

Universidad Católica Santa María
Escuela de Postgrado
Doctorado en Ciencias Ambientales



APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN *Pleurotus ostreatus* (HONGO OSTRA), COMO RESPUESTA A LA BIO-ACUMULACIÓN DE PLOMO (PB).

Tesis Presentada por el Maestro:

Huaraya Chambi, Froilan Rodolfo

Para optar el grado académico de

Doctor en Ciencias Ambientales

Asesor

Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto

Arequipa - Perú

2022

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 16 de Noviembre del 2022

Dictamen: 005169-C-EPG-2022

Visto el borrador de tesis del expediente 005169, presentado por:

2013004571 - HUARAYA CHAMBI FROILAN RODOLFO

Titulado:

**APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PLEUROTUS OSTREATUS
(HONGO OSTRA), COMO RESPUESTA A LA BIO-ACUMULACIÓN DE PLOMO (PB).**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

3191 - PONCE SOTO LUIS ALBERTO
DICTAMINADOR



6944 - PONCE MALLEA MARCO ADRIAN
DICTAMINADOR



5429 - BOCARDO DELGADO EDWIN FREDY
DICTAMINADOR



5428 - DAVILA FLORES BENJAMIN JOSE
DICTAMINADOR



3103 - JIMENEZ PACHECO HUGO GUILLERMO
DICTAMINADOR



DEDICATORIA.

Al que permite mi existencia y la razón de ser en esta Vida Gracias **DIOS SEÑOR.**

A mis Queridos **Padres, Roberto y Clara** quienes me dieron vida, educación, apoyo y consejos, me guiaron y seguirán haciéndolo por el sendero del buen camino.

A mis Amados Hijos, **Raquel, José Alejandro y Gabriel**, que retoñan en todo momento Mis ojos y le dan sentido y propósito en este caminar llamado **Vida**

A **Lili** mi amada esposa y compañera en todo, gracias por compartir tu vida al lado mío en esta empresa que se llama Familia

AGRADECIMIENTOS.

A la escuela de post grado de la UCSM por ser parte de mi formación y logros Académicos.

Al Dr. Gustavo Obando Pereda, por su valioso aporte como Asesor en el desarrollo de mi tesis.

Al Professor Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. Coordinador del Laboratorio F-401, de Química de Proteínas, por permitirnos llevar a cabo, parte del desarrollo experimental.

A Dictaminadores de la presente Tesis, por sus valiosos aportes y sugerencias con el curso del desarrollo apropiado de mi tesis.

Mi eterno Agradecimiento a las personas que a través de sus opiniones, aportes y consejos han contribuido en el desarrollo de este trabajo llamado Tesis. **Gracias Amigos**

RESUMEN.

Los avances en el conocimiento de los hongos como aliados de importancia económica, no solo en la alimentación sino también como una alternativa en la solución de problemas ambientales, como agentes Biorremediadores de espacios contaminados, encontrándose que estos hongos son, además, muy buenos en la Bioacumulación de metales pesados como el Plomo, cuya habilidad radica principalmente en la funcionalidad de sus procesos Fisiológicos y Bioquímicos.

Es así que esta investigación se centra en conocer la capacidad de degradación y Bioacumulación que tiene *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra), perteneciente a la familia Pleurotaceae. Esta capacidad que tiene *Pleurotus* se centra en identificar los factores que rigen el funcionamiento metabólico, en actualidad estos procesos de bioacumulación aún tienen grandes expectativa y resultados aún impredecibles.

En el presente estudio, por una aproximación proteómica se determinó los niveles de expresión de la especie *Pleurotus ostreatus*, de tres localidades diferentes de la región Cusco, en nuestro país y a través de los resultados de aproximación proteómica, hemos podido establecer que sus niveles de expresión se encuentran de acorde con los reportados por la literatura, respecto de la expresión de enzimas oxidativas manganeso-peroxidasa, tal como fue evidenciado en los estudios de homología secuencial, al mostrar un alto grado de homología e identidad de regiones conservadas, en las enzimas (3) estudiadas de *Pleurotus ostreatus*, en cuyos alineamientos de los péptidos secuenciados con alta homología secuencial, podemos sugerir que estas enzimas son extremadamente importantes en el proceso de Biorremediación.

Palabras Clave: *Pleurotus ostreatus*, biorremediación, proteómica, cromatografía, espectrofotometría de masas.

ABSTRACT

Advances in the knowledge of fungi as allies of economic importance, not only in food but also as an alternative in solving environmental problems, as bioremediation agents of contaminated spaces, finding that these fungi are also very good at Bioaccumulation of heavy metals such as Lead, whose ability lies mainly in the functionality of its Physiological and Biochemical processes.

Thus, this research focuses on understanding the degradation and bioaccumulation capacity of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom), belonging to the *Pleurotaceae* family. This ability that *Pleurotus* has focuses on identifying the factors that govern metabolic functioning, currently these bioaccumulation processes still have great expectations and still unpredictable results.

In the present study, through a proteomic approach, the expression levels of the *Pleurotus ostreatus* species were determined from three different locations in the Cusco region, in our country, and through the results of the proteomic approach, we have been able to establish that their expression levels are in agreement with those reported in the literature, regarding the expression of manganese-peroxidase oxidative enzymes, as evidenced in sequence homology studies, showing a high degree of homology and identity of conserved regions, in the enzymes (3) studied from *Pleurotus ostreatus*, in whose sequenced peptide alignments with high sequence homology, we can suggest that these enzymes are extremely important in the bioremediation process.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, bioremediation, proteomics, chromatography, mass spectrophotometry.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS.....	2
OBJETIVOS	2
Objetivo General.	2
Objetivos Específicos.....	2
CAPITULO I. MARCO TEORICO.....	3
1. Reino Fungí	3
1.1. Biología de los hongos	3
1.2. Ecología de los Hongos	4
1.3. Clase Basidiomycetes.....	5
2. La Biorremediacion.....	10
2.1. Técnicas de biorremediación	10
3. Proteomica	11
3.1. Tipos de Estudio Proteómicos	11
3.2. Tecnología de la Proteómica.....	12
3.3. Factores del Desarrollo Proteómico.....	12
3.4. La electroforesis en la proteomica.....	12
4. Análisis de Antecedentes Investigativos:	12
CAPITULO II. METODOLOGIA.....	15
1. Purificación:	15
2. Espectrometría de masas en Tándem	16
3. Estudio y análisis BIOINFORMATICO.....	16
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	17
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	38

INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha producido un considerable avance en la Biotecnología ambiental, en el uso y aplicación de diferentes organismos vivos para la Biorremediación de diferentes compuestos, muchas veces de naturaleza tóxica en lugares o medios contaminados, estos procesos de Biorremediación ofrecen una alta especificidad en la remoción tanto en sistemas *in situ* como *ex situ*. El uso de hongos blancos de putrefacción en los procesos de Biorremediación de metales pesados es una tecnología ambiental muy prometedora la cual está siendo poco estudiada. Los estudios actuales se centran en la capacidad de degradar compuestos persistentes. El presente trabajo pretende descifrar, cuáles son los elementos clave que la genética molecular de *Pleurotus ostreatus* hace participar en la tolerancia y acumulación de metales pesados, con énfasis en el plomo (Pb), desde una perspectiva de aproximación proteómica diferencial. Los resultados podrían evidenciar el intrincado equilibrio que se mantiene en el interior de las células para hacer efectivo el sistema de acumulación.

Por otro lado, se ha descrito el funcionamiento del interior del tejido de un hongo cuando se somete a unas concentraciones elevadas de metales pesados. Es razonable pensar que si se comprende dicho funcionamiento es sólo una cuestión temporal diseñar y obtener soluciones adecuadas a todos los problemas derivados de la contaminación por metales pesados. El conocimiento de todos los procesos descritos hasta ahora puede permitir mejorar la entrada y acumulación de metales pesados, sin grave perjuicio para la célula.

El presente estudio pretenderá resolver algunas interrogantes sobre la base de la aproximación proteómica diferencial de proteínas y/o enzimas con capacidad de responder a un proceso de bioacumulación de plomo (Pb), por *Pleurotus ostreatus*, por su tolerancia al plomo (Pb) desde una perspectiva de biorremediación.

HIPOTESIS

Se conoce que distintas comunidades de hongos han colonizado suelos enriquecidos naturalmente o contaminados por metales pesados, acumulando en sus tejidos elevadas concentraciones de estos elementos, provocando en ellas diversas respuestas de orden proteómico diferencial, que se traducen en mecanismos de resistencia expresados en tolerancia y evitamiento dependientes de la especie de hongo, del metal pesado en particular y de las condiciones medioambientales.

Por lo que se postula que:

- a) *Pleurotus ostreatus*, crece en la desembocadura de efluentes mineros, en concentraciones de plomo (Pb), expresarán proteínas o enzimas con capacidad de bioacumulación de plomo (Pb).
- b) *Pleurotus ostreatus*, crece en la desembocadura de efluentes mineros, en distintas concentraciones de plomo (Pb), responderán de forma distinta, o sea NO expresarán proteínas o enzimas con capacidad de bioacumulación de plomo (Pb).

OBJETIVOS

Objetivo General.

- a. Identificar las proteínas y/o enzimas de *Pleurotus ostreatus*, por su tolerancia al plomo (Pb), desde una perspectiva de aproximación proteómica diferencial.

Objetivos Específicos.

- a. Identificar proteínas y/o enzimas de *Pleurotus ostreatus*, por su relación masa y punto isoelectrico por electroforesis bidimensional (2D).
- b. Secuenciar las proteínas y/o enzimas de *Pleurotus ostreatus* por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF.
- c. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias, sobre la base de un proceso de bioacumulación.

CAPITULO I. MARCO TEORICO

1. Reino Fungí

Los hongos (moho en latín) son uno de los grupos de organismos conocidos por la biología que se clasifican. Está formado por más de 144.000 especies de hongos, entre los que se encuentran las levaduras, los mohos y las setas, que comparten características básicas como la inmovilidad, la heterotrofia y las estructuras celulares específicas. Se calcula que hay alrededor de 1,5 millones de estos hongos, y si se incluyen los hongos asociados a los insectos, la cifra podría llegar a los 3 millones. Esta cifra se calculó a partir de un estudio británico que concluyó que hay unas cuatro especies de hongos por planta, pero en los trópicos esta proporción no se aplica y debe ser ocho veces mayor.

Los hongos se encuentran en muchos lugares del mundo y tienen muchas formas. La imagen que tenemos de los hongos es la de una seta con un sombrero y un cuerpo blanco alargado, pero ésta es sólo una de las muchas especies de hongos conocidas (1).

1.1. Biología de los hongos

Los hongos son un grupo monofilético de eucariotas no fotosintéticos (con un ancestro común) (2). Las células fúngicas están rodeadas de paredes químicamente complejas, que siempre contienen grandes proporciones de polisacáridos (1). La quitina es una de ellas y se encuentra en la mayoría de los hongos. Sin embargo, la composición cualitativa y cuantitativa de la quitina es muy variable y ha demostrado ser una valiosa herramienta taxonómica. La composición y estructura de la membrana celular no difiere de la de otros eucariotas, pero a diferencia de los protozoos y los animales, no tiene colesterol ni sus ésteres, sino que se complementa con otros esteroides como el ergosterol (1, 2). En cuanto a la organización celular, destacan un núcleo más pequeño que en otros eucariotas, un aparato de Golgi menos desarrollado, un eje central difícil de detectar salvo cuando se producen eventos relacionados con la meiosis, y el hecho de que las mitocondrias tengan una membrana interna distribuida en paralelo al eje largo del orgánulo (1). También destaca el hecho de que las mitocondrias

tienen una membrana interna distribuida en paralelo al eje largo del orgánulo. La mayoría de los hongos, a excepción de los grupos taxonómicos menos evolucionados como los Cryptomycota y los Tubomycota, tienen dos tipos básicos de células somáticas o tejido vegetativo (también llamado floema) (2). La unidad estructural y funcional básica de los hongos filamentosos es el micelio, una estructura tubular multicelular. Las células fúngicas de las hifas pueden estar conectadas por septos (septa hyphae) o no (no septa hyphae). Estos septos, que dividen el micelio en compartimentos intercomunicados y no comunicados por la erosión de la pared celular, pueden ser relativamente simples o tan complejos como en los basidiomicetos. Se ha demostrado que la composición estructural del tabique tiene valor taxonómico a nivel de órdenes y clases de hongos (2).

1.2. Ecología de los Hongos

Pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su relación con el sustrato:

Parásitos: Un hongo parásito, sea cual sea su origen, es un parásito que mantiene su existencia en un tejido vivo. De ellos, los que son capaces de crecer y desarrollarse sobre materia orgánica muerta, ya sea en la naturaleza o en cultivo artificial, se denominan "hongos parásitos comensales", lo que significa que son ecológicamente parásitos, pero nutricionalmente decadentes (2).

Saprófitos: Mientras que los hongos parásitos se caracterizan por la materia orgánica viva, los hongos saprófitos son capaces de colonizar cualquier tipo de sustrato orgánico y desarrollar todo su ciclo vital sobre la materia orgánica inerte, independientemente de su origen (2).

La alimentación de estos hongos tiene lugar mediante la solubilización del material colonizado y la posterior liberación de enzimas, seguida de la absorción de materia orgánica. En el caso de los hongos parásitos, el número de macromicetos en esta posición era limitado, mientras que, en el caso de los hongos saprófitos, hay un gran número de hongos especializados en la descomposición de restos orgánicos de origen vegetal. Como ya se ha dicho, es más probable encontrarlas en los grandes bosques, pero también pueden encontrarse en los parques urbanos, en el interior de las grandes ciudades, en los huertos, en las maderas de construcción, en los aserraderos, en las traviesas de los ferrocarriles, en los tallos secos de las hojas en descomposición y en las pequeñas hierbas de los prados, en los restos y el estiércol de las pequeñas plantas de las turberas

(plantas simbióticas) y en los restos de los incendios (plantas de fuego). Setas y hongos (2).

Micorrízicos: Estos hongos se caracterizan por necesitar establecer una relación simbiótica con las raíces de las plantas vasculares para desarrollar su ciclo vital completo. Esta relación se establece mediante la formación de una estructura para el intercambio de nutrientes, que se denomina "micorriza". La micorriza es una relación simbiótica entre las raíces de las plantas y el micelio de un hongo. Desde que Frank describió por primera vez la micorriza en 1885, se han distinguido siete tipos de micorriza según la morfología, las diferencias anatómicas y la clasificación de las plantas y los hongos. Estos siete tipos de micorriza pueden dividirse a grandes rasgos en endomicorriza, ectomicorriza y Estos siete tipos de micorrizas pueden dividirse en tres grupos principales: endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas. Algunos hongos forman diferentes tipos de micorrizas en función de la especie vegetal con la que son simbióticos (2).

1.3. Clase Basidiomycetes

Los basidiomicetos son una división del reino fúngico y comprenden los hongos capaces de producir basidiosporas con basidiosporas. Se trata de una clase de hongos macroscópicos y captadores que incluye hongos comestibles, hongos virulentos, hongos alucinógenos y tipos de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas, como la roya y el tizón (3).

1.3.1. Características de los basidiomicetos

El filo Basidiomycota se considera uno de los filos más evolucionados, junto con el filo Conidiomycota, y se caracteriza por la presencia de una conidia formada por un pie y un sombrero. Sus especies se conocen comúnmente como setas (3).

La diferencia entre estos grupos es que los basidiomicetos tienen un par de núcleos en sus células miceliales, es decir, son binucleados. La presencia de estas dos fases nucleares es normal en los hongos, pero es más importante en los basidiomicetos porque dura más tiempo y favorece la formación de esporas. Por ejemplo, la célula espora, el basidiocisto, produce cuatro esporas en su superficie inmediatamente después de la meiosis (3).

Del mismo modo, el micelio, que forma el talo, la parte subterránea del hongo, tiene un tabique o septo, pero no está completamente cerrado. Por tanto, a diferencia de las paredes celulares de los conidióforos, que también facilitan el intercambio de sustancias citoplasmáticas, en los basidiomicetos los poros se denominan drupolos y son más complejos, permitiendo un control más fino del paso de sustancias entre las células (3).

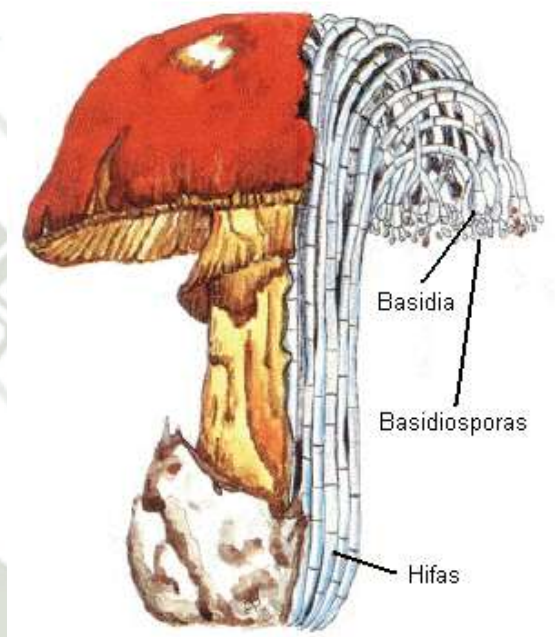


Figura 1. Morfología interna del carpóforo de un basidiomiceto tomado de Ardon, L. 2007 (4).

1.3.2. Ciclo biológico de los basidiomicetos

Los basidiomicetos son un grupo de hongos que suelen reproducirse sexualmente, aunque algunas especies producen esporas asexuales llamadas hifas (5).

La reproducción sexual en los basidiomicetos es principalmente por apareamiento somático, en el que el micelio bifurcado forma un hongo que produce setas (basidiocarpos o basidiocarpos). En esta estructura, las basidiosporas, que son grandes células en forma de varilla, se forman en los extremos de las hifas de los hongos bífidios (4).

El núcleo de cada basidio produce un núcleo diploide, y la meiosis de este núcleo produce cuatro núcleos haploides de cada basidio. Finalmente, en el extremo de

cada basidio se forman cuatro proyecciones en las que migran los núcleos haploides, y esta estructura se convierte en las basidiosporas del haploide, que, al germinar, se convierten en el micelio del haploide (5).

Este micelio puede crecer en todas las direcciones desde el lugar de la transformación, y el micelio puede seguir creciendo indefinidamente mientras haya los nutrientes necesarios del suelo, y se han encontrado más de 890 hectáreas de micelio (5).

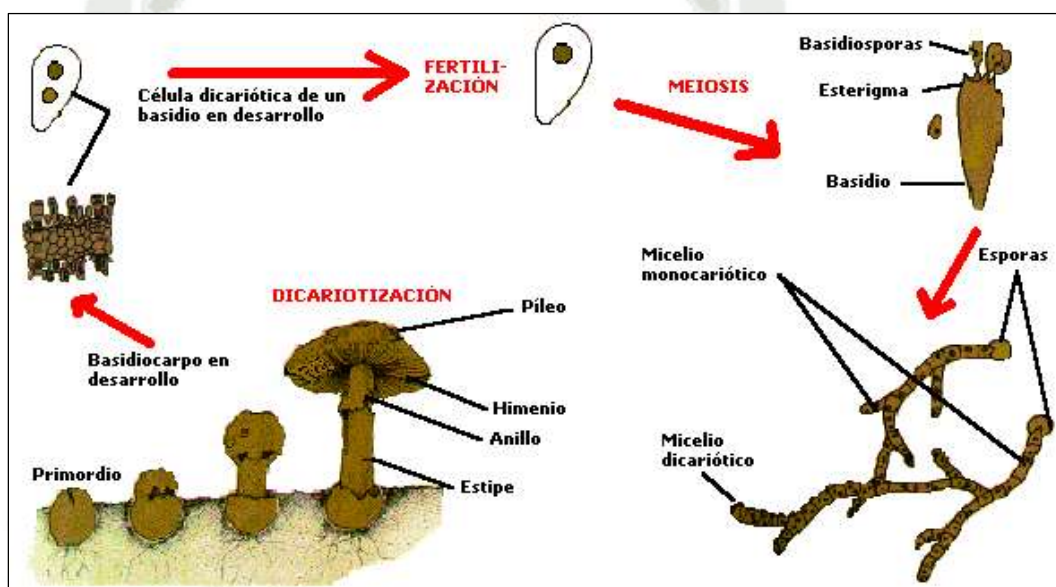


Figura 2: Ciclo de Vida de un Basidiomiceto tomado de Ardon, 2007 (4).

1.3.3. Orden Agaricales

Agaricales, un orden de hongos de los basidiomycota (phylum Basidiomycota, reino Fungi). Agaricus, uno de los órdenes más diversos de Basidiomycota, cuenta con unas 30 familias, 350 géneros y 10.000 especies. Tradicionalmente, el Agaricus se clasificaba según la presencia o ausencia de agallas (finas láminas de células ovoides con esporas) o de conidios en forma de hongo. Hoy en día, el Agaricus se clasifica según su parentesco genético, por lo que puede o no tener branquias, y sus conidios pueden o no tener forma de hongo. En 2017, los científicos desenterraron en el noreste de Brasil, el Período Aptiano del Cretácico Inferior (hace 125-13 millones de años) Se ha descubierto el fósil de hongo agárico más antiguo, el Gondwanagaricites magnificus (6).

1.3.4. Clasificación taxonómica:

Reino	: Fungi
División	: Amastigomycetes
Clase	: Basidiomycetes
Orden	: Agaricales (Alexopoulos, 1985)
Familia	: Pleurotaceae
Género	: Pleurotus
Especie	: <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.ex Fr.) Kumm <i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. ex Fr.) Boedijn
Nombre común	: Seta, Seta Ostra, Girgolas, Pecho de Gallina, Sacha'kallampa.

1.3.5. Características de *Pleurotus*

Los nombres genéricos y latinos de esta seta derivan de su extraño aspecto. El nombre en latín *Pleurotus* se debe a que tiene un asa y patas que crecen contra la parte superior de la cabeza (7). La seta plana tiene un sombrero de entre 5 y 20 cm de diámetro, con las patas inclinadas hacia un lado, y crece encima de otras setas de la misma especie. Su superficie es lisa y brillante, y su color es gris, variando a un tono ligeramente más oscuro, a veces pardo o azulado. Los bordes del capuchón tienen la capacidad de cambiar con la edad, siendo enrollados en los ejemplares más jóvenes y abriéndose en los ejemplares más maduros. Esta seta es una rodaja fina muy firme y descalcificada, de color muy parecido al blanco. La carne de esta seta es muy firme, volviéndose un poco más dura a medida que madura, pero tiene muy buen sabor y aroma. Suele crecer de forma natural en la superficie de tocones y troncos de coníferas de álamo, sauce y haya. La presencia de este hongo es bastante frecuente. La temporada de recolección es en abril, mayo, octubre y noviembre (7).

El *Pleurotus ostreatus* es un hongo completamente libre de grasa, colesterol y gluten, y también es bajo en calorías y contiene la misma cantidad de sodio. El *Pleurotus ostreatus* es una buena fuente de zinc, calcio, potasio, hierro, ácido fólico, niacina, vitamina B1 y vitamina B2. Su mayor contenido en comparación con la carne lo convierte en un alimento ideal para los vegetarianos. Por otro lado,

su alto contenido en potasio lo convierte en uno de los alimentos que pueden ayudar a prevenir las enfermedades del corazón y la hipertensión (7).

La composición nutricional general puede verse en la tabla 1.

Tabla 1 Nutrientes contenidos en el hongo comestible *Pleurotus Spp.* Tomado de Sánchez y Royse, 2001.

Nutriente	Contenido mg/100 g	Nutriente	Contenido mg/100 g
Vitamina C	30-144	Niacina	109
Isoleucina	267	Ácido fólico	65
Leucina	610	Cistina	29
Lisina	287	Fenilamina	233
Metionina	97	Tirosina	189
Triptófano	87	Glicina	281
Valina	310	Prolina	287
Arginina	334	Serina	309
Histidina	107	Tronina	290
Potasio	306	Acido aspártico	570
Ácido glutámico	1041	Alanina	402

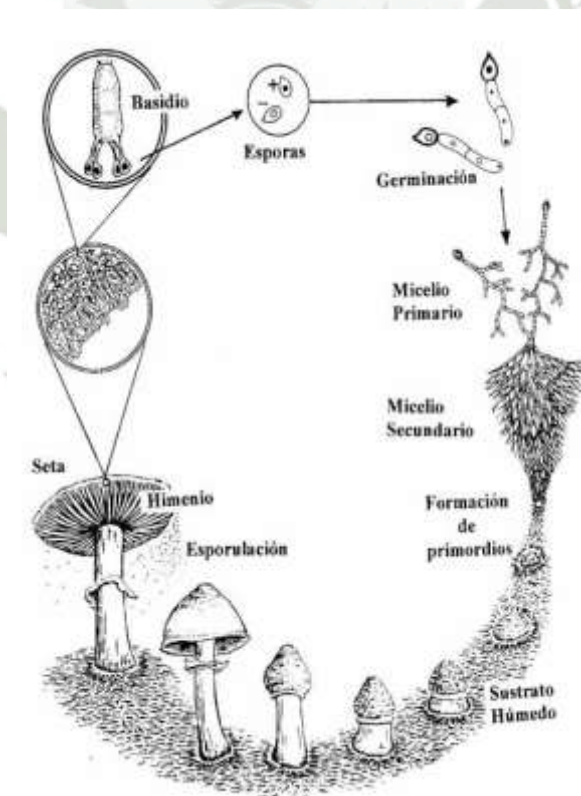


Figura 3. Ciclo de Vida de *Pleurotus spp.* Tomado de Sánchez y Royse, 2001 (8).

2. La Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza la capacidad metabólica de los microorganismos y las plantas para limpiar la tierra y el agua contaminadas (1).

Se define como la mineralización o utilización parcial de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres. Asimismo, la Academia Americana de Microbiología define (8).

La biorremediación es "el uso de organismos vivos para reducir o eliminar los riesgos ambientales causados por daños ambientales causados por la acumulación de productos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos" (9).

La revisión de la literatura muestra que los tratamientos de biorremediación, que utilizan la actividad biológica natural de los organismos vivos, pueden reducir o eliminar los riesgos ambientales derivados de la acumulación de sustancias químicas peligrosas y otros residuos tóxicos (9).

La actividad biológica natural de organismos como las plantas, los hongos y las bacterias puede utilizarse para tratar la tierra, los sedimentos y los suelos (8).

Proporcionan una eliminación eficaz de muchos tipos diferentes de contaminantes. Es importante señalar que el tipo de tratamiento de biorremediación (9).

El tipo de tratamiento de biorremediación empleado y su éxito dependen del estado del suelo, el estado de los recursos afectados, la capacidad de la tecnología de saneamiento, el proceso de tratamiento, el pH, el tiempo de residencia, la concentración del agua tratada, etc. (9).

2.1. Técnicas de biorremediación

2.1.1. Biosorción o Bioacumulación.

El fenómeno de biosorción se caracteriza por la retención del metal mediante la interacción fisicoquímica del metal con los ligandos expuestos extracelularmente pertenecientes a algunas de las moléculas constituyentes de la pared celular, como los grupos carboxilo, amino, hidroxilo e hidroxilo (10).

Tienen grupos funcionales como el carboxilo, el amino, el hidroxilo, el fosfato y los grupos sulfhidrilos. Se trata de un mecanismo cinético rápido que no depende mucho de la temperatura (10).

3. **Proteómica**

La proteómica se centra en el estudio a gran escala de las proteínas, su estructura, función y diversidad, factores clave en una sociedad donde el consumidor es cada vez más consciente de la importancia de la salud y demanda alimentos con funcionalidades. Por ello, la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas es una de las necesidades para el sector que busca este tipo de alimentos saludables (11).

3.1. **Tipos de Estudio Proteómicos**

Existen 3 tipos de proteómica:

a) **La Proteómica de expresión.**

La proteómica de expresión diferencial compara la expresión de proteínas dentro de un proteoma completo o de subproteomas de diferentes muestras permitiendo la identificación de nuevas proteínas implicadas/relacionadas con la transducción de señales o bien que sean específicas de enfermedades (biomarcadores) o situaciones fisiológicas particulares. Finalmente, la proteómica funcional es la encargada de la evaluación de actividades proteicas tras el aislamiento de proteínas específicas, con el fin de determinar mecanismos de actuación en distintas situaciones patológicas, interacciones proteína-fármaco y señalización intracelular (12).

b) **La Proteómica estructural, interatómica o mapa celular.**

La proteómica estructural se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional y la secuencia aminoacídica de las proteínas expresadas en un complejo proteico u orgánulo, determinando su localización subcelular e Introducción caracterizando las interacciones proteína-proteína (12).

c) **La Proteómica funcional.**

Estudia los mecanismos de compartimentalización y translocación proteicos para conocer las distintas localizaciones subcelulares de las proteínas, con el fin de entender mejor su función y conocer cómo poder actuar frente a ellas (12).

3.2. Tecnología de la Proteómica.

Este enfoque proteómico se ha convertido en una técnica cada vez más poderosa en la investigación biológica y actualmente permite caracterizar el proteoma del plasma con gran detalle. Los avances en la tecnología proteómica han permitido descubrir varios biomarcadores prometedores en diferentes tipos de cáncer (12).

3.3. Factores del Desarrollo Proteómico.

La proteómica es un campo de la biología cuyo objetivo es estudiar el proteoma. Un proteoma es un conjunto de proteínas expresadas por un genoma, una célula o un tejido. El término proteoma se utilizó por primera vez en 1995. Hubo dos factores decisivos en el desarrollo de la proteómica.

- (1) Por un lado, la secuenciación a gran escala de los genomas (conocemos la secuencia de los genes, pero no su función) (13).
- (2) Por otro lado, el desarrollo de técnicas de separación y análisis de proteínas (electroforesis bidimensional, cromatografía multidimensional, espectrometría de masas) (13).

3.4. La electroforesis en la proteomica.

El análisis proteómico mediante geles implica la electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas, la visualización de estas mezclas de proteínas (por ejemplo, tinción colorimétrica, tintes, etiquetado fluorescente) y la visualización de tipos específicos de proteínas (por ejemplo, tinción de fosfoproteínas y proteínas glicosiladas) (14).

4. Análisis de Antecedentes Investigativos:

Muñoz (2019), realizó una investigación titulada “Microorganismo tolerantes a metales pesados pasivo mineros Santa Rosa”, cuyo objetivo fue conocer la composición microbiana de los suelos del pasivo minero Santa Rosa de Jangas (Ancash, Perú) y su tolerancia a varios metales pesados con el fin de identificar microorganismos promisorios que permitan desarrollar técnicas biotecnológicas para la bioremediación de ambientes contaminados con metales pesados. Los resultados mostraron que las cepas de hongos con mejores índices de tolerancia fueron: *Fusarium temperatum* CTLM05 (Pb^{+2}), *Fusarium temperatum* CTLM08

(Zn^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM18 (Ni^{+2} y Cd^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM12 (Ag^{+1}), *Fusarium inflexum* CTLM22 (Cu^{+2}) y *Penicillium vanluykii* CTLM11 (Cr^{+6}). Las cepas de bacterias con mayores índices de tolerancia fueron *Bacillus licheniformis* SSR18 (Cd^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2}), *Bacillus subtilis* SSR3 (Pb^{+2}), *Serratia sp.* SSR15 (Cu^{+2}), *Serratia sp.* SSR13 (Ag^{+1}) y *Bacillus cereus* SSR01 (Cr^{+6}) (15).

Cuenca, R. (2019), en su investigación titulada “Uso de hongos para la remediación de suelos contaminados por residuos sólidos domésticos en el Perú” cuyo objetivo fue identificar la información disponible sobre el uso de hongos como agentes de remediación de suelos contaminados con residuos sólidos domésticos en Perú, los hongos son considerados importantes como un poderoso método de remediación de suelos (16).

Vallejo, M. (2021), desarrolló una investigación titulada "Utilización de *Lacasa* de *Pleurotus ostreatus* y su Biomasa Residual para la Degradación de Colorantes Azoicos y la Remoción de Metales en Aguas Residuales", tuvo como objetivo diseñar una metodología para demostrar la eficiencia del uso de la matriz residual del cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* para la adsorción de metales contenido en aguas residuales. El diseño de investigación fue experimental (17).

Vilma, J. (2020), “Evaluación de bacterias y hongos potencialmente utilizables para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos” cuyo objetivo fue Evaluar las bacterias y hongos potencialmente utilizables para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Respecto a los resultado se obtuvo que el hongo *Pleurotus ostreatus*, es eficiente en la degradación de hidrocarburos con un 98%, en un lapso de 2 meses, teniendo en cuenta que la concentración inicial fue de 107239,48 mg/kg-1 de hidrocarburos, obteniendo una concentración final de 2729,22 mg/kg-1, en comparación con la bacteria *Exiguobacterium profundum* que obtuvo un porcentaje de degradación del 88% y el consorcio microbiano conformado por las bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* obteniendo una degradación del 95% (18).

Cubas, Z. (2019), “Optimización de la Biorremediación de cianuro a partir de un consorcio bacteriano nativo caracterizado molecularmente: análisis genómicos y

proteómicos” cuyo objetivo fue evaluar la bacteria *Alcaligenes aquatilis* capaz de asimilar cianuro como fuente de nitrógeno. Donde se aplicó un enfoque bottom-up mediante digestión proteolítica de las muestras antes del análisis por espectrometría de masas MALDI TOF/TOF, además de una identificación genómica de enzimas degradadoras de cianuro mediante PCR. Se identificaron en las muestras intracelulares enzimas implicadas en la degradación de cianuro, tales como cianasa, nitrilasa y cianato hidratasa, proteínas transmembrana relacionadas al transporte de compuestos de cianuro como los transportadores MFS y ABC, además, proteínas como la sideróforo sintetasa que participan en la biosíntesis de los sideróforos, que son clave para la resistencia de la cepa al cianuro, el regulador de transcripción CynR, también identificado, cumple la función de modular la expresión de la enzima cianasa en presencia de cianuro. En las muestras exoproteómicas se identificó la enzima nitrilasa. A nivel genómico, se logró la amplificación del gen NHasa. *Alcaligenes aquatilis* tiene el potencial de ser utilizada para la biorremediación en base a sus características genómicas y proteómicas (19).

CAPITULO II. METODOLOGIA

1. Purificación:

a. Etapa I Obtención del extracto bruto

Las setas obtenidas de *Pleurotus ostreatus*, (500 g) fueron trituradas con la ayuda de un molino manual, en 1500 ml de tampón acetato de sodio 0,1 M pH 5,0 durante 24 horas. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 9000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga marca MLW, Tipo T24, modelo 83-47269. El sobrenadante fue filtrado en estopa a fin de poder retirar las partículas grandes y materiales insoluble remanente.

b. Etapa II Precipitación con sulfato de Amonio al 90%

Al sobrenadante de la etapa anterior (850 ml) se le adicionó lentamente, con agitación constante, sulfato de amonio sólido a saturación del 90% (661 g/litro) durante una hora y una hora adicional sobre agitación constante, posteriormente se centrífugo a 9000 rpm durante 30 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en el menor volumen de tampón acetato de sodio 0,1M pH 5,0 luego la mezcla es colocada en saco de diálisis contra el mismo tampón con agitación constante, este tampón fue cambiado hasta que la reacción del sulfato de amonio frente al cloruro de bario fue negativa (39).

c. Etapa III Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

El sistema cromatográfico que fue usado, es el de cromatografía convencional, usando la mini columna Hit Trap Phenyl FF (High sub) 1 ml. HITrap (H&C USA.). Las fracciones purificadas, son colectadas fracciones en muestras de 0.5 mL. por tubo determinándose la actividad proteica. Las fracciones colectadas son utilizadas para determinar la cantidad de picos de proteínas encontrados en la muestra y/o para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C. El flujo fue mantenido constante a 0.5 ml/min y monitoreado a 280 nm.

2. Espectrometría de masas en Tándem

La espectrometría de masa en tándem ESI-CID-MS/MS fue realizada usando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (quadrupole-time of flight; Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado con una fuente de nano spray operado 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 10 eV. 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. Gas argonio fue utilizado para la fragmentación de los iones. Fue realizada una calibración externa con ioduro sódico en una faja de masas a partir de 50 a 800 m/z. Todos los espectros fueron adquiridos con el analizador TOF en modo Vmode (TOF kV=9.1) y voltaje MCP a 2150 V (44).

3. Estudio y análisis BIOINFORMATICO.

A partir de los resultados obtenidos se realizará los estudios de homología secuencial en consulta con las bases de datos disponibles en la red:

EMBL Nucleotide Sequence Database:

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

SWISS-2DPAGE: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database

<http://www.expasy.ch/ch2d/>

SWISS-PROT: Annotated protein sequence database

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

WORLD-2DPAGE: Index to 2-D PAGE databases and services

<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>

<http://www.proteome.com/comments.html>

Posteriormente con la ayuda del software DNA Star, se procederá al estudio Bioinformático de proteínas, el cual revelará informaciones de carácter estructural de las proteínas. Así será posible comparar las regiones y/o dominios específicos que revelará a que familia de proteínas pertenece y la importancia de las mismas.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.

1. Purificación de proteínas a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3), Cusco.

Los resultados de la purificación de proteínas a través de la cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF, muestra un nivel de homogeneidad en la separación de proteínas para las 3 muestras analizadas, donde se destaca la presencia fundamental de 5 picos protéicos, enumerados del 1 al 5 respectivamente (Figura 1 al 3).

Los tiempos de retención se mantuvieron casi uniformes, (± 25.12 min.) para algunas proteínas. Ese criterio fue empleado para escoger el pico 2 de las 3 muestras de *Pleurotus ostreatus* los cuales presentaron tiempos de retención también semejantes (± 37.17 min.).

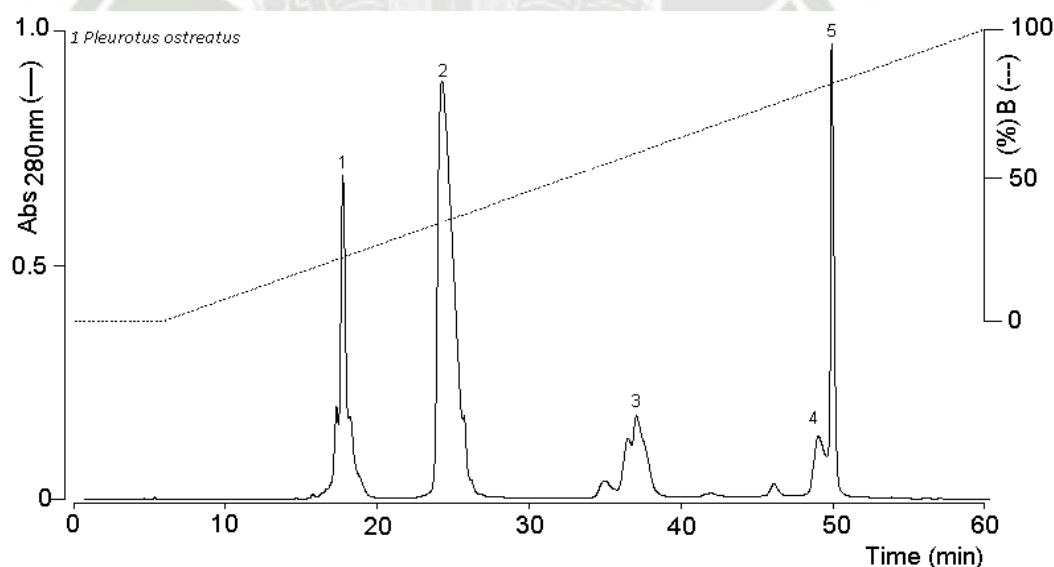


Figura 1. Perfil cromatográfico de la muestra: *Pleurotus ostreatus*, (1), por cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF. La elución de las muestras fue realizada usando una gradiente lineal discontinua (0-100%) de concentración del tampón B. El flujo fue mantenido constante a 1mL/min y monitoreado a 280 nm. Las fracciones enumeradas son de interés y fue seleccionado el pico 2 para su análisis por espectrometría de masa.

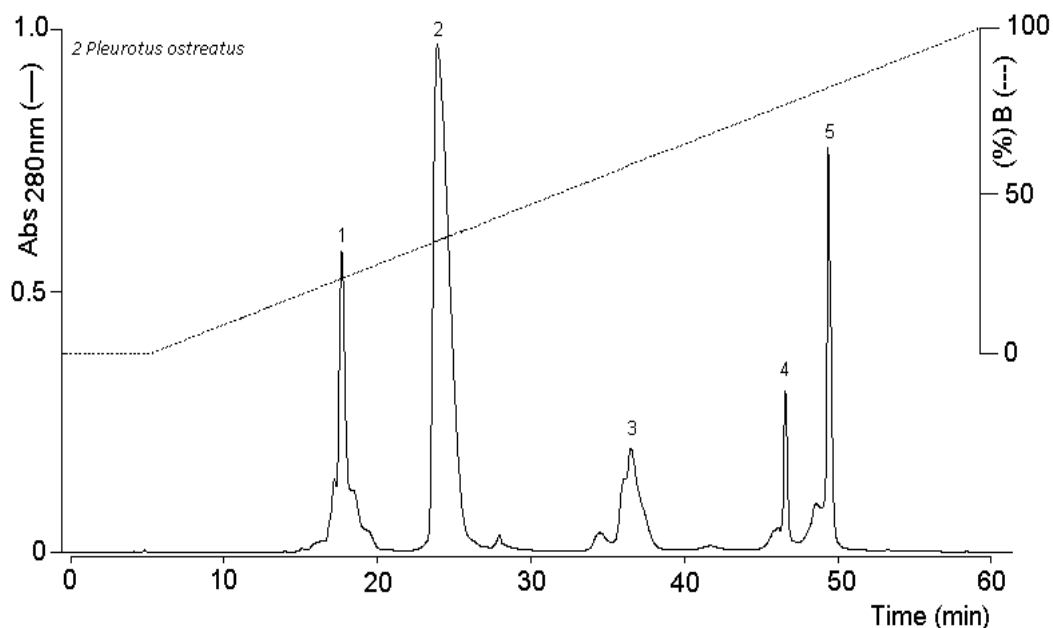


Figura 2. Perfil cromatográfico de la muestra: *Pleurotus ostreatus*, (2), por cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF. La elución de las muestras fue realizada usando una gradiente lineal discontinua (0-100%) de concentración del tampón B. El flujo fue mantenido constante a 1mL/min y monitoreado a 280 nm. Las fracciones enumeradas son de interés y fue seleccionado el pico 2 para su análisis por espectrometría de masa.

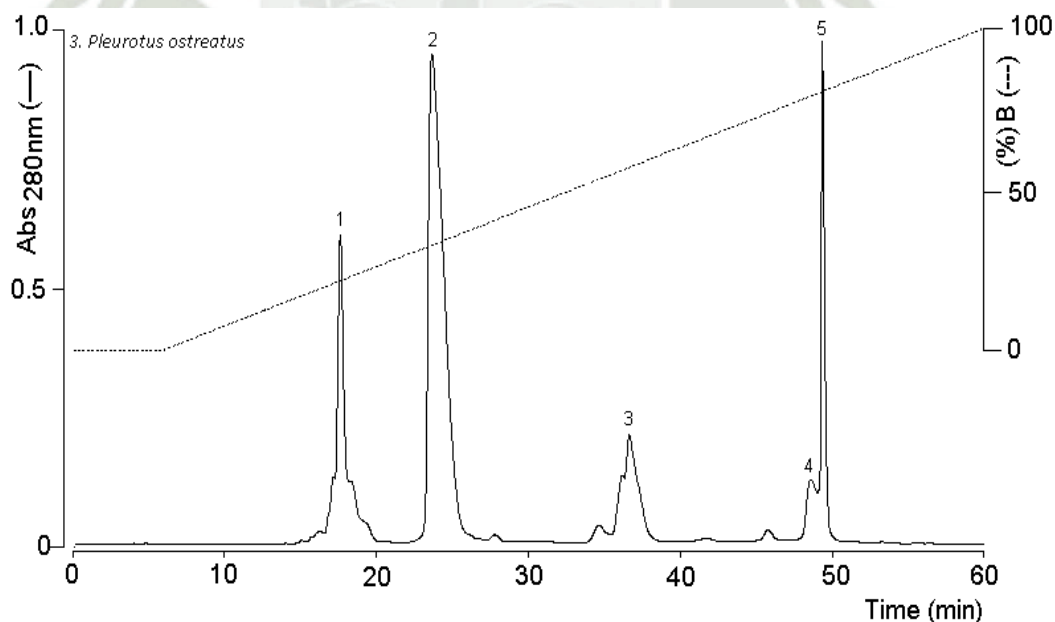


Figura 3. Perfil cromatográfico de la muestra: *Pleurotus ostreatus*, (3), por cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF. La elución de las muestras fue realizada usando una gradiente lineal discontinua (0-100%) de concentración del tampón B. El flujo fue mantenido constante a 1mL/min y monitoreado a 280 nm. Las fracciones enumeradas son de interés y fue seleccionado el pico 2 para su análisis por espectrometría de masa.

2. **Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3), Cusco.**

El perfil de masa molecular en SDS-PAGE, de las muestras estudiadas, evidencian un rango de masas variables que se podrían agrupar en 3 bloques: Uno en torno a: De ± 25 a ± 30 kDa; De ± 30 a ± 40 kDa y de ± 60 a 110 kDa, respectivamente (Figura 6).

Padrones de masa molecular: β -galactosidasa (116kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (36 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (25 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

La proteína seleccionada aparentemente correspondería a aquella que posee una masa molecular de ~ 34 kDa aproximadamente y se ubicaría en el segundo boque de proteínas presentes en el gel de poliacrilamida.

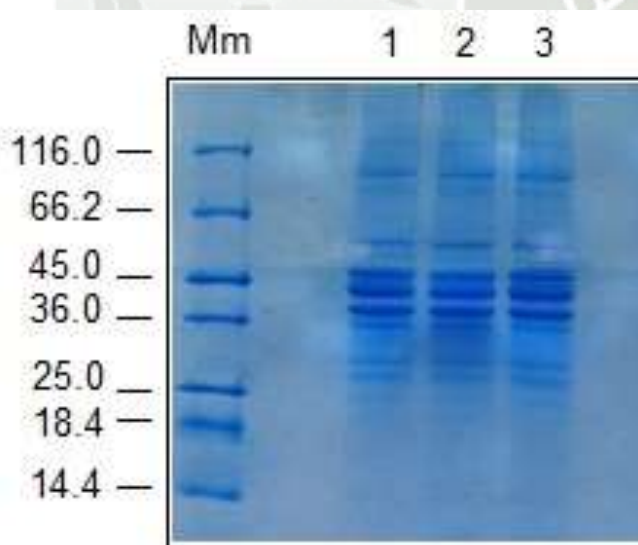


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %) *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3), – Cusco (3). Mm marcadores de masa molecular (kDa).

3. **Identificación de secuencias mediante espectrometría de masas de proteínas a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus*** procedente de Huayllay – Cusco (1), *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3) – Cusco (3).

La masa molecular del pico seleccionado (2) de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), evidencia una masa de 4076.50 m/z (Figura 5). La secuencia del péptido generado por hidrólisis triptica confirma la masa y secuencia:

Nro	Pico	Secuencia	Masa (kDa)
1	2	...HSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDQSQFFIETQLKGR...	4076.50

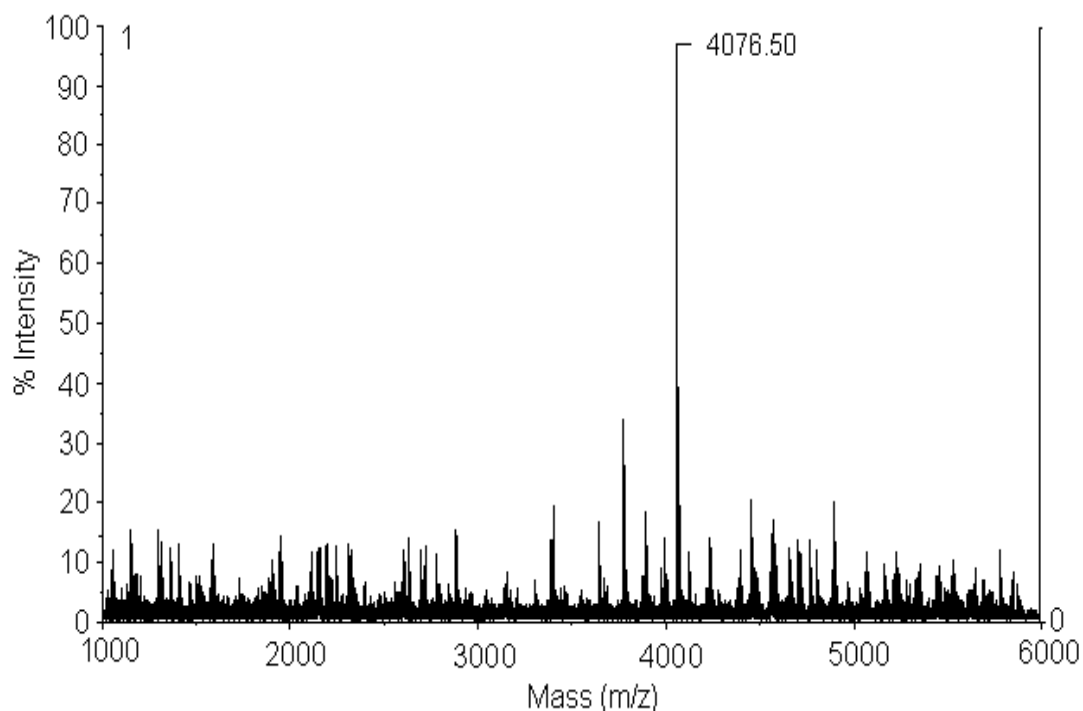


Figura 5. Espectro ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 seleccionado (numerado) del cromatograma por HPLC de fase reversa de la muestra *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1). El espectro de masa ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 del cromatograma muestra una masa promedio de 4076.50 ± 0.100 Da.

La masa molecular del pico seleccionado (2) de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), evidencia una masa de 4240.82 m/z (Figura 6). La secuencia del péptido generado por hidrólisis trípica confirma la masa y secuencia:

Nro	Pico	Secuencia	Masa (kDa)
2	2	...LVPEPFDSVDSILARMSDAGFSPVEVWLLASHSIAAADK...	4240.82

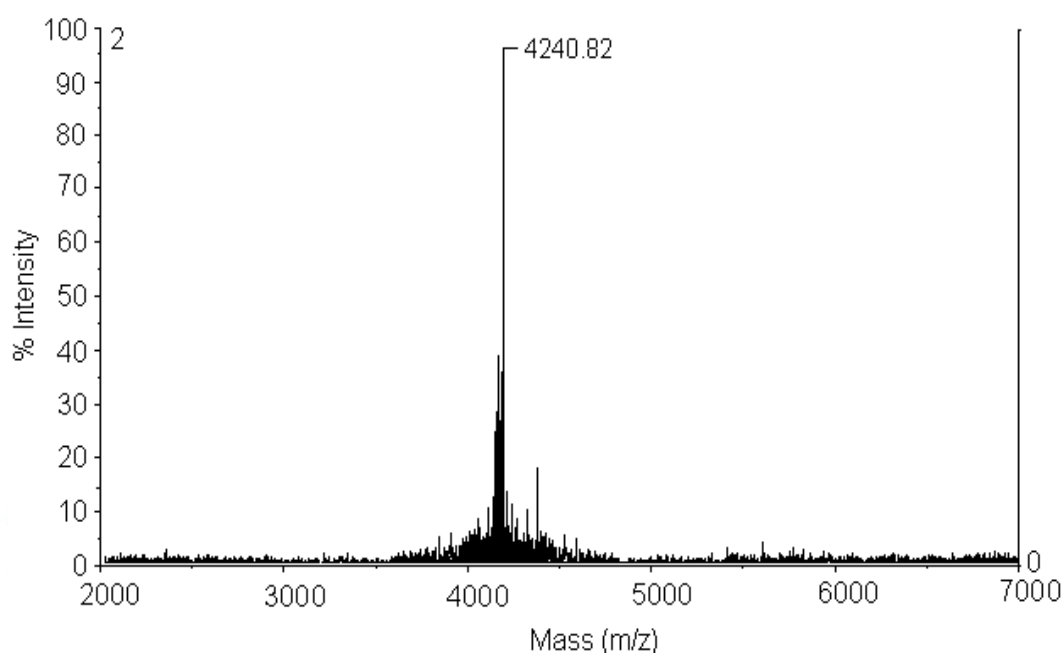


Figura 6. Espectro ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 seleccionado (numerado) del cromatograma por HPLC de fase reversa de la muestras *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2). El espectro de masa ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 del cromatograma muestra una masa promedio de 4240.82 ± 0.100 Da.

La masa molecular del pico seleccionado (2) de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3), evidencia una masa de 3781.12 m/z (Figura 7). La secuencia del péptido generado por hidrólisis trípica confirma la masa y secuencia:

Nro	Pico	Secuencia	Masa (kDa)
3	2	...FSPTLGGGGADGSIIAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQK...	3781.12

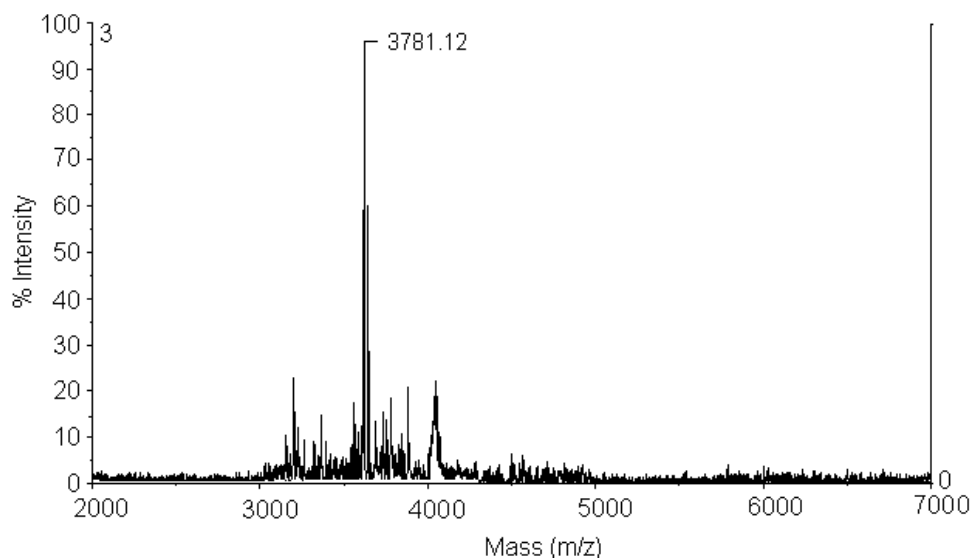


Figura 7. Espectro ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 seleccionado (numerado) del cromatograma por HPLC de fase reversa de las muestras *Pleurotus ostreatus* procedente de *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3). El espectro de masa ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 del cromatograma muestra una masa promedio de 3781.12 ± 0.100 Da.

4. Estudio de homología secuencial (Bioinformática), a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2), *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3) – Cusco.

La Figura 8, muestra los estudios de homología secuencial, por un análisis bioinformático usando el software DNASTar (Ver 6.0) de la proteína correspondiente al pico 2 del cromatograma de HPLC de fase reversa de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1). La secuencia de un péptido tríptico generado del pico en mención, sometido a un análisis de homología secuencial, en la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> revela que se trata de una enzima oxidativa perteneciente a la familia del manganeso peroxidasas, muy común en la familia de los hongos del género *Pleurotus*.

La parte en recuadro representa la secuencia consenso entre las diferentes enzimas oxidativas manganeso peroxidasas disponibles en la base de datos, la cual guarda un alto grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado vía espectrometría de masa.

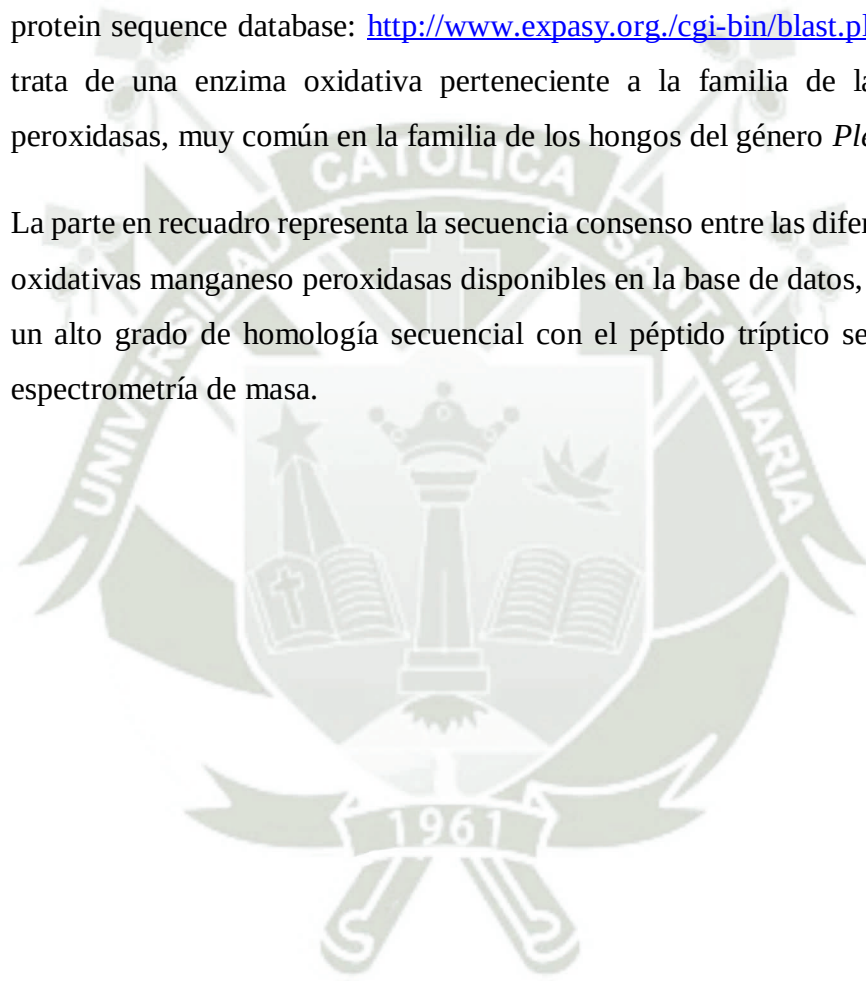
	10										20										30										40										50										60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	M	S	F	K	T	L	S	A	L	A	L	A	L	L	G	A	A	V	Q	F	A	S	A	A	V	P	L	V	Q	K	R	R	V	A	C	C	D	D	G	-	R	T	T	A	T	A	N	A	A	C	C	I	L	F	P	I	L	D	D	I	Q	E	N	L	F	D	G	A	Q	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Q96TS6	M	A	F	K	-	-	-	-	-	-	Q	L	L	T	A	I	S	I	V	S	V	A	N	A	A	L	T	R	R	V	A	C	C	P	D	D	G	V	N	T	T	A	T	A	N	A	A	C	C	S	L	F	A	V	R	D	L	I	Q	D	Q	L	F	D	G	G	E	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Q9UR19	M	S	F	K	T	L	S	A	L	A	L	A	L	G	A	A	V	Q	F	A	S	A	A	V	P	L	V	Q	K	R	A	T	C	A	D	G	-	R	T	T	A	T	A	N	A	A	C	C	V	L	F	P	I	L	D	D	I	Q	E	N	L	F	D	G	A	Q	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	70										80										90										100										110										120										130																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	G	E	E	V	H	E	S	L	R	L	T	F	H	D	A	I	G	F	S	P	T	L	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	A	D	G	S	I	I	A	I	F	D	T	I	E	T	N	F	P	A	N	A	G	I	D	E	I	V	S	A	Q	K	P	F	V	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Q96TS6	G	E	E	V	H	E	S	L	R	L	T	F	H	D	A	I	G	I	S	P	T	I	A	S	T	G	V	F	G	G	G	G	A	D	G	S	I	I	A	I	F	A	E	I	E	T	N	F	H	A	N	N	G	V	D	E	I	I	G	E	Q	A	P	F	I	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Q9UR19	G	E	E	V	H	E	S	L	R	L	T	F	H	D	A	I	G	F	S	P	T	L	-	-	-	-	-	G	G	G	G	A	D	G	S	I	I	A	I	F	D	T	I	E	T	N	F	P	A	N	A	G	I	D	E	I	V	S	A	Q	K	P	F	V	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	140										150										160										170										180										190																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	K	H	N	I	S	A	G	D	F	I	Q	F	A	G	A	V	G	V	S	N	C	P	G	G	V	R	I	P	F	F	L	G	R	P	D	A	V	A	A	S	P	D	H	L	V	P	E	P	F	D	S	V	D	S	I	L	A	R	M	G	D	A	G	-	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Q96TS6	M	T	N	M	T	T	A	D	F	I	Q	F	A	G	A	V	G	V	S	N	C	P	G	A	P	A	L	P	V	F	V	G	R	P	D	A	T	Q	P	A	P	D	K	T	V	P	E	P	F	D	T	V	D	S	I	L	A	R	F	A	D	A	G	G	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Q9UR19	K	H	N	I	S	A	G	D	F	I	Q	F	A	G	A	V	G	V	S	N	C	P	G	G	V	R	I	P	F	F	L	G	R	P	D	A	V	A	A	S	P	D	H	L	V	P	E	P	F	D	S	V	D	S	I	L	A	R	M	S	D	A	G	-	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	200										210										220										230										240										250										260																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	S	P	V	E	V	V	W	L	L	A	S	H	S	I	A	A	A	D	K	V	D	P	S	I	P	G	T	P	F	D	S	T	P	G	V	F	D	S	Q	F	F	I	E	T	Q	L	K	G	R	L	F	P	G	T	A	D	N	K	G	E	A	Q	S	P	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Q96TS6	S	S	A	E	V	V	A	L	L	A	S	H	T	I	A	A	A	D	H	V	D	P	S	I	P	G	T	P	F	D	S	T	P	E	I	F	D	T	Q	F	F	I	E	T	Q	L	R	G	I	L	F	P	G	T	G	G	N	Q	G	E	V	E	S	P	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Q9UR19	S	P	V	E	V	V	W	L	L	A	S	H	S	I	A	A	A	D	K	V	D	P	S	I	P	G	T	P	F	D	S	T	P	G	V	F	D	S	Q	F	F	I	E	T	Q	L	K	G	R	L	F	P	G	T	A	D	N	K	G	E	A	Q	S	P	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	270										280										290										300										310										320																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	Q	G	E	I	R	L	Q	S	D	H	L	L	A	R	D	P	Q	T	A	C	E	W	Q	S	M	V	N	N	Q	P	K	I	Q	N	R	F	A	A	T	M	S	K	M	A	L	L	G	Q	D	K	T	K	L	I	D	C	S	D	V	I	P	T	P	P	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Q96TS6	H	G	E	I	R	L	Q	S	D	S	E	L	A	R	D	S	R	T	A	C	E	W	Q	S	F	V	N	N	Q	A	K	I	Q	S	A	F	K	A	A	F	R	K	M	T	I	L	G	H	S	E	S	S	L	I	E	C	S	S	E	V	I	Q	T	P	P	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Q9UR19	Q	G	E	I	R	L	Q	S	D	H	L	L	A	R	D	P	Q	T	A	C	E	W	Q	S	M	V	N	N	Q	P	K	I	Q	N	R	F	A	A	T	M	S	K	M	A	L	L	G	Q	D	K	T	K	L	I	D	C	S	D	V	I	P	T	P	P	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	330										340										350										360																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1_P_ostreatus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
O94753	L	V	G	A	A	H	L	P	A	G	F	S	L	S	D	V	E	Q	A	C	A	A	T	T	P	F	F	P	A	L	T	A	D	P	G	P	V	T	S	V	P	P	V	P	G	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								

Figura 8. Alineamiento de un péptido triptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1). Los estudios de homología secuencial muestran que se trata de una enzima oxidativa manganeso peroxidasa cuando es sometida a una análisis bioinformático con otras enzimas oxidativas procedentes del banco de datos SWISS-PROT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>): Annotated protein sequence database: *Pleurotus eryngii* (Accession O94753 y Q9UR19, Ruiz-Duenas, F.J., et al., 1999), *Phlebia radiata* (Accession Q96TS6, Moilanen, A.-M., et al., 1996).

La Figura 9 muestra los estudios de homología secuencial, por un análisis bioinformático usando el software DNASTar (Ver 6.0) de la proteína correspondiente al pico 2 del cromatograma de HPLC de fase reversa de *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2).

La secuencia de un péptido tríptico generado del pico en mención, sometido a un análisis de homología secuencial, en la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> revela que se trata de una enzima oxidativa perteneciente a la familia de las manganoso peroxidasas, muy común en la familia de los hongos del género *Pleurotus*.

La parte en recuadro representa la secuencia consenso entre las diferentes enzimas oxidativas manganoso peroxidasas disponibles en la base de datos, la cual guarda un alto grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado vía espectrometría de masa.



	10	20	30	40	50	60	
2_P_ostreatus	-	-	-	-	-	-	0
O94753	M	S	F	K	T	L	64
Q96TS6	M	A	F	K	Q	L	58
Q9UR19	M	S	F	K	T	L	64
	70	80	90	100	110	120	130
2_P_ostreatus	-	-	-	-	-	-	0
O94753	G	E	E	V	H	E	123
Q96TS6	G	E	E	V	H	E	123
Q9UR19	G	E	E	V	H	E	123
	140	150	160	170	180	190	
2_P_ostreatus	-	-	-	-	-	-	21
O94753	K	H	N	I	S	A	187
Q96TS6	M	T	N	M	T	T	188
Q9UR19	K	H	N	I	S	A	187
	200	210	220	230	240	250	260
2_P_ostreatus	S	P	V	E	V	V	40
O94753	S	P	V	E	V	V	252
Q96TS6	S	S	A	E	V	V	253
Q9UR19	S	P	V	E	V	V	252
	270	280	290	300	310	320	
2_P_ostreatus	-	-	-	-	-	-	40
O94753	Q	G	E	I	R	L	317
Q96TS6	H	G	E	I	R	L	318
Q9UR19	Q	G	E	I	R	L	317
	330	340	350	360			
2_P_ostreatus	-	-	-	-	-	-	40
O94753	L	V	G	A	A	H	361
Q96TS6	L	E	G	N	A	H	362
Q9UR19	L	V	G	A	A	H	361

Figura 9. Alineamiento de un péptido triptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2). Los estudios de homología secuencial muestran que se trata de una enzima oxidativa manganeso peroxidasa cuando es sometida a una análisis bioinformático con otras enzimas oxidativas procedentes del banco de datos SWISS-PROT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>): Annotated protein sequence database: *Pleurotus eryngii* (Accession O94753 y Q9UR19, Ruiz-Duenas, F.J., et al., 1999), *Phlebia radiata* (Accession Q96TS6, Moilanen, A.-M., et al., 1996).

La Figura 10 muestra los estudios de homología secuencial, por un análisis bioinformático usando el software DNASTar (Ver 6.0) de la proteína correspondiente al pico 2 del cromatograma de HPLC de fase reversa de *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3).

La secuencia de un péptido tríptico generado del pico en mención, sometido a un análisis de homología secuencial, en la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> revela que se trata de una enzima oxidativa perteneciente a la familia de las manganoso peroxidasas, muy común en la familia de los hongos del género *Pleurotus*.

La parte en recuadro representa la secuencia consenso entre las diferentes enzimas oxidativas manganoso peroxidasas disponibles en la base de datos, la cual guarda un alto grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado vía espectrometría de masa.



	10	20	30	40	50	60	
3_P_ostreatus							0
O94753	M S F K T L S A L A L A L G A A V Q F A S A A V P L V Q K R A T C D D G R T T A N - A A C C I L F P I L D D I Q E N L F D G A Q C						64
Q96TS6	M A F K Q L - - L T - - - - A I S I V S V A N A A L T R R V A C P D G V N T A T N A V C C S L F A V R D L I Q D Q L F D G G E C						58
Q9UR19	M S F K T L S A L A L A L G A A V Q F A S A A V P L V Q K R A T C A D G R T T A N - A A C C V L F P I L D D I Q E N L F D G A Q C						64
	70	80	90	100	110	120	130
3_P_ostreatus							38
O94753	G E E V H E S L R L T F H D A I G F S P T L G - - - - - G G G A D G S I I A F D T I E T N F P A N A G I D E I V S A Q K						123
Q96TS6	G E E V H E S L R L T F H D A I G I S P T I A S T G V F G G G G A D G S I I A I F A E I E T N F H A N N G V D E I I G E Q A P F I Q						123
Q9UR19	G E E V H E S L R L T F H D A I G F S P T L G - - - - - G G G A D G S I I A F D T I E T N F P A N A G I D E I V S A Q K						123
	140	150	160	170	180	190	
3_P_ostreatus							38
O94753	K H N I S A G D F I Q F A G A V G V S N C P G G V R I P F F L G R P D A V A A S P D H L V P E P F D S V D S I L A R M G D A G - F						187
Q96TS6	M T N M T T A D F I Q F A G A V G V S N C P G A P A L P V F V G R P D A T Q P A P D K T V P E P F D T V D S I L A R F A D A G G F						188
Q9UR19	K H N I S A G D F I Q F A G A V G V S N C P G G V R I P F F L G R P D A V A A S P D H L V P E P F D S V D S I L A R M S D A G - F						187
	200	210	220	230	240	250	260
3_P_ostreatus							38
O94753	S P V E V V W L L A S H S I A A A D K V D P S I P G T P F D S T P G V F D S Q F F I E T Q L K G R L F P G T A D N K G E A Q S P L						252
Q96TS6	S S A E V V A L L A S H T I A A A D H V D P S I P G T P F D S T P E I F D T Q F F I E T Q L R G I L F P G T G G N Q G E V E S P L						253
Q9UR19	S P V E V V W L L A S H S I A A A D K V D P S I P G T P F D S T P G V F D S Q F F I E T Q L K G R L F P G T A D N K G E A Q S P L						252
	270	280	290	300	310	320	
3_P_ostreatus							38
O94753	Q G E I R L Q S D H L L A R D P Q T A C E W Q S M V N N Q P K I Q N R F A A T M S K M A L L G Q D K T K L I D C S D V I P T P P A						317
Q96TS6	H G E I R L Q S D S E L A R D S R T A C E W Q S F V N N Q A K I Q S A F K A A F R K M T I L G H S E S S L I E C S E V I Q T P P A						318
Q9UR19	Q G E I R L Q S D H L L A R D P Q T A C E W Q S M V N N Q P K I Q N R F A A T M S K M A L L G Q D K T K L I D C S D V I P T P P A						317
	330	340	350	360			
3_P_ostreatus							38
O94753	L V G A A H I P A G F S L S D V E Q A C A A T P F P A I L T A D P G P V T S V P P V P G S						361
Q96TS6	L E G N A H I P A G Q T M N D I E Q A C A T T P F P S I L S A D P G P A T S V A P V P P S						362
Q9UR19	L V G A A H I P A G F S L S D V E Q A C A A T P F P A I L T A D P G P V T S V P P V P G S						361

Figura 10. Alineamiento de un péptido triptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3). Los estudios de homología secuencial muestran que se trata de una enzima oxidativa manganeso peroxidasa cuando es sometida a una análisis bioinformático con otras enzimas oxidativas procedentes del banco de datos SWISS-PROT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>): Annotated protein sequence database: *Pleurotus eryngii* (Accession O94753 y Q9UR19, Ruiz-Duenas, F.J., et al., 1999), *Phlebia radiata* (Accession Q96TS6, Moilanen, A.-M., et al., 1996).

DISCUSIÓN

Según Howard Hu, (2002), refiere que los metales pesados son metales de masa atómica elevada por lo general del quinto o sexto período de la tabla periódica. Los metales son notables por su amplia gama de usos, su dispersión, su tendencia a acumularse en algunos tejidos del cuerpo humano y su potencial de ser tóxicos aun a niveles de exposición relativamente bajos (20)

Los contaminantes como metales pesados (Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi) tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos. Son potencialmente contaminantes devastadores ya que contaminan el aire, el agua y la tierra (20).

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a nivel mundial, un problema de contaminación de los suelos y cuerpos de agua. Entre las más severas contaminaciones destacan las que se produjeron y todavía se producen por Metales Pesados porque tienden a bioacumularse. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente.

Ton, J. et al., 2001, nos indica que la exposición a metales puede ocurrir a través de una variedad de rutas. Pueden ser inhalados como polvo o humo (por ejemplo, partículas de óxido de plomo en la combustión de gasolina con plomo); otros pueden ser evaporados y por consiguiente inhalados (mercurio en la producción de lámparas fluorescentes). Los metales también pueden ser ingeridos involuntariamente a través de comida o bebida. La cantidad que puede ser absorbida por el tracto digestivo depende de la forma o configuración química, la edad y el estado de nutrición de la persona (21).

Michael McCally, (2002), refiere que el plomo en el suelo tiende a concentrarse en vegetales como en la raíz de la cebolla y será absorbido en mayor cantidad en individuos cuyas dietas son deficientes en calcio, hierro o zinc. La exposición a plomo puede desarrollar problemas de salud como convulsiones, coma, fallo renal y hasta la muerte dependiendo de la dosis. Los niños y los fetos aparecen particularmente vulnerables a efectos neurotóxicos por causa del plomo.

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados y radionuclidos en el medio ambiente. En el caso particular de los suelos, suelen afectar

la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano.

La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad requerida. Además, este tipo de solución no es aplicable en procesos de remediación in situ, ya que es imposible tratar un metal determinado debido a la competencia existente por la presencia de otros. La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado (biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas in situ como ex-situ.

La biorremediación usando hongos blancos de putrefacción es una tecnología muy prometedora la cual está siendo estudiada. Muchos estudios se enfocan en la habilidad que tienen con la degradación de compuestos persistentes, principalmente los de la familia Phanerochaete donde se encuentra el hongo *Pleurotus Ostreatus*. Estos son efectivos porque producen una enzima extra celular que cataliza una reacción que degrada lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones poderosas la enzima requiere peróxido de hidrógeno, lo cual el hongo produce.

Pleurotus ostreatus es un hongo comestible de gran importancia biotecnológica por ser un organismo modelo degradador de lignina. Su genoma contiene nueve genes codificantes de peroxidasas ligninolíticas, características de los hongos de podredumbre blanca. Estos genes codifican seis manganeso-peroxidasas (MnP) y tres peroxidasas versátiles (VP).

Según Durán, Téllez, Pezzella y Díaz, refieren que los diferentes estudios han demostrado que la actividad y número de isoenzimas de las diferentes fenoloxidasas en hongos, dependen de diferentes factores ambientales entre ellos la temperatura, pH, inductores, condiciones de cultivo y la composición del medio (22; 23; 24; 25); asimismo Téllez

(2005), refiere que estas enzimas pueden ser producidas de forma constitutiva o ser inducidas (26).

Cohen y col. (2002), nos dice que las enzimas versátil peroxidasa (EC. 1.11.1.16), son oxidorreductasas capaces de degradar compuestos fenólicos y diversos tipos de compuestos recalcitrantes entre los que se encuentran los colorantes sintéticos. Por lo anterior estas enzimas pueden ser aplicadas en diversas aplicaciones biotecnológicas y sin duda representan una alternativa potencial para la birremediación de contaminantes de diversos orígenes (27).

Una característica en la evolución de las enzimas que componen el sistema oxidativo de los hongos, es la existencia de duplicaciones recientes codificando diferentes isoformas. Dichas isoenzimas difieren escasamente en su secuencia y, a pesar de que existen pocos datos al respecto, deben poseer características diferentes de forma que su expresión confiera al hongo una ventaja evolutiva en determinados hábitats o sustratos (30).

Fernández-Fueyo et al., (2014), refiere que las condiciones óptimas de cultivo coinciden con el máximo de actividad y con el mayor nivel de expresión de los genes (28). Salame et al., (2012; 2013) observó que en condiciones óptimas se expresan dos genes principalmente, MnP3 seguida de VP1 (29; 30). Aunque no se ha encontrado una correlación entre el secretoma y la transcripción de la isoenzima más expresada, Ruíz-Dueñas (2009), analizó el proteoma intracelular detectándose la presencia de esta proteína y demostrándose que su baja secreción era el factor limitante. Sin embargo, sí se observó que la proteína codificada por el segundo gen que más se transcribía era la más abundante en el secretoma. Por otra parte, expresión de los genes de estas peroxidases se ve más afectada por los cambios de pH, temperatura. Existiendo una correlación entre el nivel de expresión y la actividad peroxidasa (31).

Según Baldrian, Valáskova, Merhautová y Gabriel, 2005, citado por Kirk y Farrel (1987), refiere que *Pleurotus ostreatus*, entre otros, son ampliamente conocidos por utilizar como sustratos la celulosa, la hemicelulosa y preferentemente la lignina presente en biomasa de origen vegetal (32). Karigar y Rai, 2011; Kirk y Farrel 1987, nos indica que estos hongos pueden asimilar la lignina debido a que producen enzimas como lacasas, oxidasas y proxidasas, las cuales realizan varias reacciones oxidativas y de rompimiento de compuestos fenólicos y aromáticos complejos que son requeridas en los procesos de

delignificación (33; 34). Dentro de las peroxidasas extracelulares producidas por este tipo de hongos se encuentra la manganeso peroxidasa (MnP; EC.1.11.1.13); esta enzima tiene un alto potencial de uso en aplicaciones biotecnológicas, como degradación de biomasa Baldrian et al., 2005; Kong et al., 2016; Liu, et al., 2019; Morales Fonseca 2014, tratamiento de aguas (32; 35; 36; 37). Bilal y Asgher, 2015, decoloración de tintes para textiles, bioblanqueamiento de pulpa de papel (38); Sasaki Kajino, Sugiyama y Takahashi, 2001, bioremediación (39); Morales-Fonseca y Ruiz-Tovar, 2008, biotransformación y desintoxicación de compuestos aromáticos ambientales persistentes (40); Baborová, 2006; Ergun y Urek, 2017; Karigar y Rao, 2011; Numir et al., 2015; Quevedo-Hidalgo, Narvaez-Rincón, Pedrosa-Rodriguez y Velásquez-Lozano, 2012 y química verde la producción de compuestos químicos de alto valor a partir de lignina (41; 42; 43).

El objetivo del presente estudio justamente radica en conocer una aproximación proteómica de los niveles de expresión de las especies de *Pleurotus ostreatus* de 3 localidades de la región Cusco – Perú, y a través de los resultados de aproximación proteómica, hemos podido establecer que sus niveles de expresión se encuentran de acorde con los reportados por la literatura, respecto de la expresión de enzimas oxidativas manganeso-peroxidasa, tal como fue evidenciado en los estudios de homología secuencial, al evidenciar un alto grado de homología e identidad de regiones conservadas, mostrados en las figuras 8 al 10, en cuyos alineamientos de los péptidos secuenciados, podemos sugerir que estas enzimas son extremadamente importantes en el proceso de bioremediación.

Es probable que puedan co-existir algunas isoformas que se encuentre en las especies estudiadas en nuestro medio, lo cual podría ser abordado desde un estudio proteómico funcional, más completo, lo que se sugiere continuar más adelante.

CONCLUSIONES

En el presente estudio de aproximación proteómica se ha podido evidenciar que las especies de *Pleurotus ostreatus* de diferentes zonas, revelan niveles de expresión proteica semejante, relación a la presencia de enzimas oxidativas como manganoso peroxidasa. La distribución geográfica probablemente podría revelar algunas mutaciones en esta familia de proteínas, lo cual torna más interesante el estudio, en el sentido de tratar de inferir la participación de cada aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica, los cuales no se podrían encontrar en la región consenso de la secuencia sino en las regiones variables.

Estudios ulteriores de mutagénesis sito-dirigida podrían revelarnos estas valiosas informaciones respecto de esta familia de proteínas que son cruciales en los procesos de biorremediación desde el punto de vista biotecnológico.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rekondo, J. El reino Fungi y la importancia de los hongos. Deia.eus. [citado el 5 de agosto de 2021]. [En línea] Disponible en: <https://blogs.deia.eus/ser-natural/2019/09/25/el-reino-fungi-y-la-importancia-de-los-hongos/>.
2. Jiménez-Santos, J. Amanitacesarea.com. [En línea] 2020. [citado el 5 de agosto de 2021] Disponible en: <http://www.amanitacesarea.com/>.
3. Redacción. Basidiomicetos. Flores.ninja. [En línea] 2017. [citado el 5 de agosto de 2021] Disponible en: <https://www.flores.ninja/basidiomicetos/>.
4. Ardón, L. Producción de hongos comestibles, informe investigación, maestría docencia universitaria con especialidad en evaluación educativa. Facultad de humanidades, universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala. [En línea] 2007.
5. Rodríguez-Salazar. Bióloga N. Basidiomicetos: ciclo biológico, estructura o partes. Paradais-sphynx.com. [En línea] 2018. [citado el 5 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://naturaleza.paradais-sphynx.com/fungi/basidiomicetos.htm>.
6. Agaricales. Delhipages.live. [En línea] 2020. [citado el 5 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://delhipages.live/ciencias/biologia/hongos-protistas-y-virus/agaricales>.
7. Sarmiento, L. Champiñón ostra (Pleurotus ostreatus). Jardineria On. [En línea] 2018. [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.jardineriaon.com/champinon-ostra-pleurotus-ostreatus.html>.
8. Sánchez, J. E. y Royse, D. La Biología y el cultivo de Pleurotus spp. (1a. Ed.) México: Edit. Noriega Editores. [En línea] 2001.
9. De la minería aurífera en Colombia B en ARCCC y. MG en el P, De una revisión de la minería aurífera en Colombia B en ARCCC y. MG en el P, De una revisión bibliográfica entre los años a. P. Mónica Isabel Cartagena David. Edu.co. [En línea] 2019. [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/13927/1/CartagenaM%C3%B3nica_2019_Biorremediaci%C3%B3nCianuroMiner%C3%ADa.pdf.

10. De Ingeniería Ambiental EAP. Universidad Nacional de Cajamarca. Edu.pe. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3392/TESIS%20BIOSORCI%20C3%93N%20-%20UNIVERSIDAD%20NACIONAL%20DE%20CAJAMARCA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
11. Hurtado, E. Diez aplicaciones de la proteómica para empresas de alimentación. Ainia.es. 2020. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/aplicaciones-proteomica-empresas-alimentacion/>.
12. García, PD. Caracterización Proteómica de la Célula B Tumoral de la Leucemia Linfocítica Crónica y su Contrapartida Celular Normal. Usal.es. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/137441/CIC_D%C3%ADezGarciaP.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
13. UCM-Genómica y Proteómica. Ucm.es. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ucm.es/gyp/proteomica>.
14. Juárez, C. Proteómica: sus beneficios en la alimentación, salud y nutrición. Thefoodtech.com. [En línea] 2020. [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://thefoodtech.com/nutricion-y-salud/proteomica-su-utilidad-en-la-ciencia-alimentaria>.
15. Muñoz-Silva L, Olivera-Gonzales P, Santillán-Torres M, Tamariz-Angeles C. *Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa*. Jangas (Perú) : Rev Peru Biol. 2019;26(1):109–18.
16. El Perú” “Uso D. E. Hongos Para L. A. Remediación D. E. Suelos Contaminados Por Residuos Sólidos Domésticos E. N. Facultad de Ciencias Ambientales Carrera Profesional de Ingeniería Ambiental. Edu.pe. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1382/TB-Cuenca%20R.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

17. Buap.mx. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en:
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/12695/20210317190412-6878-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
18. De Ingeniería Ambiental C. Universidad Agraria del Ecuador. Edu.ec. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en:
<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JIMENEZ%20VELEZ%20VILMA%20CECIBEL.pdf>.
19. De Biotecnología Ambiental. Universidad Nacional de Tumbes. [En línea] 2019.
<http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/409/TESIS%20DE%20MAESTRIA%20-%20CUBAS%20ZU%c3%91IGA%20-%20Acceso%20Restringido.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
20. H., Hu. *Life Support: The Environment and Human Health. Human Health and Heavy Metals Exposure*. 2002. págs. 65-81.
21. J., Ton. *Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in Arabidopsis: molecular-genetic basis of induced resistance in relation to basal resistance. GEWASBESCHERMING*. 2001. págs. 32(6):158-9.
22. Durán, N. R. *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports. Enzyme and Microbial Technology*, 907-931. 2002.
23. Téllez, T. M. *Growth and laccase production by Pleurotus ostreatus in submerged. Applied Microbiology and Biotechnology*, 675-679. 2008.
24. Pezzella, C. L. *Transcriptional analysis of Pleurotus ostreatus laccase genes. Applied Microbiology and Biotechnology*, 705-717. 2012.
25. Díaz, G. *Patrones de la casa de Pleurotus ostreatus desarrollado en fermentación sumergida a diferentes pH del medio de cultivo. Tesis Doctoral UAM*, 123. 2013.
26. Téllez, A. A. *Expression of a heterologous laccase by Aspergillus niger cultured by solid-state and submerged fermentations. Enzyme Microb Technol*. 2005.
27. Cohen, R., Persky y Hadar, Y. *Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58(5):582-594. 2002a.

28. Fernández-Fueyo, E., F., Ruiz-Dueñas, J. y Martínez, A. T. *Engineering and acidic pH stable versatile peroxidase from an extralong manganese peroxidase. Biochem. J. (submitted)*. 2014.
29. Salame, T, y otros. *Redundancy among manganese peroxidases in Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2013. págs. 79:2405–2415.
30. Salame, T., y otros. *Release of Pleurotus ostreatus versatile-peroxidase from Mn²⁺ repression enhances anthropogenic and natural substrate degradation*. *PLoS ONE* 7, 12. 2012. págs. 7, 12.
31. Ruiz-Dueñas, F. J. & Martínez, A. T. *Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this*. *Microbial Biotechnol*. 2:164-177. 2009.
32. Baldrian P, Valaskova V, Merhautova V, Gabriel J. *Degradation of lignocellulose by Pleurotus ostreatus in the presence of copper, manganese, lead and zinc*. *Research in microbiology*. 2005. págs. 156(5-6):670-6.
33. Karigar CS, Rao SS. *Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review*. *Enzyme Research*. 2011.
34. PM., Kirk. *Agaric Flora of Sri Lanka*, DN Pegler, in: *Kew Bulletin Additional Series, XII, HMSO, London (1986), p. 519, 104 figs. Price£ 27.00. Transactions of the British Mycological Society, Sep 1;89(2):281*. 1987.
35. Kong W, Chen H, Lyu S, Ma F, Yu H, Zhang X. *Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus Echinodontium taxodii 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds*. *Process Biochemistry*. 2016 Nov. págs. 1;51(11):1776-83.
36. Liu J, Zhang S, Shi Q, Wang L, Kong W, Yu H, Ma F. *Highly efficient oxidation of synthetic and natural lignin-related compounds by Physisporinus vitreus versatile peroxidase*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2019 Jan. págs. 1;136:41-8.
37. DM., Morales Fonseca. *Producción de enzimas ligninolíticas a partir de biomasa de Panicum maximum por Pleurotus ostreatus*. *Ingeniería Química*. 2015.

38. Bilal M, Asgher M. *Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. Chemistry Central Journal*. 2015 Dec;. págs. 9(1):1-4.
39. Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H. *New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. Applied and Environmental Microbiology*. 2001 May. págs. 1;67(5):2208-12.
40. DM, Morales Fonseca. *Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados. Pontificia Universidad javeriana*. Julio 2008 10.13140/RG.2.2.35853.56803.
41. Baborová P, Möder M, Baldrian P, Cajthamlová K, Cajthaml T. *Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus Irpex lacteus, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. Research in Microbiology*. 2006 Apr 1;157(3):24.
42. Kharas GB, Kray LJ, Mitchell SL, Muhammad J, Numir F, Plass EA, Reens JR, Skariah JM, Sosnoski ER, Svienty CJ. *Novel Copolymers of Styrene. 6. Halogen Ring-Substituted 2-Cyano-3-phenyl-2-propenamides. Journal of Macromolecular Science, Part A. . 2015 Feb 1*.
43. Quevedo-Hidalgo, Balkys, y otros. *Producción de enzimas lignocelulolíticas a partir de residuos de floricultura empleando Pleurotus ostreatus Universitas Scientiarum vol. 20 no.1 . enero 2015*.
44. Ponce-Soto LA, Leiva L, Landucci EC. *Understanding the molecular mechanism and structure-function relationship of the toxicity of PLA2 and K49 homologs in snake venom. Biomed Res Int*. 2013;2013:243047. doi: 10.1155/2013/243047. 2013.



ANEXOS

ANEXO N° 1
FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



FOTO 1: técnica de Liofilizado de las Muestras de *Pleorotus ostreatus*.



FOTO 2: columnas de HITRAP PHENYL de 1ml para extracción inicial de Proteínas, de *Pleorotus ostreatus*



FOTO 3: Extracción inicial de Proteínas a través de la técnica de cromatografía de interacción Hidrofóbica



FOTO 4 Electroforesis Horizontal de las Proteínas de *Pleorotus ostreatus*