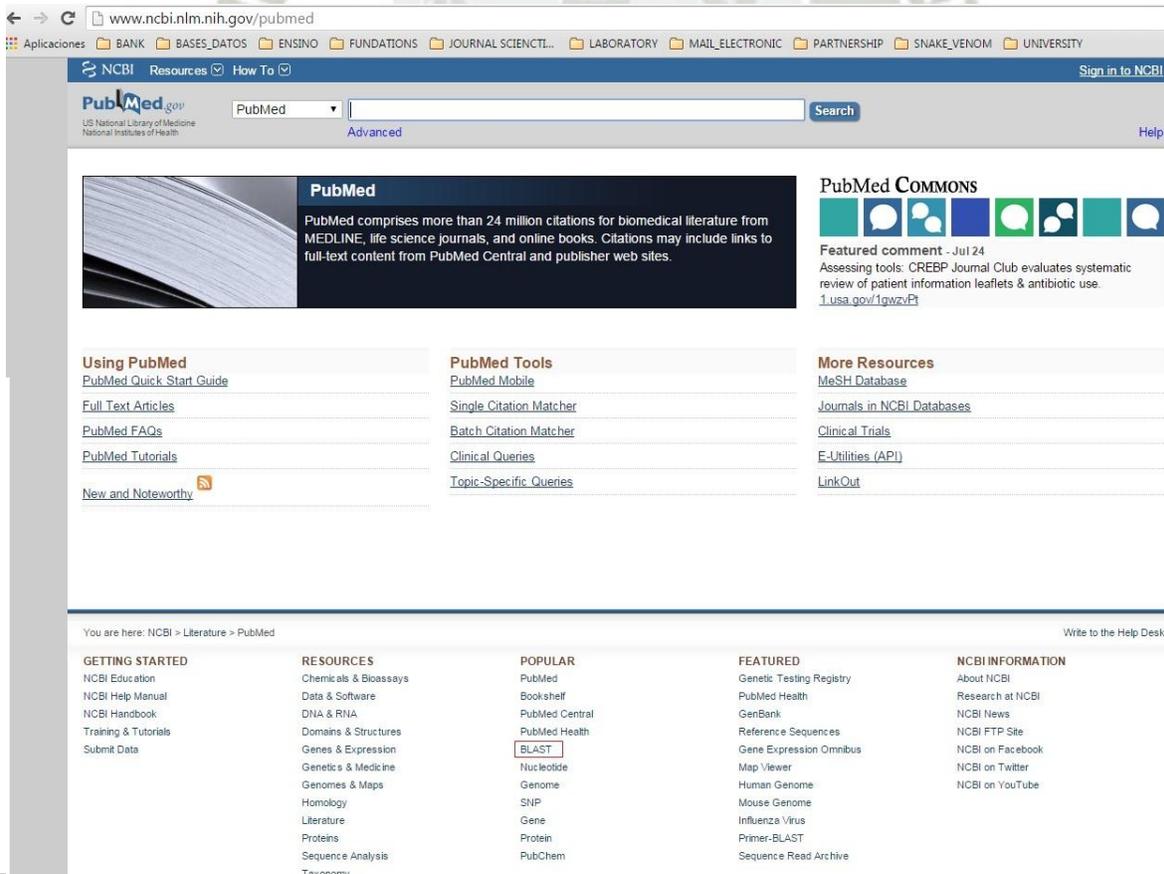
Figura N° 21: Secueciamiento Macrogen de la cepa Esófago TSA 10⁴ (II) 1

ANEXO 6: TUTORIAL DE ACCESO BLAST

1. Inicie la búsqueda desde cualquier navegador; explorer, chrome, firefox u otro. Digite PUBMED e inicie la búsqueda.



2. Ya en la página de búsqueda de información del NCBI, se ubica en la parte de abajo y busca sobre la columna de POPULAR la palabra BLAST, le da un clic y continúa (se encuentra en un casillero rojo).



3. A continuación nos ubicamos en Basic BLAST y hacemos un clic en la palabra protein-protein, también se encuentra encerrada en un casillero rojo.

The screenshot shows the NCBI BLAST Home page. The 'protein blast' option is highlighted with a red box. The page includes navigation tabs (Home, Recent Results, Saved Strategies, Help), a search bar, and a list of organisms for selection. The 'protein blast' option is highlighted with a red box.

4. En la siguiente página introduce la secuencia de su proteína problema en la sección Enter accesión. (Casillero rojo).
5. Selecciona la base de datos Swiss Prot.
6. Y en la sección final indica que el resultado de la búsqueda se presente en otra ventana, a continuación realiza la búsqueda haciendo un clic sobre la palabra BLAST.

The screenshot shows the NCBI BLAST Standard Protein BLAST page. The 'UniProtKB/Swiss-Prot(swissprot)' database is selected, and the 'blastp' algorithm is chosen. The 'BLAST' button is highlighted with a red box.

7. Sobre la base de los resultados en la búsqueda de información vemos el score de identidad sobre la base del color y el número de aminoácidos en la secuencia de la proteína. De donde escogemos las 3 o 5 primeras secuencias informadas con alto score de identidad para realizar nuestro estudio de homología secuencial.

Protein Sequence (65 letters)

RID V9k78V99015 (Expires on 07-27 20:04 pm)
 Query ID |c|Query_86798
 Description None
 Molecule type amino acid
 Query Length 65

Database Name swissprot
 Description Non-redundant UniProtKB/SwissProt sequences
 Program BLASTP 2.2.32+ | Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results Multiple alignment

Graphic Summary

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. DLWDFGKMLKETGKCCFVHDCCKYKTRYSYSRENGDVCVGGDDPKKKNKDTYDIKYVFGAK
 Superfamilies PIR2-like superfamily

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-60	Red
60-80	Green
80-200	Purple
>=200	Yellow

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 1R [Bothrops pirajai]	90.1	90.1	100%	3e-23	49%	Q8DPL5.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BthA-1; Short=svPLA2; AltName: Full=BQJUHIII; AltName: Full=BthA-LPLA2; AltName: Full=Hypotensive phospholipase A2	86.7	86.7	100%	1e-21	49%	Q8AXY1.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BITP01A; Short=svPLA2; AltName: Full=RlnTX-I; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase; Flags: Precursor R	84.7	84.7	100%	6e-21	47%	Q8QG87.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BmoopLA2; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase; Flags: Precursor [Bothrops moojeni]	81.3	81.3	100%	1e-19	46%	Q3DT18.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 2; Short=BaspPLA2-II; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase [Bothrops asper]	79.0	79.0	100%	6e-19	44%	P86389.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2; Short=svPLA2; AltName: Full=BJ-PLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase [Bothrops jararaca]	76.3	76.3	100%	7e-18	44%	P81243.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 4; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase; AltName: Full=Phospholipase A2 isozyme IV; Sho	75.1	75.1	78%	2e-17	58%	P81479.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BE-I-PLA2; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase; Flags: Precursor [Bothrops erythromelas]	74.3	74.3	78%	4e-17	58%	Q2H228.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase [Bothrops pictus]	73.6	73.6	78%	6e-17	58%	Q0I8F8.1
RecName: Full=Acidic phospholipase A2 1; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase; AltName: Full=Phospholipase A2 isozyme I; Short	73.9	73.9	78%	7e-17	57%	P20476.3

8. Sobre la base de la consulta de cada proteína obtenemos la siguiente información, y es a partir de allí que indagamos la secuencia completa de la proteína seleccionada para nuestro estudio de homología secuencial, haciendo un clic sobre el código de acceso de la proteína (encerrado en un casillero rojo).

The screenshot shows a BLAST search interface with three results. Each result includes a 'RecName' (e.g., Full=Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I), a 'Sequence ID' (e.g., sp|C9DPL5.1|PA2AT_BOTPI), and a 'Length' of 122. The first result shows a score of 90.1 bits (222) and a 3e-23 significance. The second result shows a score of 86.7 bits (213) and a 1e-21 significance. The third result shows a score of 86.7 bits (213) and a 1e-21 significance. Each result includes a table with columns for 'Score', 'Expect', 'Method', 'Identities', 'Positives', and 'Gaps', followed by 'Query' and 'Sbjct' sequence alignments.



9. En esta página obtenemos toda la información necesaria para la consulta de la proteína en estudio. En esta sección nos interesa para nuestro estudio la secuencia completa de esta proteína que la encontramos en la parte final de la página sobre el título de ORIGIN, allí encontramos la secuencia de aminoácidos en su abreviatura de una sola letra y en minúscula. Es conveniente antes de editar en el sub programa edit sequence del DNA Star, convertir las letras minúsculas en mayúsculas a través de un procesador de texto (Word).

www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/357580469?report=genbank&log\$=proalign&blast_rank=1&RID=V9K78V99015

Protein: Protein [Search] Advanced Help

Display Settings: GenPept Send to: Change region shown Customize view Analyze this sequence Run BLAST Identify Conserved Domains Highlight Sequence Features Find in this Sequence

RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 1B

UniProtKB/Swiss-Prot: C9DPL5.1
Identical Proteins FASTA Graphics

Go to: LOCUS PA2A1_BOTPI 122 aa linear VRT 07-JAN-2015
DEFINITION RecName: Full=Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 1B.
ACCESSION C9DPL5
VERSION C9DPL5.1 GI:357580469
DBSOURCE UniProtKB: locus PA2A1_BOTPI, accession C9DPL5; class: standard. created: Nov 16, 2011. sequence updated: Nov 3, 2009. annotation updated: Jan 7, 2015.
xrefs: GO:0004921, ACV87234, xrefs (non-sequence databases): GO:0005576, GO:0005502, GO:0004623, GO:0016042, GO:0006644, GO:0008217, Gene3D:1.28.90.10, InterPro:IPR001211, InterPro:IPR013090, InterPro:IPR016090, PANTHER:PTHR11716, Pfam:PF00068, PRINTS:PR00389, SMART:SM00085, SUPFAM:SSF48619, PROSITE:PS00119, PROSITE:PS00118
KEYWORDS Calcium; Direct protein sequencing; Disulfide bond; Hemostasis impairing toxin; Hydrolase; Hypotensive agent; Lipid degradation; Lipid metabolism; Metal-binding; Platelet aggregation inhibiting toxin; Secreted; Toxin.
SOURCE Bothrops pirajai

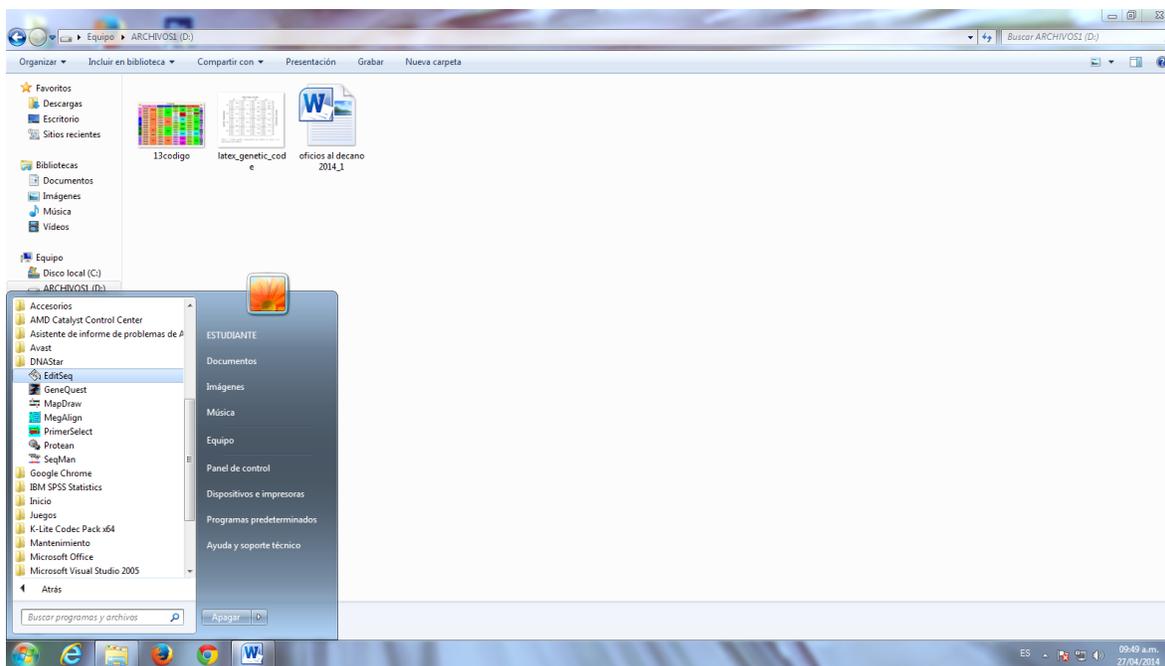
Bond /note="{ECO:0000250}." bond(50,88) /bond_type="disulfide" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
Bond /note="{ECO:0000250}." bond(57,81) /bond_type="disulfide" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
Bond /note="{ECO:0000250}." bond(75,86) /bond_type="disulfide" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
Site /note="{ECO:0000250}." 89 /site_type="active" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
Region /note="{ECO:0000250}." 105..117 /region_name="Short sequence motif of biological interest" /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
/note="Antiplatelet activity."

ORIGIN
1 nlwqfgklm kiagesgvfk ylsygcyl ggagqtdat drccfvhdcc ygkvtgcdpk
61 idsytysken gdvvcgddp ckkqkccdr vaatcfrdnk dtydikwyfy gskncqese
121 pc
//

Related information: BLink, Related Sequences, Identical Proteins, CDD Search Results, Conserved Domains (Concise), Conserved Domains (Full)

ANEXO 7: TUTORIAL DNA Star

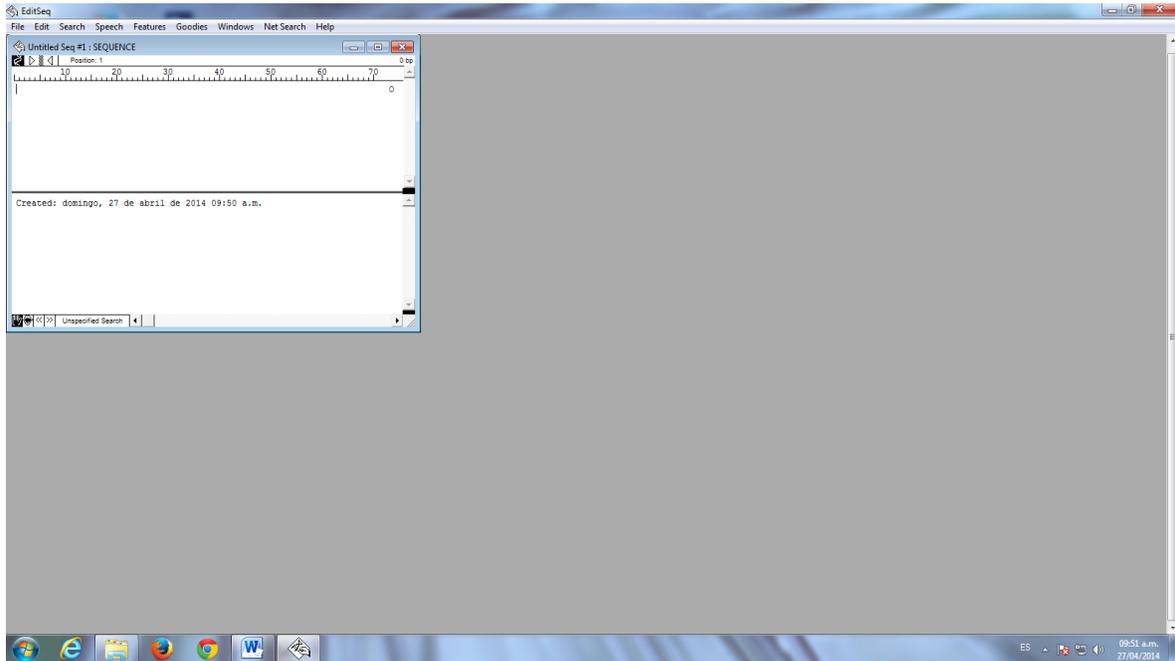
1. Para editar la secuencia, usamos el sub-programa EDIT SEQUENCE:



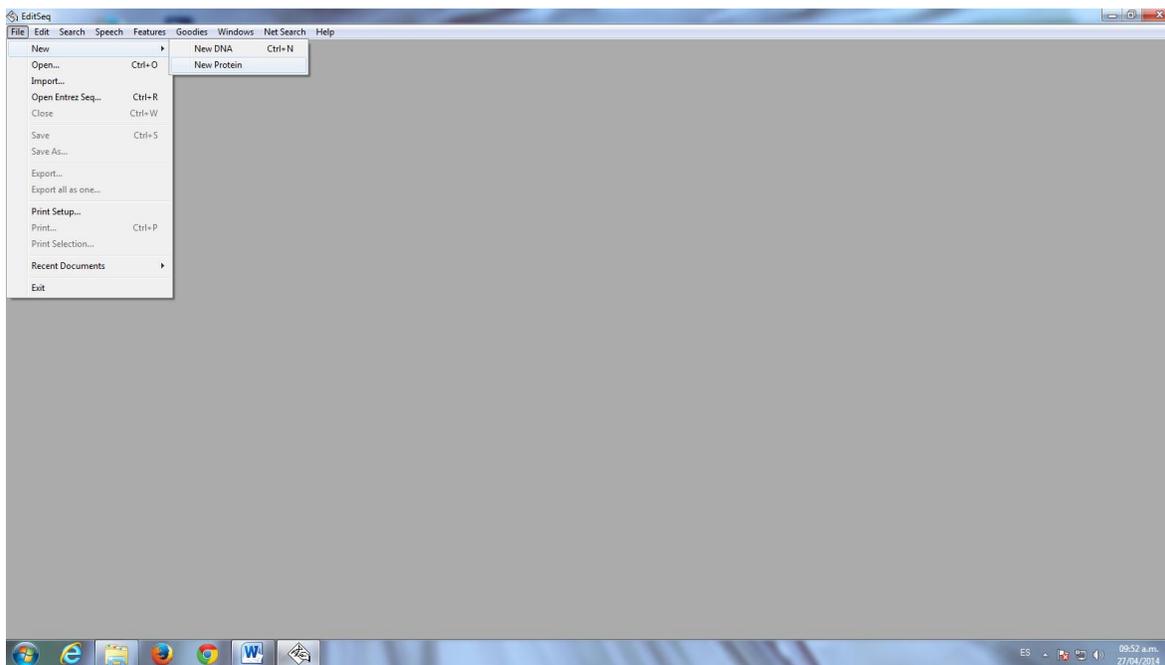
1.1. Apertura del Sub-Programa



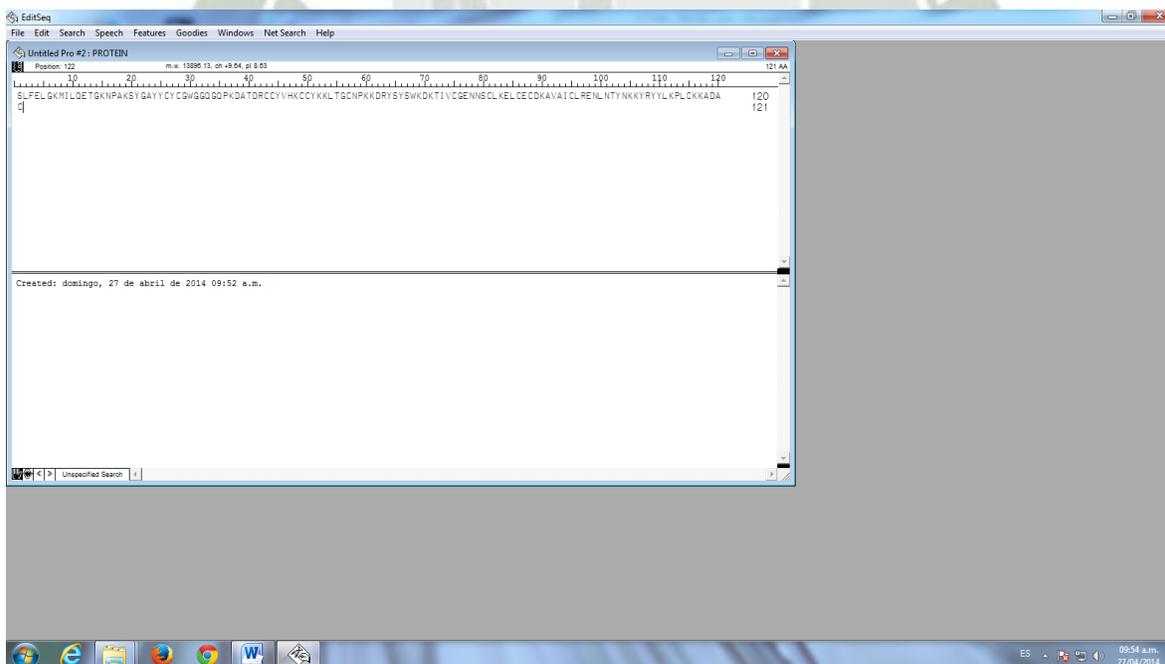
1.2. Por defecto se abre una ventana para editar la secuencia, sólo que no informa si es para DNA, RNA o PROTEINA, por lo que se cierra la ventana blanca.



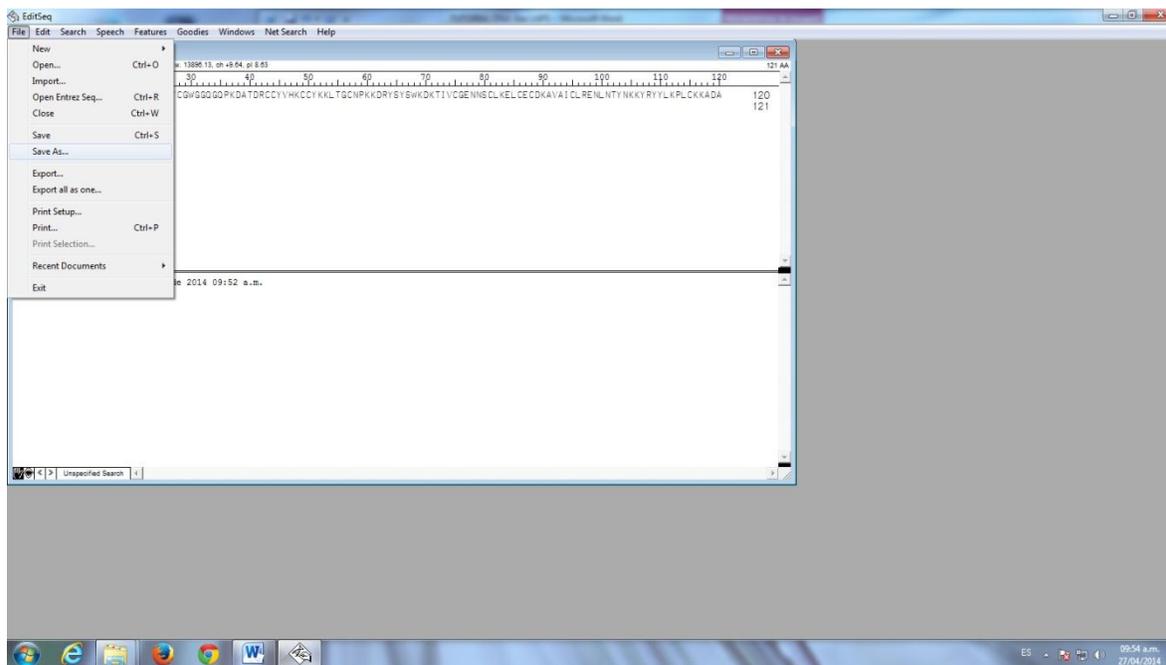
1.3. Y se procede a abrir en file una nueva ventana para PROTEINA.



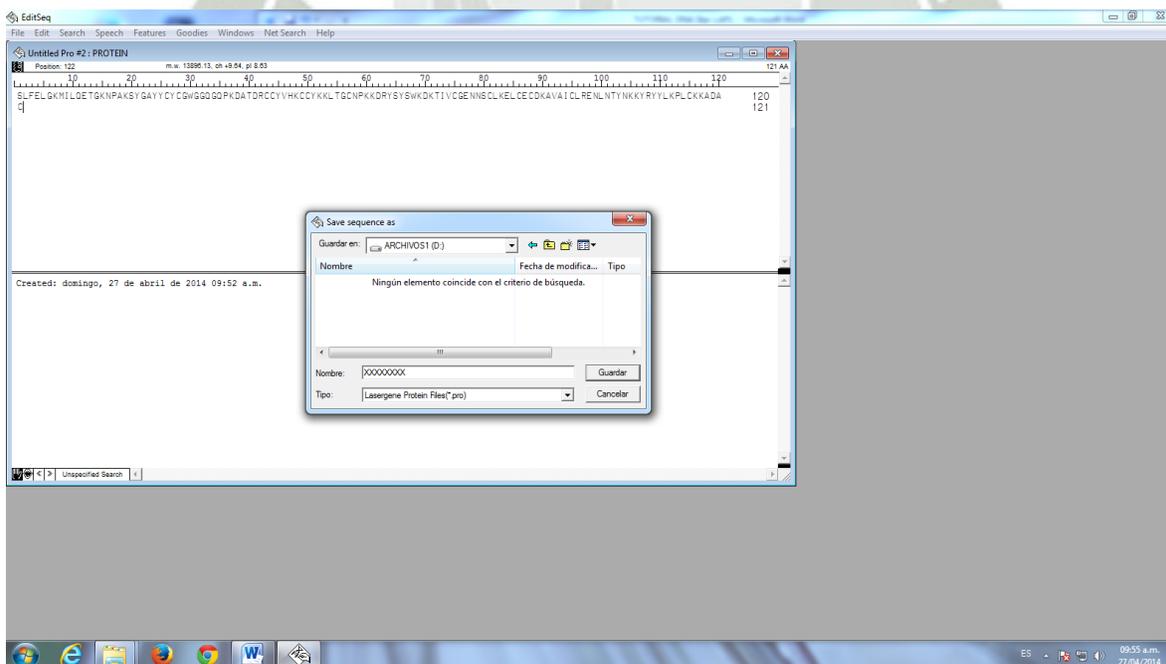
1.4. Allí entonces introducimos nuestra secuencia:



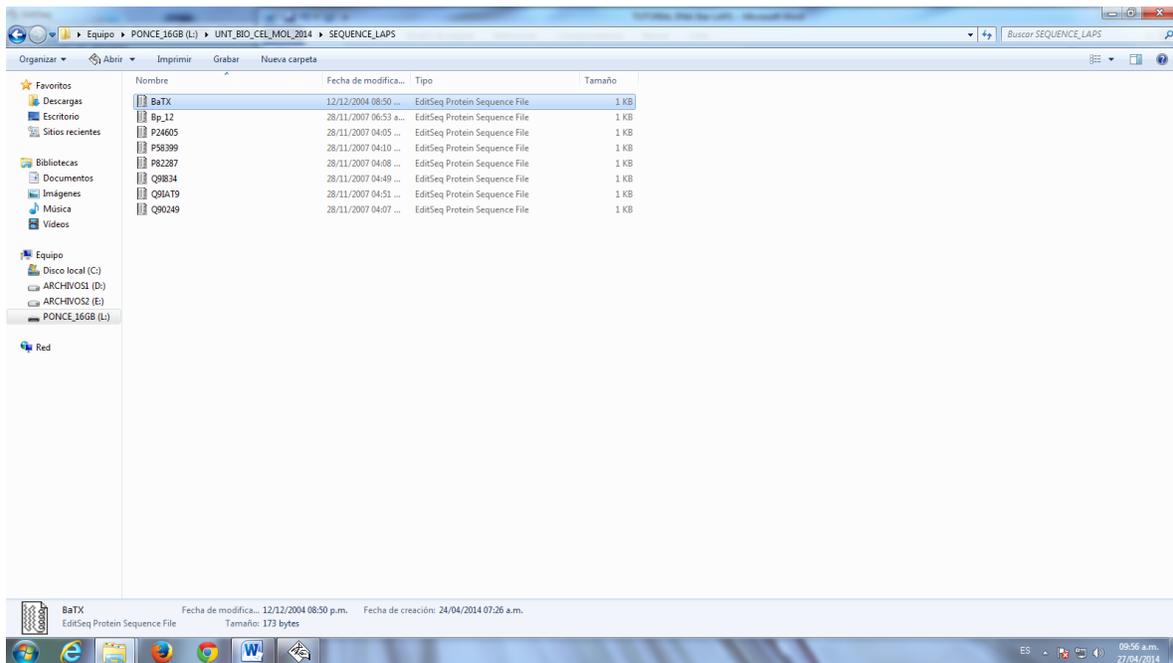
1.5. Grabamos nuestro archivo generado con un nombre.



1.6. Si es proveniente de una base de datos tipo BLAST, muchas veces ya tienen un código de acceso y es preferible utilizar ese código.

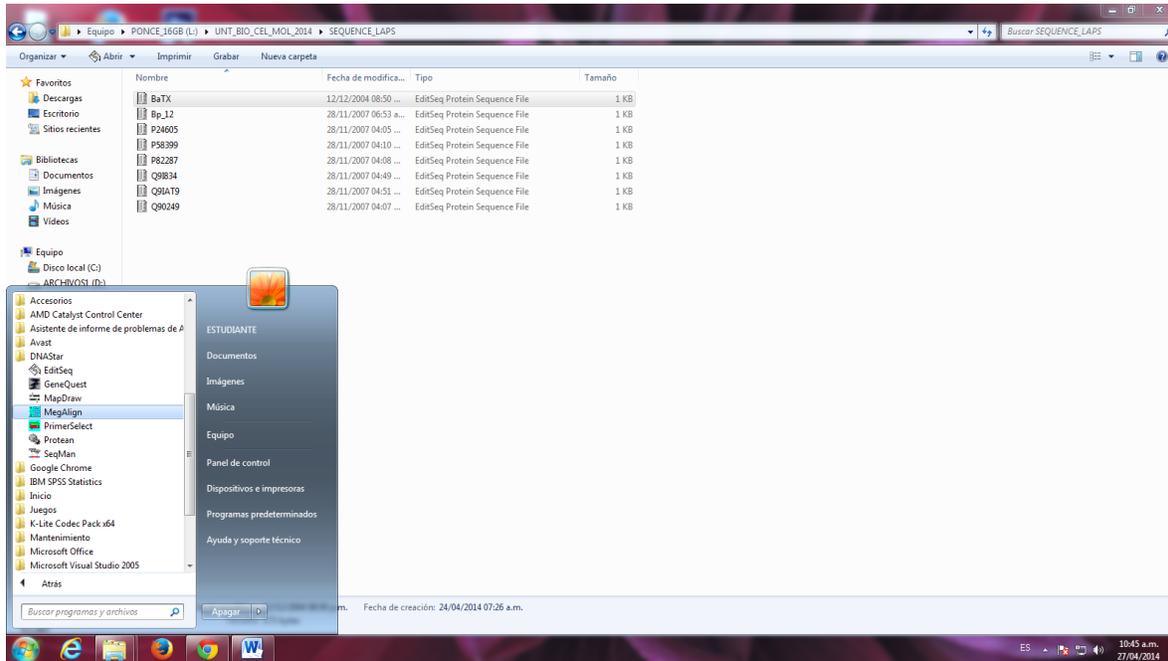


1.7. Finalmente ubicamos el lugar de acceso.

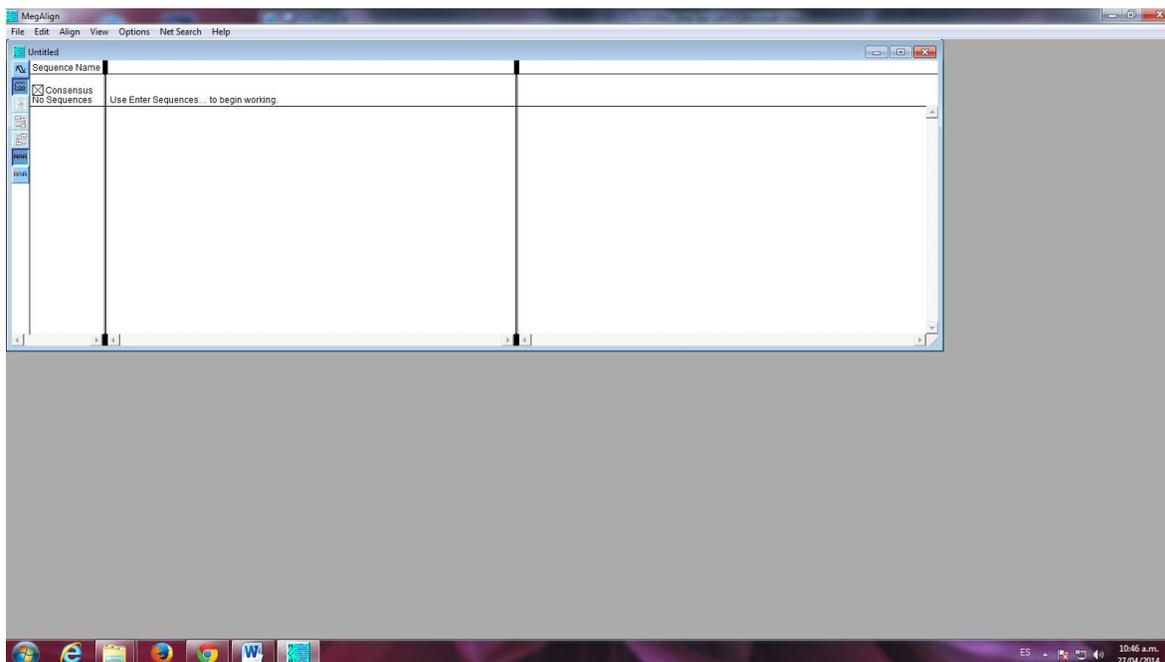


2. Para los estudios de alineamiento usamos el sub-programa MegAlign

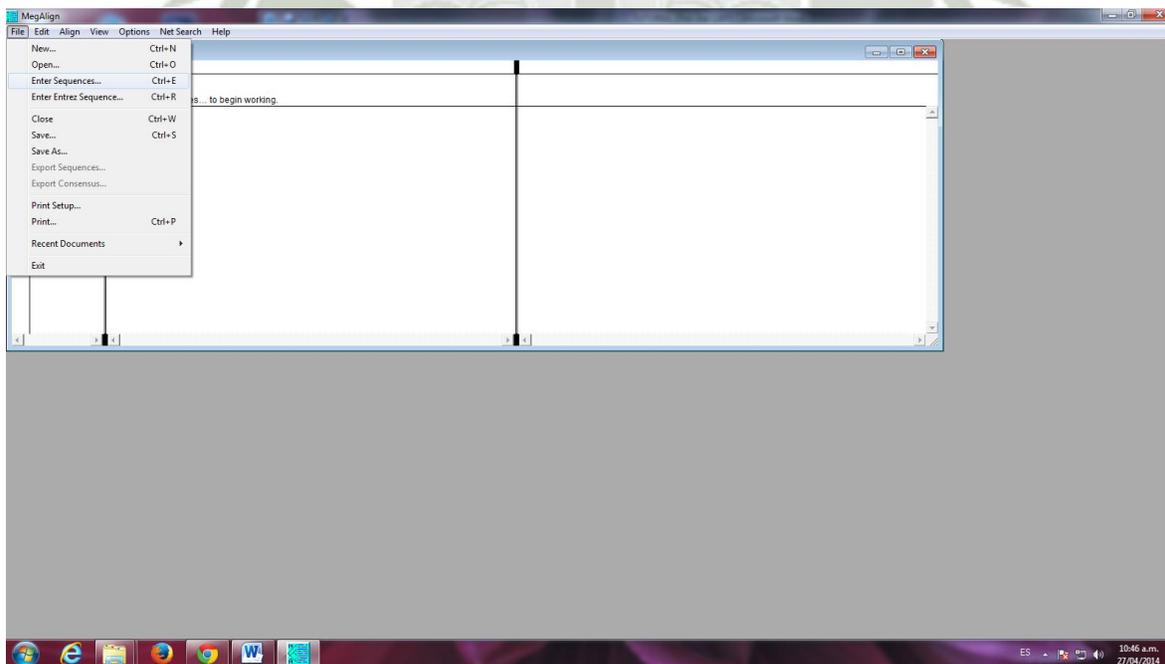
2.1. Nos ubicamos siempre en inicio y buscamos la carpeta del DNA Star, para abrir el sub-programa MegAlign.



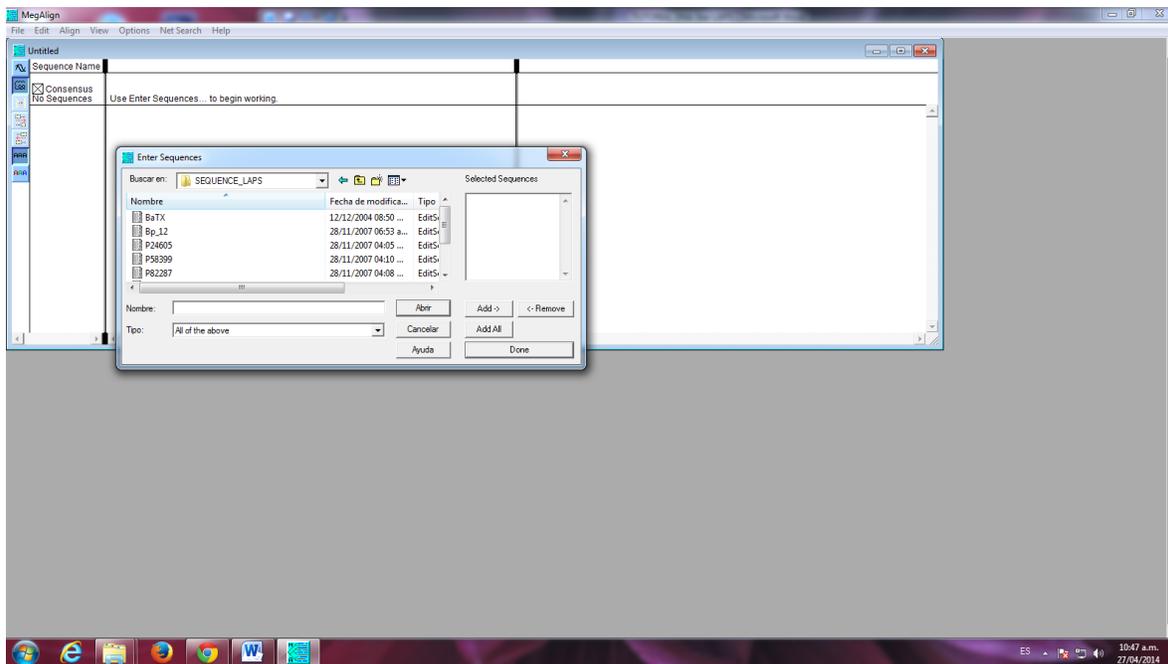
2.2. Por defecto se abre una ventana para alinear secuencia, la cual dejamos para usar y llamar nuestras secuencias a analizar.



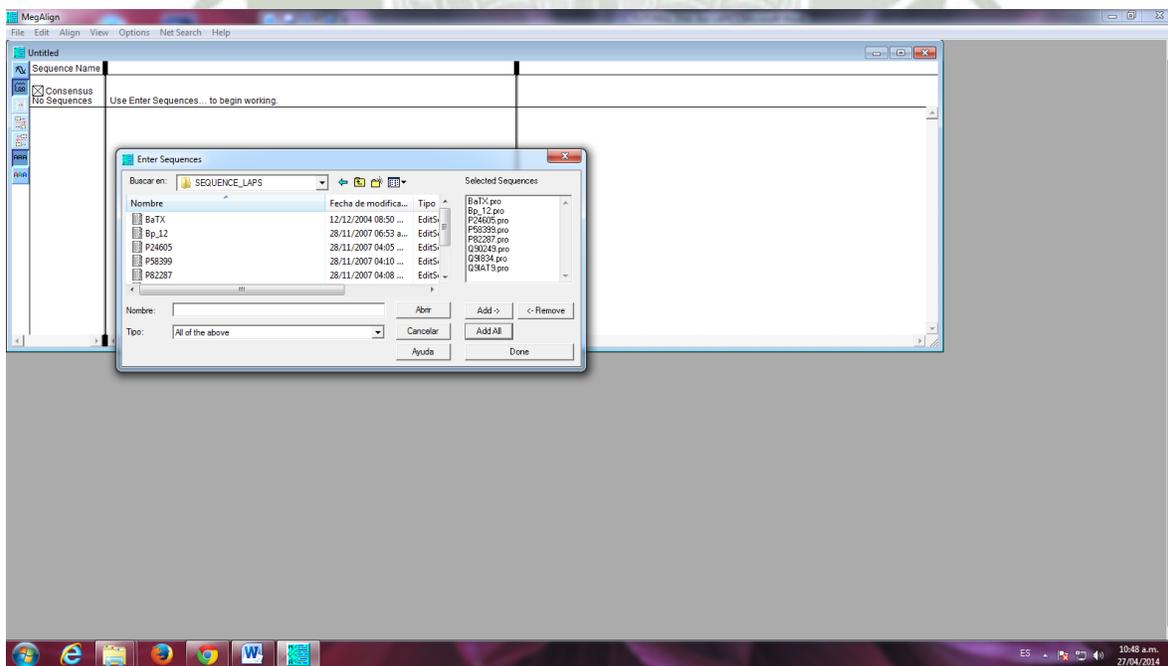
2.3. Nos ubicamos en Enter Sequences para ubicar la ruta de acceso de nuestras secuencias a analizar.



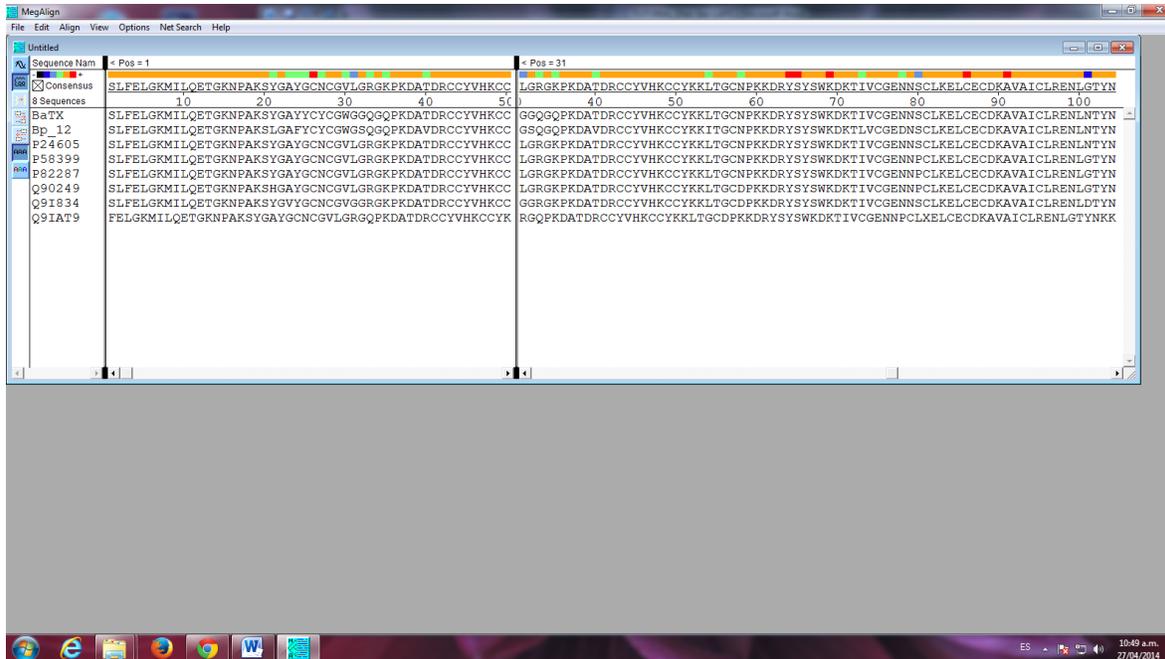
- 2.4. Al ubicar nuestras secuencias, ellas deben haber sido creadas bajo el sub-programa Edit Sequence del DNA Star, sólo así podremos visualizarlas



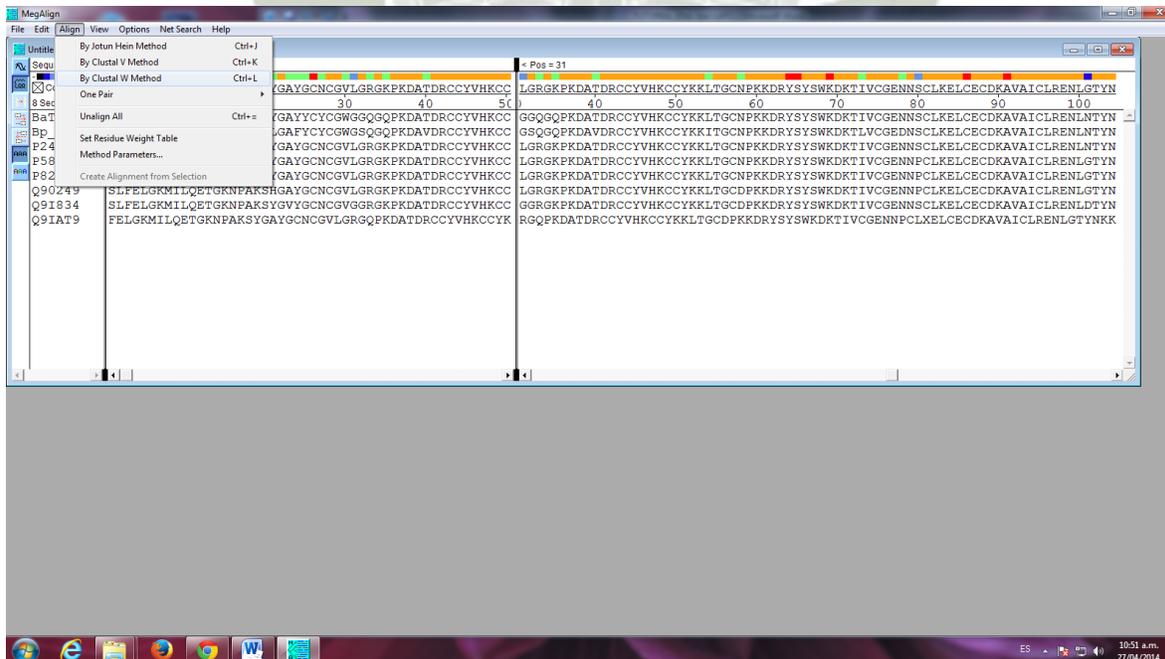
- 2.5. A partir de la ventana de localización de ruta, vamos a acceder a ellas de forma individual (Add) o tal (Add All).



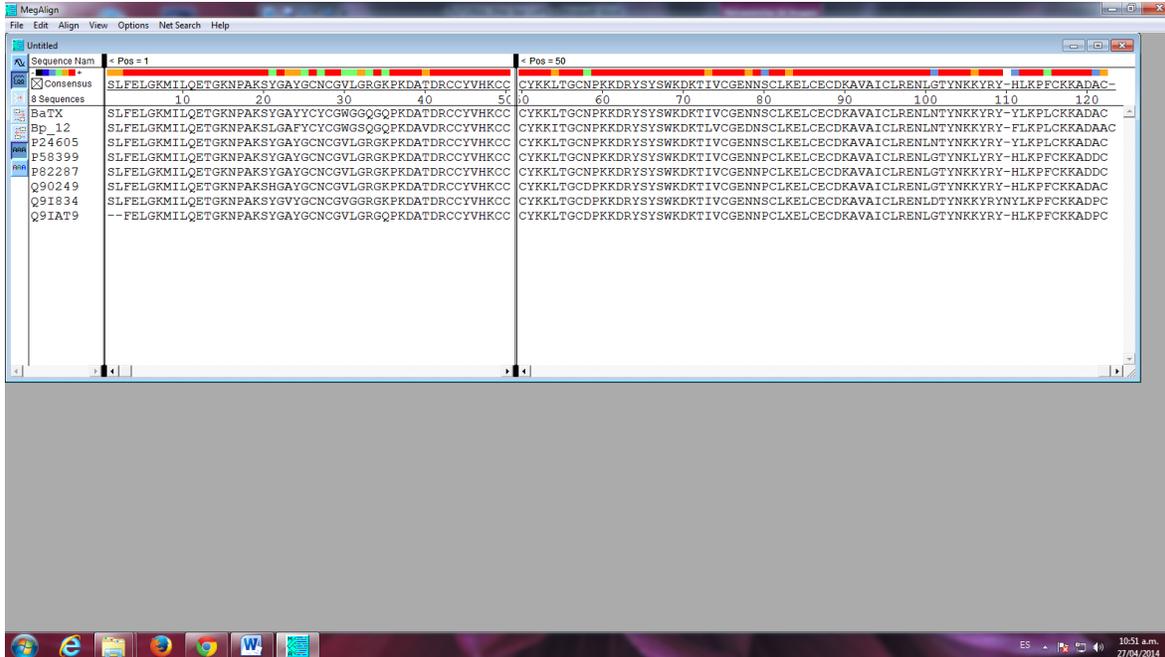
2.6. Las secuencias de nuestras proteínas ingresadas deben guardar cierto orden, así deben ingresar en 1er lugar nuestra proteína de estudio, o sea ella debe ser la primera. De no ser así, podemos ubicarla arrastrándola con el puntero del mouse hasta la posición correcta.



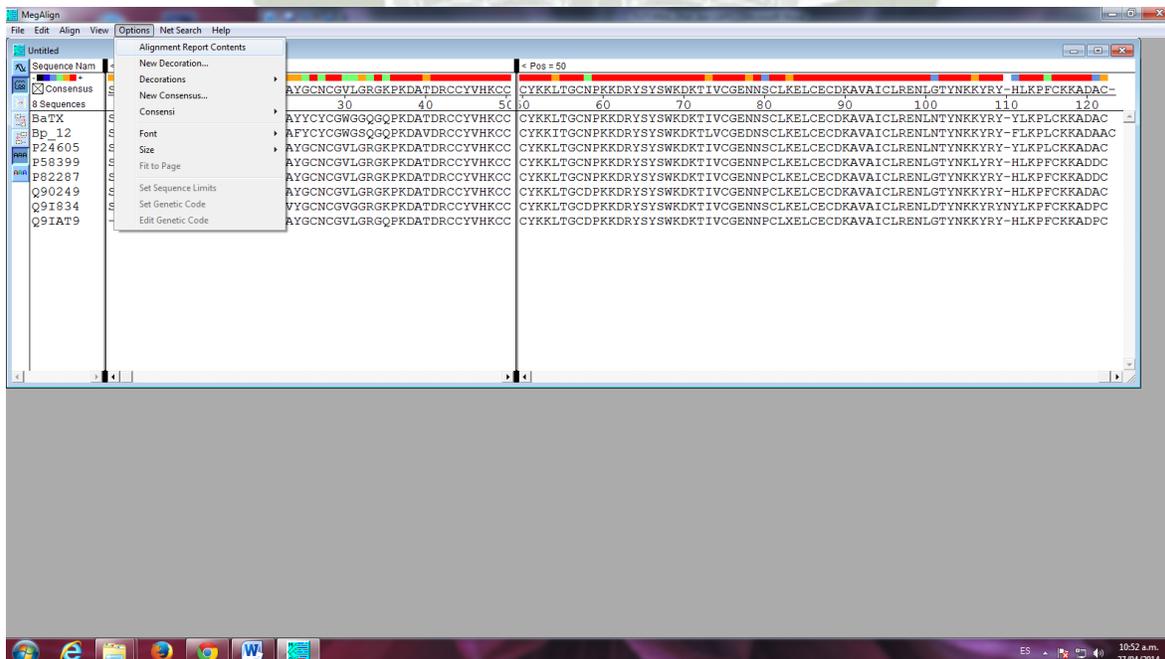
2.7. A partir de allí, ahora buscamos el método de alineamiento que para nuestro estudio será el Clustal W.



2.8. Inmediatamente en segundos se reordenarán nuestras secuencias generándose el alineamiento con nuevas posiciones en función de regiones y/o dominios conservados, produciéndose los respectivos “gap”, sugiriéndonos ampliaciones o regresiones génicas.

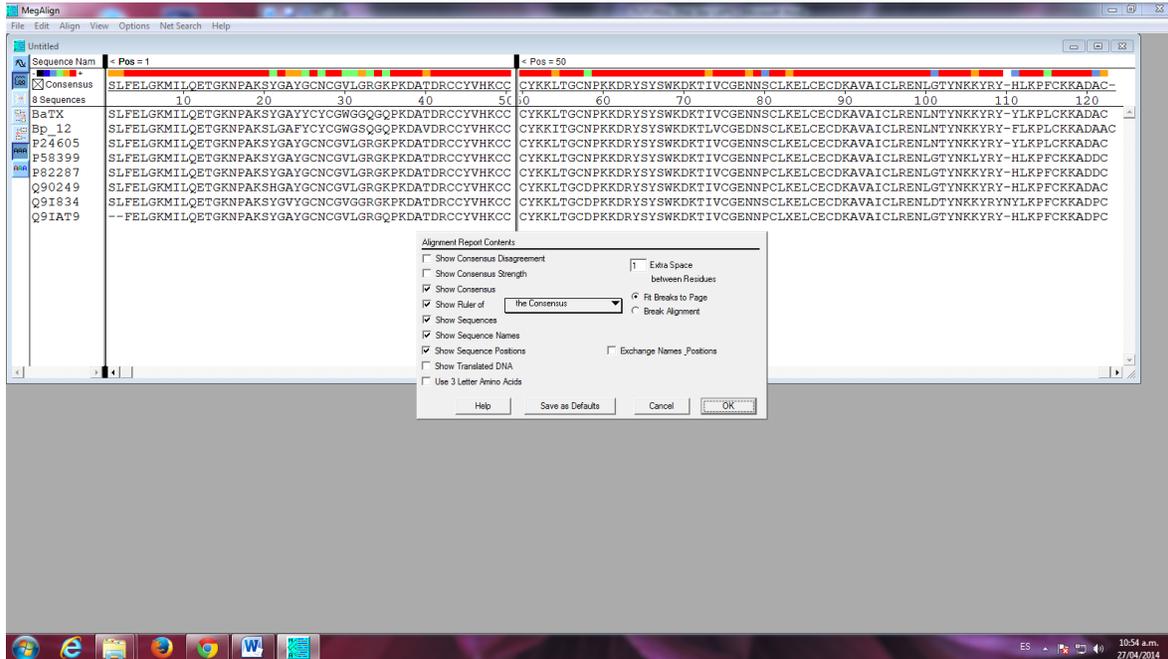


2.9. Para la presentación gráfica de la secuencia debemos dar el alineamiento a través de “Options” y “Aligment Report Contents”.

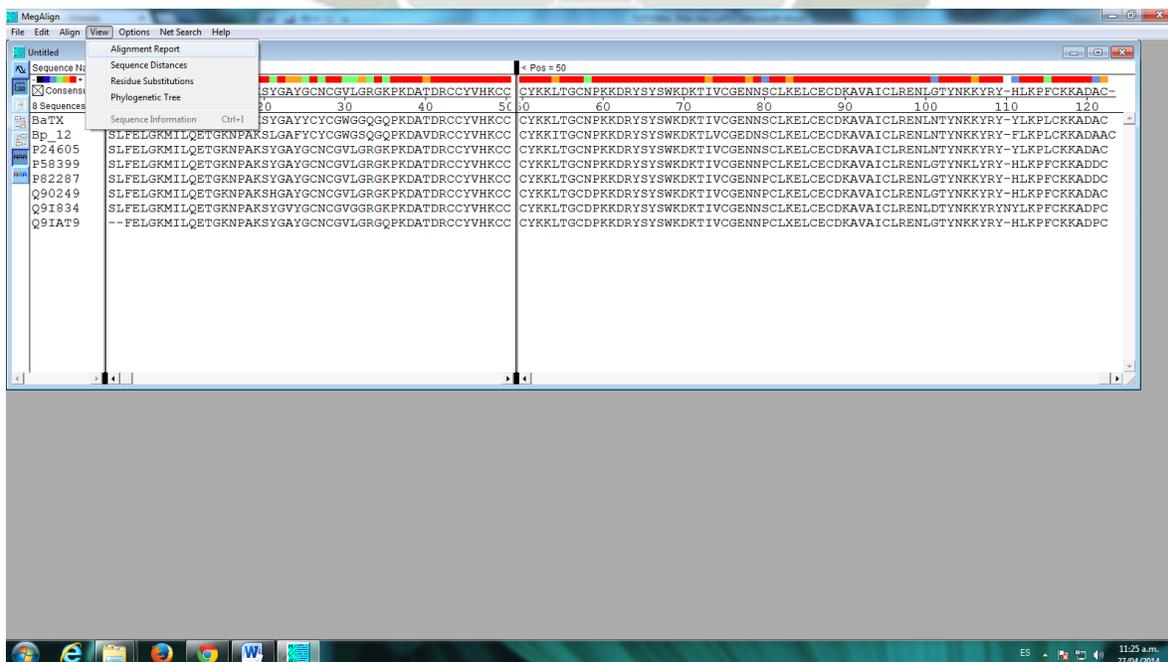


2.10. A partir de allí ubicaremos en la ventana que se abre, varias opciones, tales como:

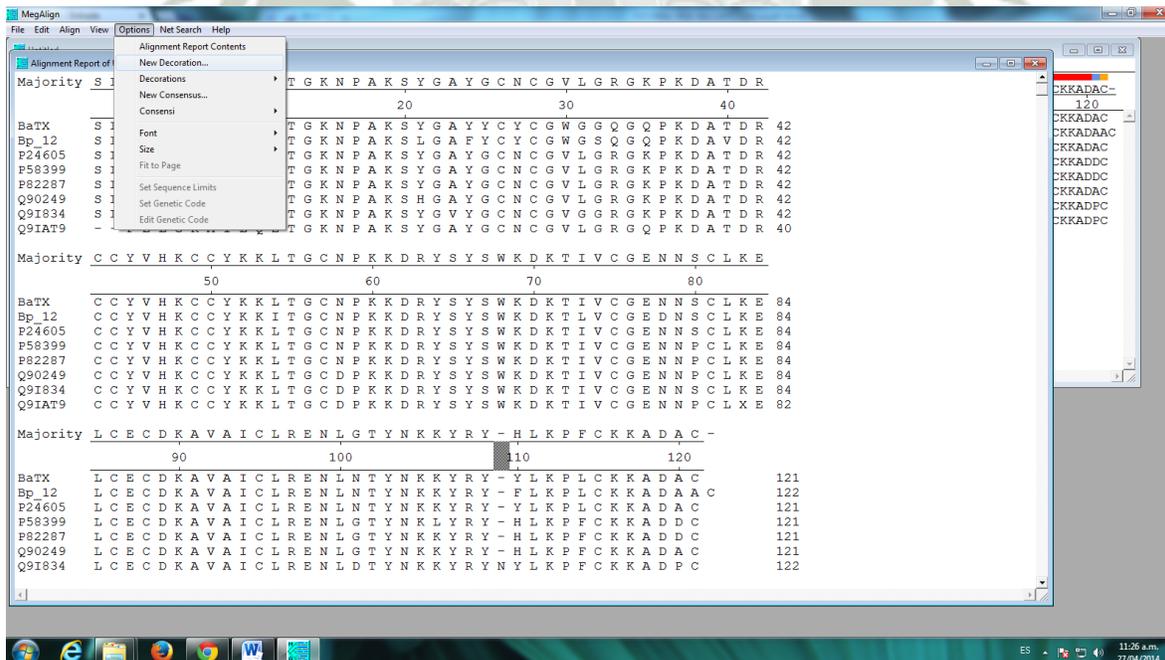
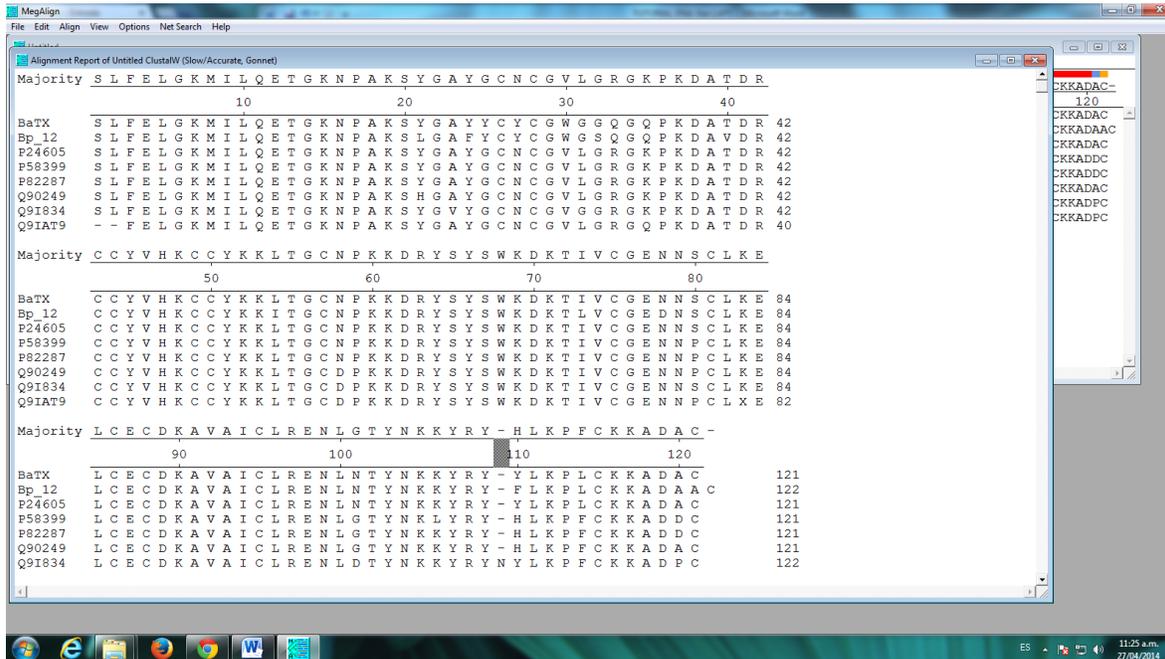
- a) The concensus, ubicamos allí nuestra proteína problema.
- b) Un quiebre de la secuencia dependiendo del tamaño de nuestra cadena polipeptídica para una mejor visualización, ejemplo, cuando se trate de una proteína de más de 120 aminoácidos, se recomienda que ese quiebre (Break) se realice a los 45 aminoácidos.
- c) La posición de los nombres que pasen de izquierda a derecha.



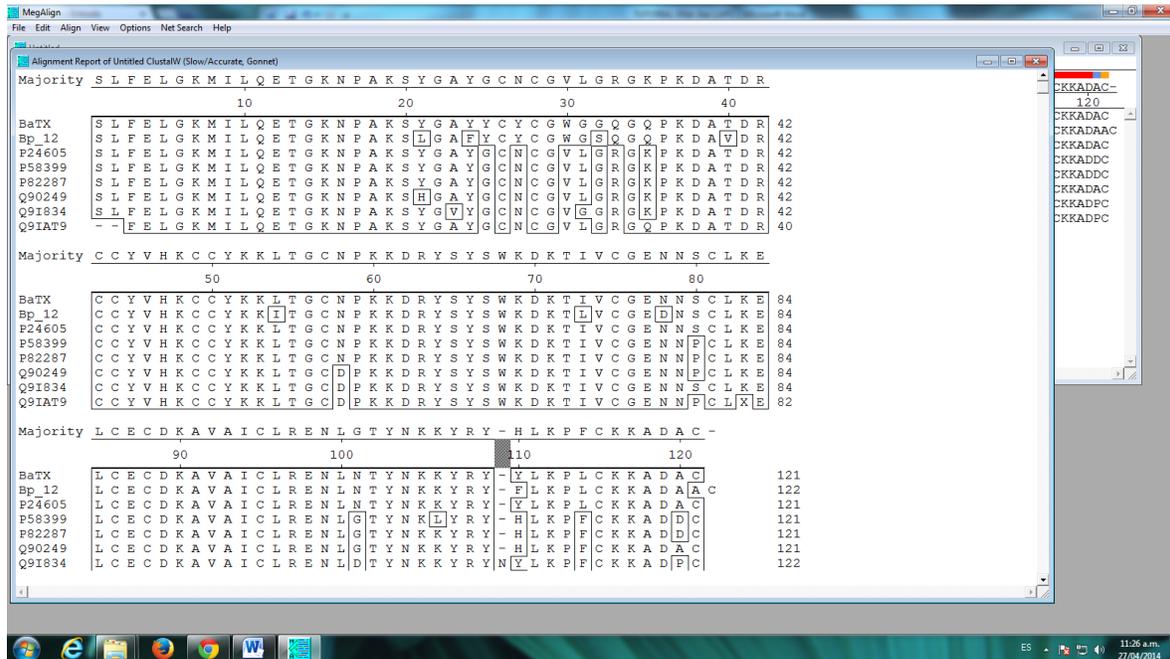
2.11. Para su respectiva visualización nos ubicamos en “View” en la opción Aligment Report



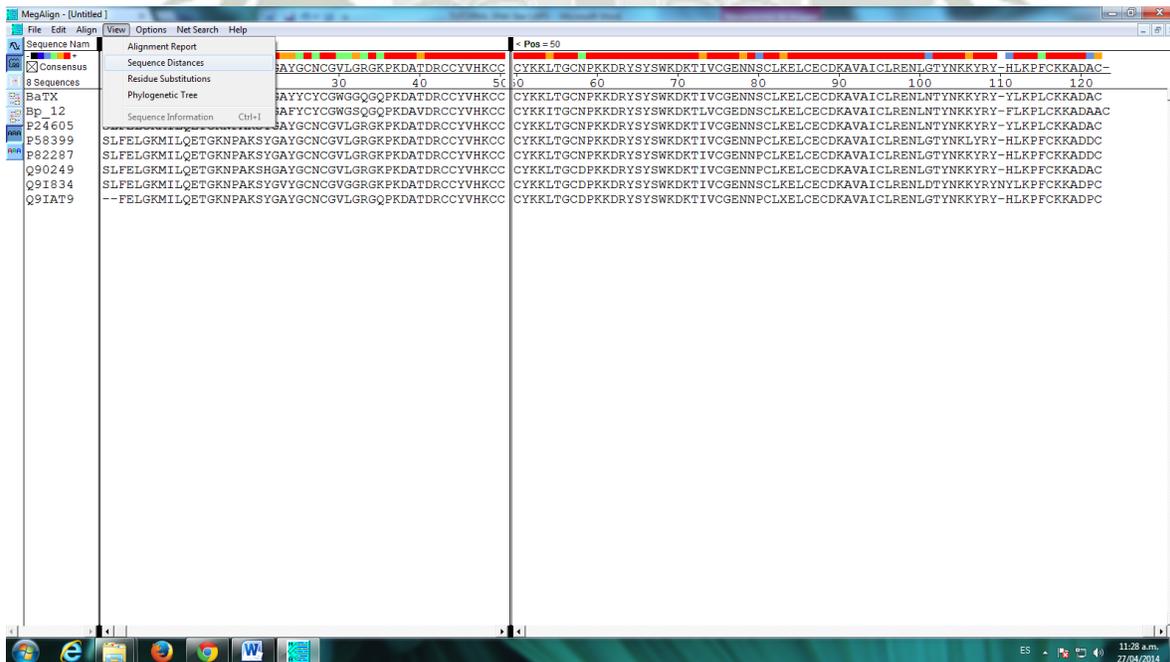
2.12. Entonces visualizaremos el alineamiento con las características que hemos escogidos en la opción anterior.



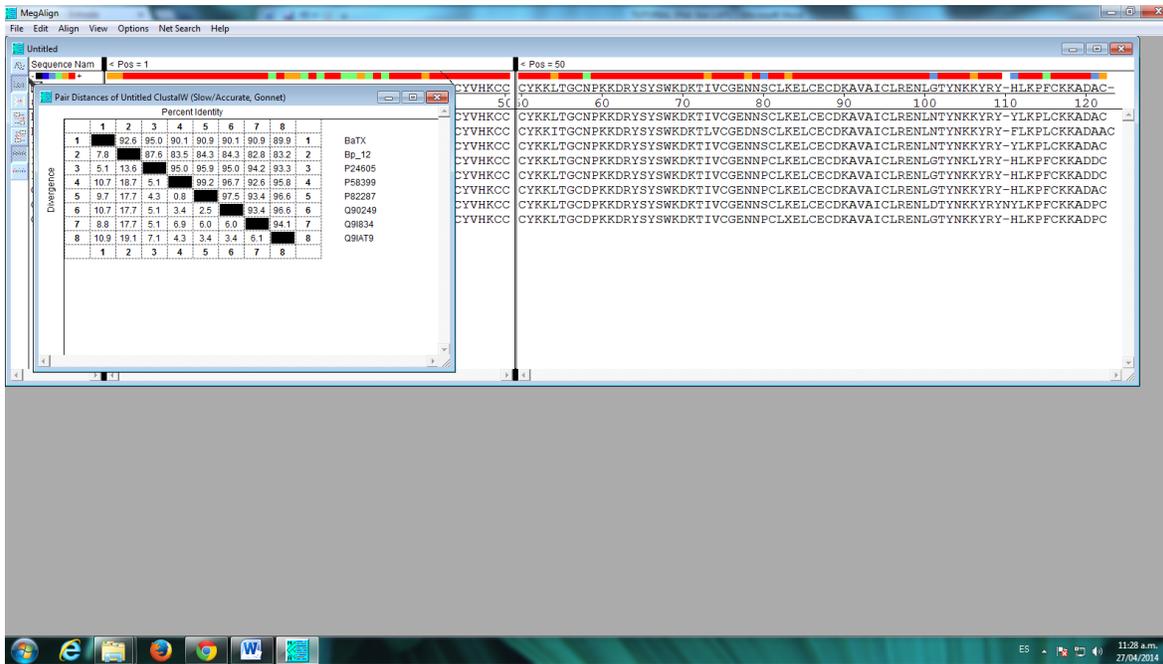
2.14. A partir de allí le indicamos, que los dominios o regiones conservados se mantengan dentro de una caja o sombreados, allí nosotros escogemos la opción deseada.



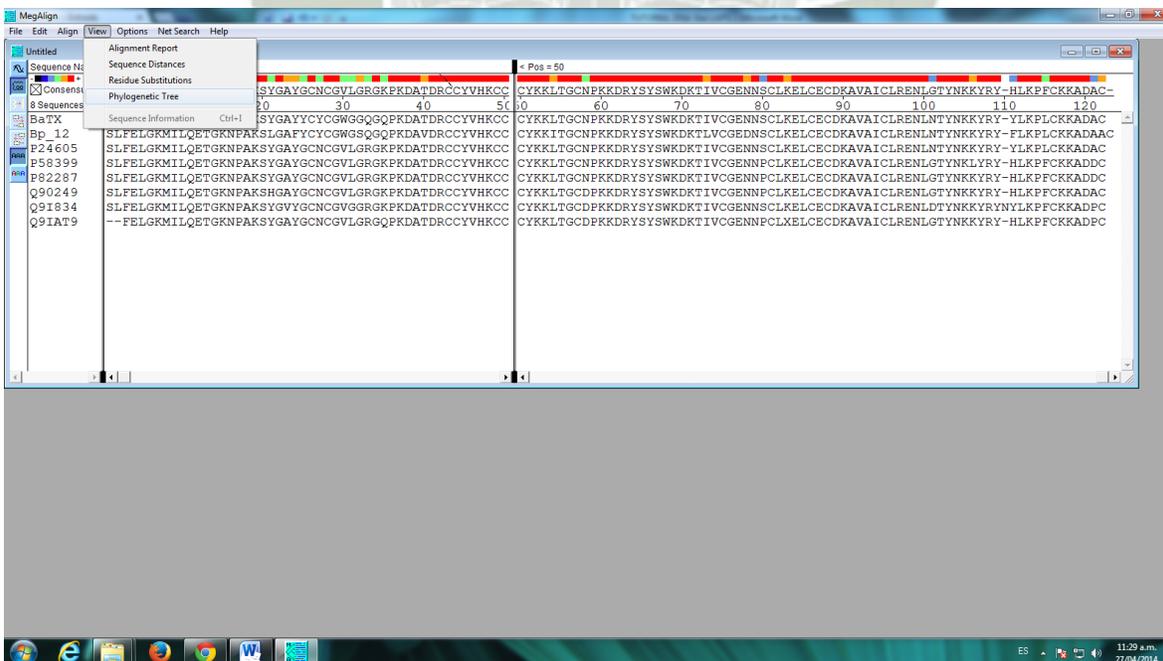
2.15. A partir de allí procedemos a ver el nivel o grado de homología porcentual (%) buscando la opción deseada en la opción “View” Sequence Distances.



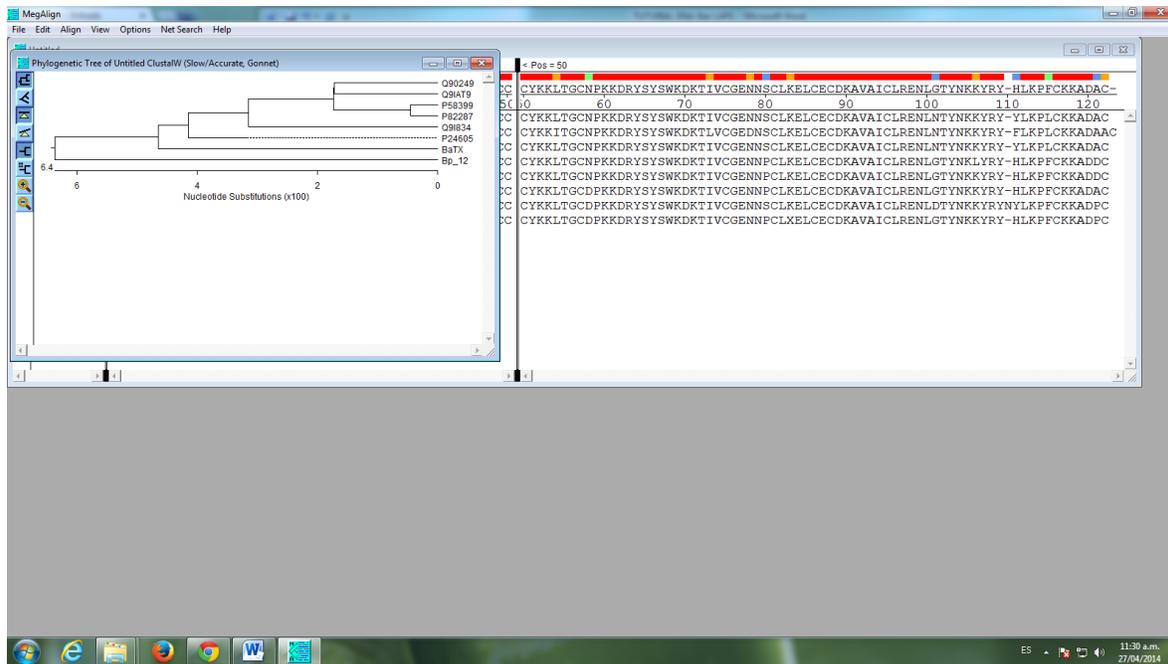
2.16. En la ventana insertada podemos ver los niveles porcentuales de homología. Aún a ese nivel podemos ordenar de mayor a menor grado de homología secuencial porcentual.



2.17. También a partir de allí (“View”) podemos visualizar la construcción del árbol filogenético a través de la opción “Phylogentic three”

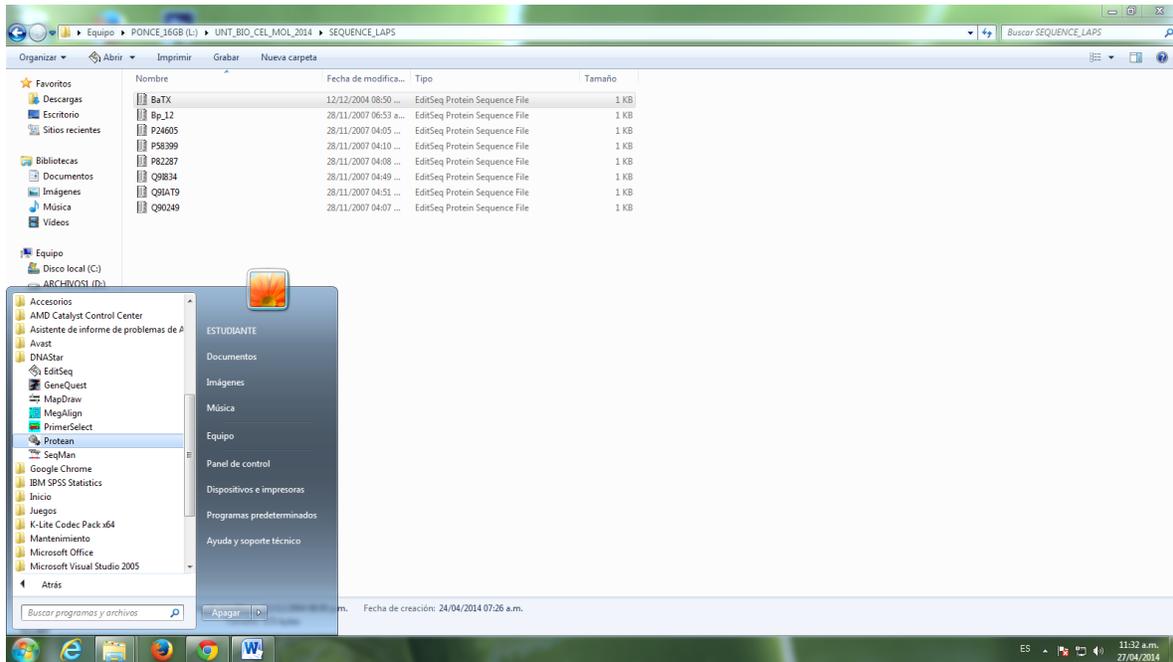


2.18. Podemos ver el árbol de filogenia molecular a partir de la secuencia de proteínas, donde la distancia entre una y otra proteína está en función del número de sustituciones de nucleótidos (x100).

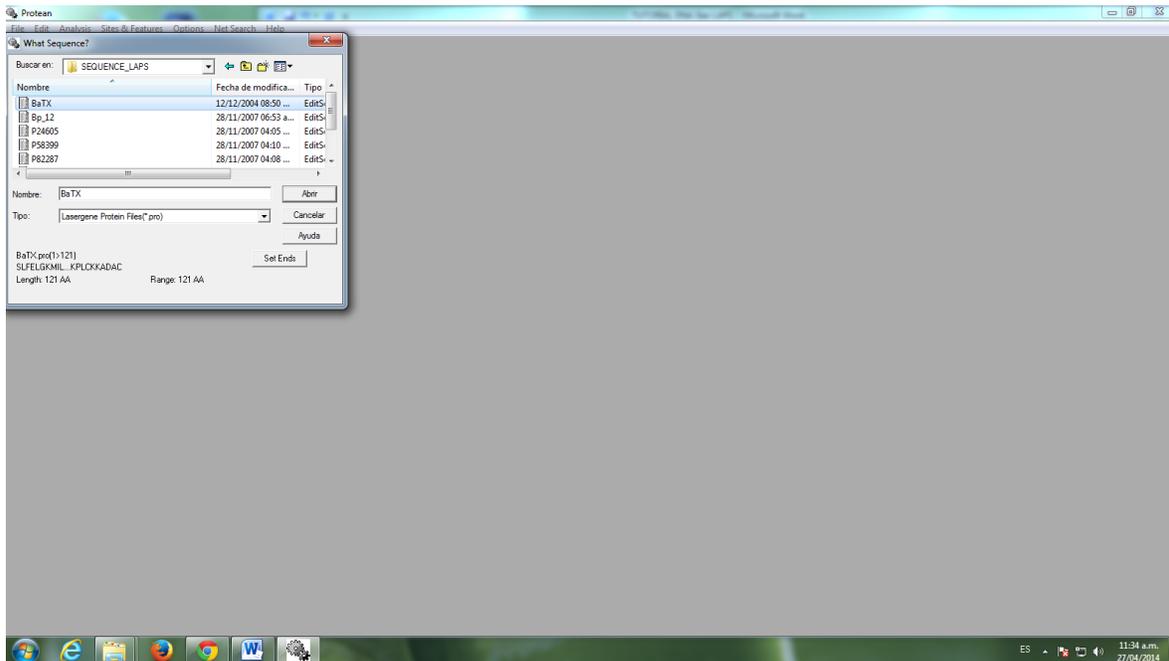


3. Para los estudios de la proteína suelta, podemos usar el sub programa PROTEAN del DNA star.

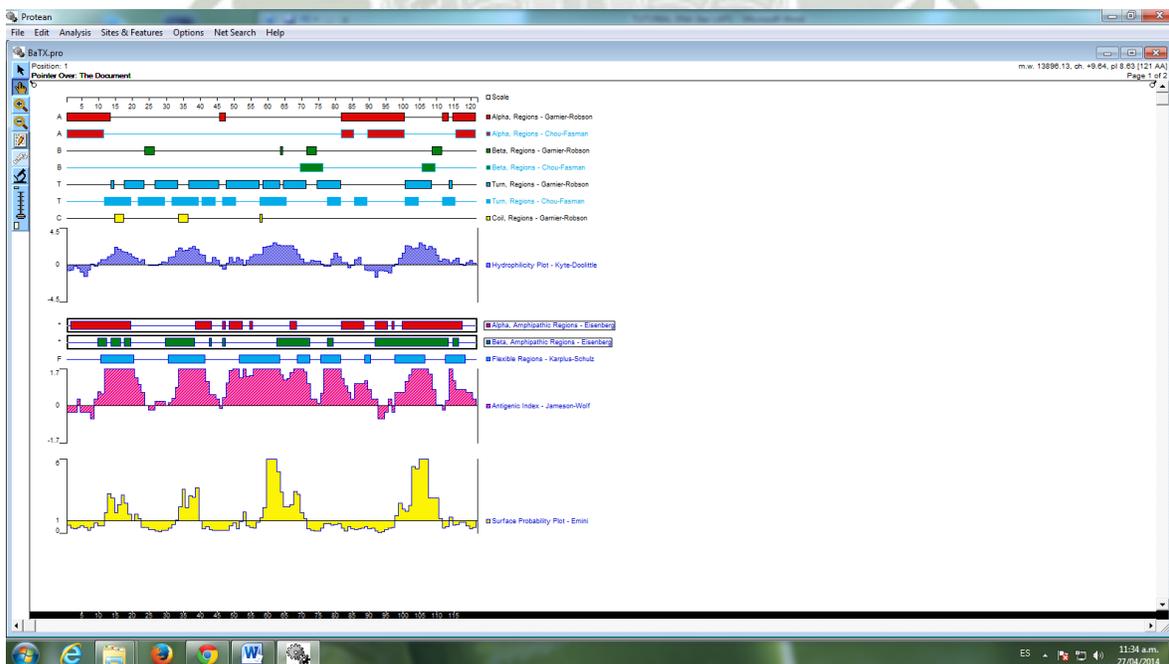
Para lo cual abrimos de mismo modo anterior, de Windows (inicio) la carpeta DNA star, y ubicamos el sub programa PROTEAN.



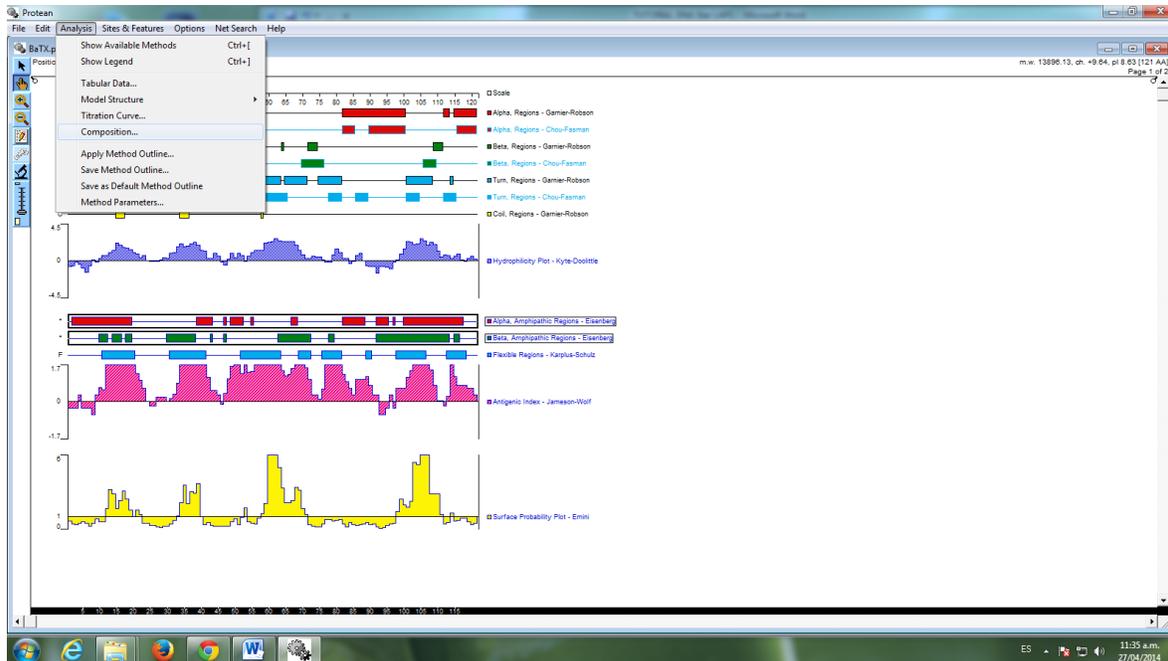
3.1. Abrimos en FILE y buscamos la ruta de acceso de nuestro archivo de proteínas donde ha sido ubicada.



3.2. A partir de donde hemos abierto obtenemos toda esta serie de informaciones de ciertas características fisicoquímica de la proteína. Podemos resaltar la distribución de carga de la superficie de la proteína, a través del perfil de hidropatía, entre otros.



3.3. De otro lado esta opción (PROTEAN), nos brinda la información del cálculo del análisis de composición de aminoácidos a partir de la secuencia de proteína.

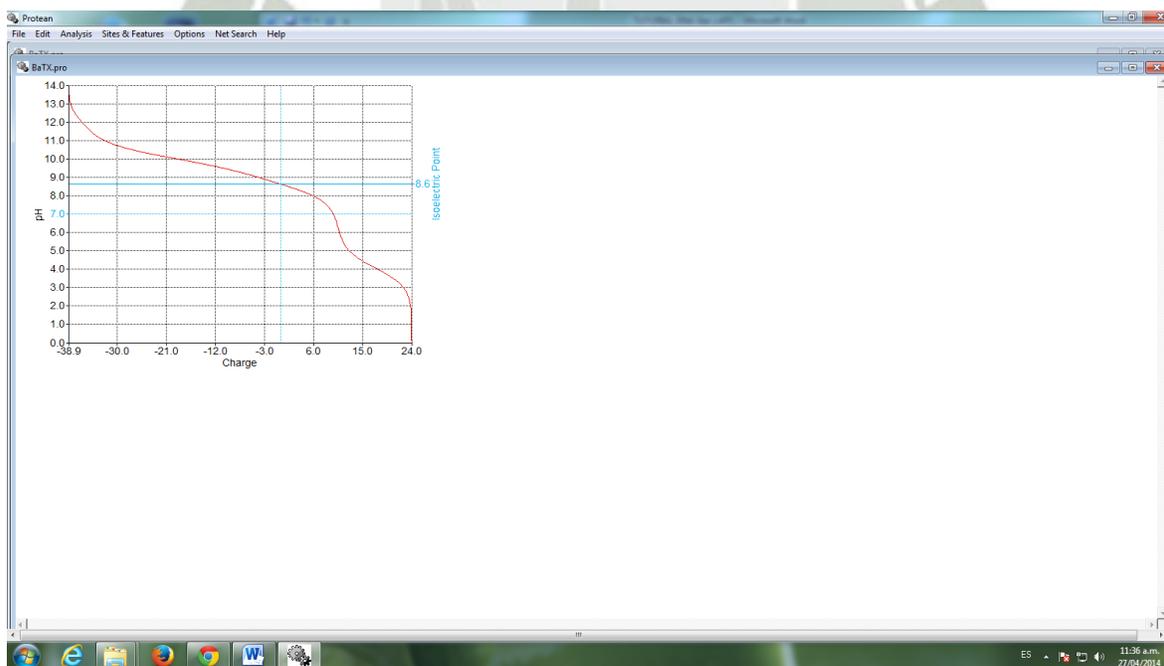
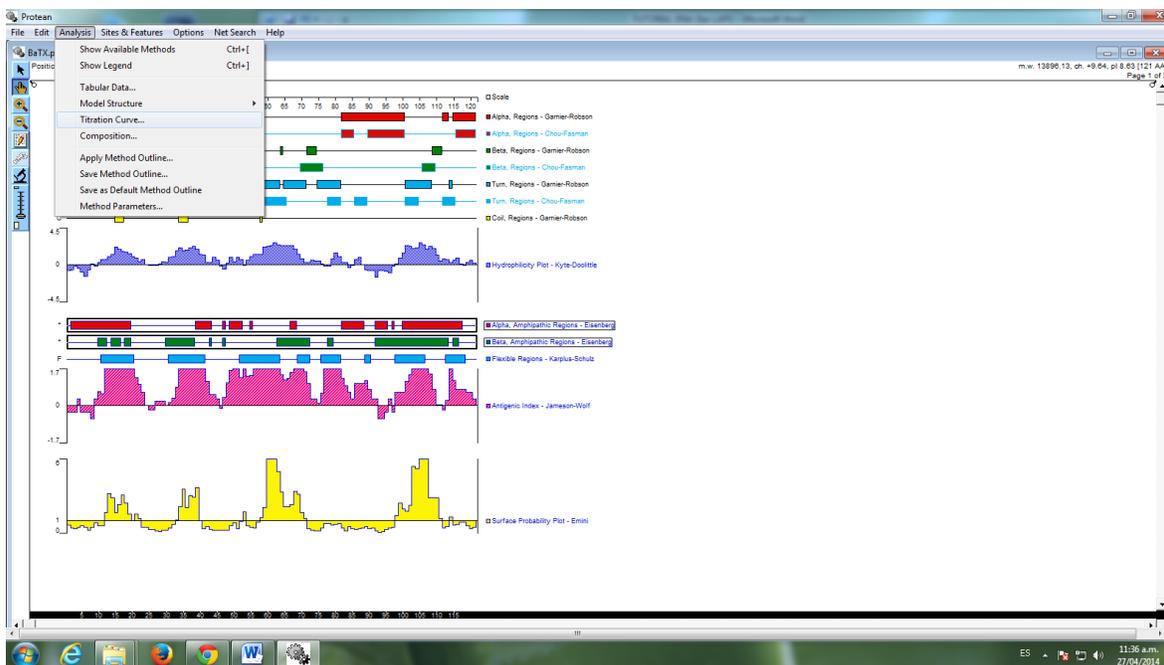


Predicted Structural Class of the Whole Protein: Alpha
DeLéage & Roux Modification of Nishikawa & Ooi 1987

Analysis		Whole Protein	
Molecular Weight		13896.13	m.w.
Length		121	
1 microgram =		71.962	pMoles
Molar Extinction coefficient		28420±5%	
1 A(280) =		0.49	mg/ml
Isoelectric Point		8.63	
Charge at pH 7		9.64	

Whole Protein Composition Analysis			
Amino Acid(s)	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (R/K/HY/CDE)	61	57.11	50.41
Acidic (DE)	12	10.54	9.92
Basic (NR)	22	21.10	18.18
Polar (NCQSTY)	46	39.77	38.02
Hydrophobic (A/LFWV)	26	20.05	21.49
A Ala	7	3.58	5.79
C Cys	14	10.39	11.57
D Asp	6	4.97	4.96
E Glu	6	5.57	4.96
F Phe	1	1.06	0.83
G Gly	9	3.70	7.44
H His	1	0.99	0.83
I Ile	3	2.44	2.48
K Lys	18	16.60	14.88
L Leu	10	8.14	8.26
M Met	1	0.94	0.83
N Asn	7	5.75	5.79
P Pro	4	2.80	3.31
Q Gln	3	2.77	2.48
R Arg	4	4.50	3.31
S Ser	5	3.13	4.13
T Thr	5	3.64	4.13
V Val	3	2.14	2.48
W Trp	2	2.68	1.65
Y Tyr	12	14.09	9.92
B Asx	0	0.00	0.00

- 3.4. En otra dirección también podemos obtener la información correspondiente a la determinación del pI calculado, a través de la opción “Analyses”, opción: Titration Curve.



ANEXO 8: PRESUPUESTOS DE LOS PROYECTOS 2012-00060 Y 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012

TABLA N° 16: Presupuesto del Proyecto 2012-00060

COMPONENTES	Ppto (S/.)
1.- Aislamiento de bacterias de la microbiota de <i>Engraulis ringens</i>	5,757
2.- Selección de bacterias productoras de hidrolasas (lipasas y proteasas) y Y-proteobacterias con alto contenido de EPA.	47,434
3.- Caracterización de genes involucrados en la síntesis de EPA e aislamiento y purificación de hidrolasas (lipasas y proteasas).	58,433
4.- Caracterización enzimática de hidrolasas (lipasas y proteasas) y estudio genómico funcional por análisis bioinformático de genes involucrados en la síntesis de EPA.	40,154
TOTAL PROYECTO	151,777

- ❖ Proyecto 2012-00060: “Bioprospección de genes, lipasas y proteasas de la microbiota (bacteriana) de *Engraulis ringens* (Anchoveta peruana) de interés en la industria de la harina y aceite de pescado”

TABLA N° 17: Presupuesto del Convenio N° 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012

COMPONENTES	Ppto (S/.)
1. Establecimiento de un protocolo optimizado y estandarizado para el análisis cualitativo del aceite de anchoveta mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF.	87,000
2. Establecimiento de un protocolo optimizado y estandarizado para el análisis cuantitativo del aceite de anchoveta mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF.	25,000
3. Desarrollo de los protocolos cualitativo y cuantitativo para el monitoreo las reacciones biocatalíticas de ácidos grasos poliinsaturados de aceite de anchoveta.	40,000
4. Gestión y Cierre del Proyecto	20,000
5. Actividades transversales	169,294
TOTAL PROYECTO	341,294

- ❖ Convenio N° 058-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2012: “Aplicación de la Espectrometría Doble Masa MALDI-TOF/TOF para el análisis de aceites de Anchoveta y procesos Biotecnológicos de valorización”

ANEXO 9: CERTIFICADO CAMPOSOL S.A - BIOTEC C.M.C



Camposol S.A – Biotec C.M.C

Entregan el siguiente Certificado a:

Diana Karen Davila Delgado



Por haber participado en el Proyecto 2012-00060:

**“BIOPROSPECCIÓN DE GENES, LIPASAS Y PROTEASAS DE LA MICROBIOTA (bacteriana)
DE *Engraulis ringens* (anchoveta peruana) DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA DE LA
HARINA Y ACEITE DE PESCADO”**

Desde el 16 de Diciembre del 2013 al 5 de Setiembre del 2014

Desarrollando las siguientes actividades:

1. Colecta de muestras.
2. Aislamiento y purificación de microorganismos bacterianos.
3. Caracterización microbiológica de la colección de cultivos bacterianos de la microbiota de *Engraulis ringens*.
4. Identificación molecular de cepas bacterianas de la microbiota de *Engraulis ringens* (16S RNA, análisis filogenético).
5. Selección de bacterias productoras de proteasas extracelulares con alto rendimiento (ensayos en placa y sustratos cromogénicos).
6. Purificación de proteasas con alto porcentaje de hidrólisis y fragmentación proteica (HPLC, SDS-PAGE, MALDI).

Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

*Jefe de Proyectos
Proyectos I&D Biotec - Copeinca*

Gabriel Moray León M.Sc.

*Jefe de Laboratorio
Biotec - Camposol*

ANEXO 10: CERTIFICADO COPEINCA S.A.C – BIOTEC C.M.C Y PROGRAMA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PERÚ

Copeinca S.A.C – Biotec C.M.C y programas de Ciencia y Tecnología Perú

Entregan el siguiente Certificado a:

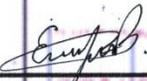
Diana Karen Davila Delgado

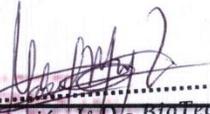
Por haber participado en el Proyecto PIPEI-4-P-058-
“**APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DOBLE MASA MALDI-TOF/TOF PARA EL ANÁLISIS DE ACEITES DE ANCHOVETA Y PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS DE VALORIZACIÓN**”

Desde el 2 de Setiembre del 2013 al 5 de Setiembre del 2014

Desarrollando las siguientes actividades:

1. Establecimiento del índice de saponificación del aceite de *Engraulis ringens* CHD.
2. Establecimiento del índice de acidez del aceite de *Engraulis ringens* CHD.
3. Estabilización de emulsiones OW de aceite de *Engraulis ringens* CHD.
4. Hidrólisis enzimática del aceite de *Engraulis ringens* CHD.


Blgo. Eder Flores Bedregal
Coordinador General
FIDECOM - Copeinca


Gabriel Morey León M.Sc.
Jefe de Laboratorio
Biotec - Camposol


Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
Jefe de Proyectos
Proyectos I&D Biotec - Copeinca