



## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR DE *Streptomyces huasconensis* CEPA C1M10

Ingrid Monserrat Gallegos Olmos <sup>a\*</sup> y Juan Francisco Sánchez López <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto Politécnico Nacional - Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato.  
Silao, Gto. México. C.P. 36275.

[igallegoso1700@alumno.ipn.mx](mailto:igallegoso1700@alumno.ipn.mx)\*

### Resumen

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas al romper sus enlaces peptídicos, y desempeñan un papel esencial en diversos procesos biológicos. Su uso es común en bioprocesos industriales, donde alrededor del 66% de las proteasas comerciales provienen de microorganismos. La mayoría de las enzimas bacterianas que se producen comercialmente son extracelulares, lo que les confiere mayor estabilidad y las hace muy atractivas para la industria. Entre las especies de *Streptomyces* que producen proteasas extracelulares se encuentran *S. rimosus*, *S. moderatus*, *S. clavuligerus*, *S. griseus* y *S. thermovulgaris*. Este proyecto evaluó la actividad proteolítica extracelular de la cepa *S. huasconensis* C1M10, empleando tres medios de cultivo para la producción de proteasas: caldo de producción de proteasas (PPB), caldo de extracto de levadura y malta (MYEB), y un medio compuesto por harina de trigo y glicerol (Trigo). La principal actividad proteolítica de *S. huasconensis* fue parcialmente purificada en la fracción 50-70% de sulfato de amonio con los diferentes sobrenadantes, encontrándose la mayor actividad con el medio PPB al séptimo día. En conclusión, los análisis de SDS-PAGE y la actividad enzimática sugieren la presencia de una proteasa extracelular de aproximadamente 20 kDa en los sobrenadantes de *S. huasconensis* cepa C1M10, independientemente del medio utilizado.

*Palabras clave:* Proteasa; *Streptomyces*; actividad proteolítica.



## **STUDY OF THE EXTRACELLULAR PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Streptomyces huasconensis* STRAIN C1M10**

### **Abstract**

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of proteins by breaking their peptide bonds and play an essential role in various biological processes. They are commonly used in industrial bioprocesses, where around 66% of commercial proteases come from microorganisms. Most commercially produced bacterial enzymes are extracellular, which gives them greater stability and makes them very attractive for industry. *Streptomyces* species that produce extracellular proteases include *S. rimosus*, *S. moderatus*, *S. clavuligerus*, *S. griseus*, and *S. thermovulgaris*. This project evaluated the extracellular proteolytic activity of the strain *S. huasconensis* C1M10, using three culture media for protease production: protease production broth (PPB), malt yeast extract broth (MYEB), and a medium composed of wheat flour and glycerol (Wheat). The main proteolytic activity of *S. huasconensis* was partially purified in the 50-70% ammonium sulfate fraction with the different supernatants, with the highest activity being found with PPB medium on the seventh day. In conclusion, SDS-PAGE analyses and enzymatic activity suggest the presence of an extracellular protease of approximately 20 kDa in the supernatants of *S. huasconensis* strain C1M10, regardless of the medium used.

*Keywords:* Protease; *Streptomyces*; proteolytic activity.



## 1. Introducción

### 1.1. *Streptomyces* y sus características

*Streptomyces* es un género de bacterias Gram positivas que pertenece al grupo de las actinobacterias, y es de gran relevancia tanto en biotecnología como en la industria. Estas bacterias suelen encontrarse en el suelo, de donde se aíslan aproximadamente entre el 70% y el 90% de sus especies (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016).

Ludwig *et al.* (2012) describen la taxonomía de este género de la siguiente manera:

- **Dominio:** Bacteria
- **Filo:** Actinobacteria
- **Clase:** Actinobacteria
- **Orden:** *Streptomycetales*
- **Familia:** *Streptomycetaceae*
- **Género:** *Streptomyces*

De esta clasificación resalta que el género *Streptomyces*, al formar parte del filo Actinobacteria, es una fuente principal de metabolitos secundarios bioactivos, incluyendo antibióticos, antifúngicos y compuestos anticancerígenos, lo que contribuye significativamente a la farmacología y biotecnología (Liu *et al.*, 2018; Barka *et al.*, 2016).

Aunque la producción de antibióticos sigue siendo una función importante de las actinobacterias, su capacidad para generar una amplia gama de enzimas con aplicaciones industriales ha despertado un nuevo interés en su estudio. En este sentido, se ha encontrado que *Streptomyces spp.* presenta diversas aplicaciones enzimáticas, debido a que biocatalizadores como amilasas, proteasas, celulasas y quitinasas son utilizados en la industria alimentaria, en la elaboración de bebidas fermentadas, así como en la fabricación de detergentes y en el tratamiento de desechos agroindustriales (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016).

### 1.2. *Proteasas*

Las proteasas, también conocidas como peptidasas, son un grupo de enzimas clasificadas dentro de las hidrolasas, responsables de degradar los enlaces peptídicos mediante la incorporación de una molécula de agua. Este proceso genera péptidos más simples y está involucrado en numerosos procesos biológicos. Las peptidasas se encuentran en una amplia variedad de organismos, incluidos bacterias, células de mamíferos y virus, y tienen la capacidad de adaptarse a diferentes



condiciones ambientales (Fink y Jerala, 2022).

Debido a su aplicación industrial, las proteasas constituyen una parte significativa del mercado de biocatalizadores, representando entre el 40-60% de las ventas totales de enzimas. Además, aproximadamente el 66% de las proteasas comerciales provienen de microorganismos. En los bioprocesos industriales que requieren enzimas microbianas, estas pueden ser obtenidas mediante distintos métodos de fermentación, aprovechando la rápida tasa de duplicación de las bacterias para satisfacer la demanda del mercado de biocatalizadores (Kumar y Takagi, 1999).

Las proteasas ácidas, neutras y alcalinas se pueden producir mediante fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato residuos agroindustriales, especialmente salvado de trigo. Entre las especies de *Streptomyces* que producen peptidasas se encuentran *S. rimosus*, *S. moderatus*, *S. clavuligerus*, *S. griseus* y *S. thermovulgaris* (Pokorny *et al.*, 1979; Renko *et al.*, 1981; Renko *et al.*, 1989; Chandrasekaran y Dhar, 1987; Bascaran *et al.*, 1990; Muro *et al.*, 1991; Yeoman y Edwards, 1994).

### 1.3. Aplicaciones industriales de las proteasas

La mayoría de las enzimas bacterianas producidas a escala comercial son extracelulares, lo que les confiere una mayor estabilidad frente a las variaciones químicas y físicas del medio, convirtiéndolas en una opción atractiva para la industria (Ramesh *et al.*, 2009).

El uso de biocatalizadores derivados de microorganismos aislados de distintos entornos, como aquellos contaminados con metales pesados o de alta salinidad, representa una alternativa valiosa en los procesos industriales. Estos biocatalizadores están reemplazando a los catalizadores químicos en la fabricación de alimentos, productos químicos y farmacéuticos, así como en la producción de papel, artículos de cuero y textiles (Gerday *et al.*, 2000).

Las proteasas se utilizan en la industria de la curtiduría para el procesado de pieles. Mitra y Chakrabarty (2005) identificaron que una cepa de *S. nogalator* producía una proteasa extracelular con actividad depilatoria en piel de cabra (*Capra aegagrus hircus*). Asimismo, Böckle *et al.* (1995) demostraron que *S. pactum* tenía la capacidad de degradar plumas de pollo (*Gallus gallus domesticus*), gracias a



la actividad queratinolítica de su serina proteasa.

Además, las peptidasas son empleadas como aditivos en detergentes. Ramesh *et al.* (2009) encontraron que la proteasa alcalina de *S. fungicidicus* eliminaba manchas de sangre de tejidos de manera eficaz cuando se combinaba con diferentes detergentes, en comparación con el uso de un detergente individual.

En la industria farmacéutica, Simkhada *et al.* (2010) identificaron una metaloproteasa de serina de *Streptomyces spp.*, sugiriendo su potencial uso en terapia trombolítica debido a su actividad fibrinolítica.

## 2. Metodología

### 2.1. Reactivación de la cepa bacteriana

Se empleó la cepa C1M10 obtenida en 2015 a partir de un análisis microbiológico de muestras de jales mineros de la presa número 8 de la Valenciana de Guanajuato, Gto., mediante técnicas de muestreo reportadas previamente por Félix Soto *et al.* (1996).

Se reactivó el crecimiento de la cepa C1M10, que había sido criopreservada en glicerol al 25% a una temperatura de -20°C. Para ello, se

sembró la cepa mediante un estriado simple en cajas Petri con agar nutritivo de la marca Bioxon. Posteriormente, las cajas fueron incubadas a una temperatura constante de 28 °C durante 8 días.

### 2.2. Medio de cultivo para la producción de proteasas

Se probaron tres medios de cultivo para evaluar la producción de enzimas proteolíticas de los cuales se ha descrito su uso por diferentes autores, tales como Ramesh *et al.* (2009) y, Sánchez Henao *et al.* (2012). El primer medio consistió en un caldo de producción de proteasa (PPB), que contenía principalmente peptona y sacarosa. El segundo medio consistió en un caldo de extracto de levadura y de malta (MYEB) que contenía extracto de malta, extracto de levadura y extracto de carne. El tercer medio contenía principalmente glicerol y harina de trigo. Los tres medios de cultivo fueron ajustados a pH 7.

### 2.3. Obtención de sobrenadantes a partir de los diferentes medios de cultivo

Después de cultivar la cepa C1M10 en medio sólido de agar nutritivo durante 8 días a 28 °C, se procedió a cosechar las células bacterianas. Para ello, se añadieron 10 mL de agua



destilada estéril a la caja y se raspó las colonias con un asa de Digralsky. Las colonias recolectadas se transfirieron a un tubo Falcon de 50 mL y se homogeneizaron en un vórtex. Posteriormente, se inocularon 5 mL del homogeneizado en 300 mL de diferentes medios de cultivo, cada uno realizado por triplicado.

Se tomaron alícuotas de 50 mL de sobrenadante a los 0, 2, 5, 7, 9 y 14 días de crecimiento de la cepa, que fue incubada a 28 °C con agitación constante. La alícuota del día 0 se utilizó como control negativo. Las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm durante 10 minutos para obtener sobrenadantes libres de biomasa (Ramesh *et al.*, 2009). Finalmente, los sobrenadantes obtenidos se sometieron a precipitación con sulfato de amonio para concentrar las proteínas presentes y realizar mediciones posteriores.

#### *2.4 Precipitación con sulfato de amonio*

El fraccionamiento se llevó a cabo según el método descrito por Hernández-Saldaña *et al.* (2018). En primer lugar, se realizó una precipitación con sulfato de amonio en la fracción de 0-50%, utilizando muestras correspondientes a los días 0, 2, 5, 7, 9 y 14. Para ello, se añadió sulfato de amonio a 1 mL

de las muestras y se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, manteniendo una agitación constante. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos; a continuación, al sobrenadante obtenido se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar la fracción de 50-70% de precipitación. El proceso se repitió para los tres medios evaluados. Finalmente, el pellet de ambas fracciones se resuspendió en 100 µL de un buffer de fosfatos 100 mM a pH 6.8.

#### *2.5 Ensayo cuantitativo de la actividad proteolítica*

La actividad proteolítica de los sobrenadantes de la cepa C1M10, se analizó de acuerdo con el método de Cupp-Enyard (2008) y Lowry (1951). Se requirió emplear 50 µL de BSA al 1% como sustrato y 50 µL de los sobrenadantes precipitados con sulfato de amonio. Después se incubaron a 37°C durante 30 min y se añadió a la mezcla de reacción 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Posteriormente, fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min y se obtuvo un sobrenadante 2. A 115 µL del sobrenadante 2, se le agregaron 115 µL de NaOH (1 N). Se mezcló e incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 1155 µL del reactivo A (49 mL de



$\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% con 1 mL de  $\text{CuSO}_4$  al 0.5% en citrato de sodio al 1%). Finalmente, las muestras se dejaron incubando durante 10 min a temperatura ambiente, donde se agregó 115  $\mu\text{L}$  del reactivo diluido Folin-Ciocalteu-Fenol (1 mL de reactivo diluido con 2 mL de agua destilada, preparado antes de su uso). Se mezcló e incubó durante 20 minutos, leyendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. El procedimiento se repitió por triplicado para cada una de las muestras.

A su vez, se construyó una curva estándar de tirosina leyendo a 660 nm, empleando los reactivos y tiempos de incubación recomendados por Benimana *et al.*, (2020). Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto en las condiciones del ensayo (Simkhada *et al.*, 2010).

Por otra parte, se requirió determinar la concentración de proteína total, para lo cual se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm (Smith *et al.*, 1985) utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA) y midiendo las absorbancias de los sobrenadantes a 280 nm. La actividad proteolítica específica se calculó y se expresó como unidades/mg de proteína.

## 2.6 Análisis electroforético.

Los sobrenadantes precipitados de la cepa C1M10, se sometieron a la metodología de SDS-PAGE propuesta por Laemmli (1970), para analizar las proteínas presentes. Para ello, se preparó la placa de gel de poliacrilamida al 10%. Se diluyeron las muestras de los sobrenadantes precipitados de los tres medios de cultivo en una proporción de 1:1 con el buffer de carga (2x), que contenía Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), SDS al 4%, glicerol al 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 20% y azul de bromofenol al 0.02%. Posteriormente, las mezclas se hirvieron durante 3 minutos antes de ser cargadas en un gel de poliacrilamida al 10%. El buffer de corrida, que consistió en Tris-HCl 25 mM (pH 8.8), glicina a 192 mM, SDS al 0.1% y agua destilada, se añadió a la cámara electroforética donde estaba el gel de poliacrilamida al 10%. Adicionalmente, en uno de los carriles se incluyó un marcador de peso molecular comercial de la marca Thermo Scientific. Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando una solución de tinción con azul de Coomassie R-250, y luego se destiñeron con dos soluciones: la solución I (metanol 50%, ácido acético glacial 10% y agua destilada 40%) y la solución II (metanol 5%, ácido acético glacial 7% y agua destilada





88%). Después, se enjuagó el gel con agua destilada y se tomó una fotografía en un transiluminador de luz blanca, junto a una regla para medir la migración de cada banda. El peso molecular de los péptidos presentes en cada sobrenadante se estimó midiendo la distancia migrada desde el inicio del gel separador y aplicando la ecuación de la recta obtenida al graficar  $\log(W)$  frente a  $R_f$  de cada banda del marcador de peso molecular (Ramírez Moreno *et al.*, 2014).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Reactivación de la cepa bacteriana

La morfología colonial de la cepa C1M10 consistió en un micelio aéreo con bordes ondulados y una elevación plana, con un aspecto pulverulento y suave, y presentó una coloración púrpura (Figura 1).



Figura 1. Morfología colonial de la cepa C1M10.

La morfología colonial de la cepa C1M10 coincide con las características típicas de los Actinomicetos. La coloración púrpura es un rasgo distintivo de *S. huasconensis*, tal como lo describen Cortés-Albayay *et al.* (2019).

#### 3.2. Actividad proteolítica

Los resultados obtenidos en este trabajo, como se describe en las Figuras 2, 3 y 4, indican que las fracciones parcialmente purificadas al 70% con sulfato de amonio mostraron la mayor actividad proteolítica a los 7 días para los medios Trigo y PPB, mientras que en MYEB se observó a los 5 días. Según estos hallazgos, el medio PPB registró la mayor actividad proteolítica, alcanzando  $0.00489 \frac{U}{mg}$ , en comparación con  $0.00186 \frac{U}{mg}$  para el medio Trigo y  $0.00328 \frac{U}{mg}$  para MYEB.

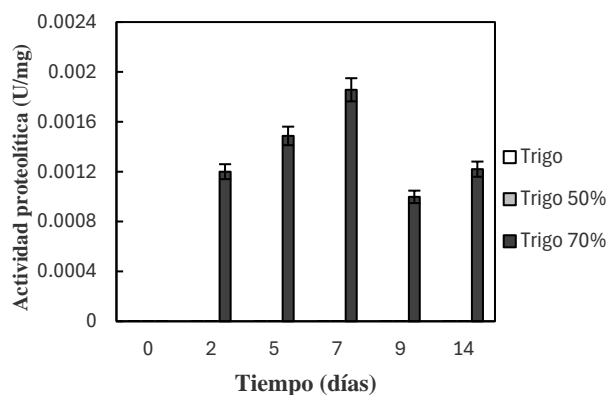


Figura 2. Actividad proteolítica en el medio Trigo.



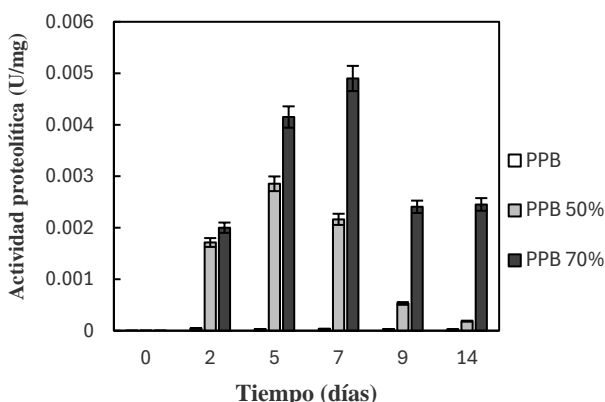


Figura 3. Actividad proteolítica en el medio PPB.

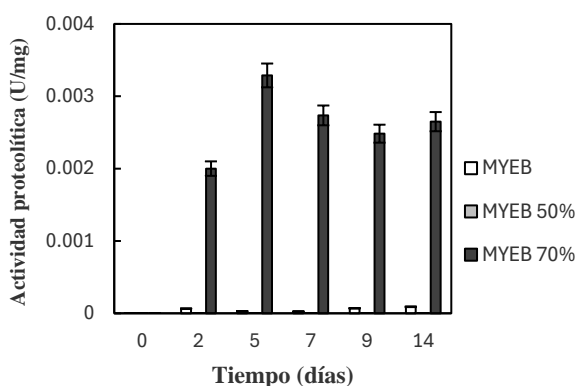


Figura 4. Actividad proteolítica en el medio MYEB.

Al respecto, Ramesh *et al.* (2009) evaluaron la actividad proteolítica de *S. fungicidicus* MML1614 utilizando dos medios diferentes. Encontraron una notable actividad proteolítica en el medio PPB el sexto día, mientras que en el medio MYEB se observó al séptimo día. Estos resultados sugieren que el medio PPB presenta una mayor actividad proteolítica en comparación con MYEB. Como se mencionó anteriormente, la

actividad proteolítica purificada parcialmente al 70% con sulfato de amonio en el medio PPB a los 7 días, mostró la actividad enzimática más alta, alcanzando un valor de  $0.00489 \frac{U}{mg}$ , en contraste con el  $0.00328 \frac{U}{mg}$  observado en MYEB, purificado también en la fracción del 70% de sulfato de amonio a los 5 días.

Simkhada *et al.* (2010) reportaron una actividad proteolítica utilizando el método de Folin-Ciocalteu, con azocaseína al 0.02% como sustrato y medido a 660 nm, para el sobrenadante crudo de *Streptomyces sp.* CS684, obteniendo un valor de  $0.00994 \frac{U}{mg}$ . Al comparar este resultado con la actividad proteolítica en los sobrenadantes de la cepa C1M10 en el séptimo día en medio PPB, la cual fue de  $0.00489 \frac{U}{mg}$ , se observa que representa aproximadamente la mitad del valor reportado por Simkhada *et al.* (2010). Al tener una menor actividad enzimática para C1M10 podría estar influenciada por factores como la concentración del sustrato, la temperatura, el pH o la presencia de inhibidores (Johnvesly y Naik, 2001).

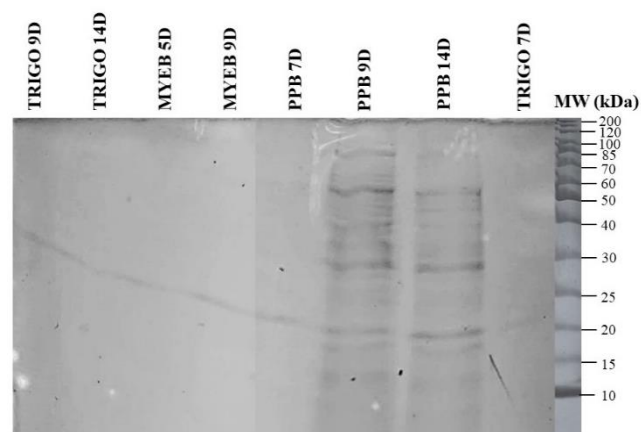
Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para evaluar las diferencias significativas en la actividad específica de las



proteasas entre los diferentes tiempos (0, 2, 5, 7, 9, y 14 días) y las concentraciones con sulfato de amonio de cada medio (sin concentrar, al 50% y al 70%). Los resultados mostraron que la concentración (purificación parcial con sulfato de amonio) tuvo un efecto significativo sobre la actividad de las proteasas ( $p < 0.05$ ), indicando que las diferentes concentraciones con sulfato de amonio de los medios de Trigo, PPB y MYEB influyen en la actividad proteolítica. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en relación con el tiempo ( $p > 0.05$ ), lo que indica que la variable tiempo no influye en la actividad de las proteasas dentro de los intervalos de tiempo evaluados.

### 3.3 Análisis electroforético

La Figura 5 presenta los resultados del SDS-PAGE de los sobrenadantes purificados parcialmente al 70% con sulfato de amonio de la cepa C1M10 en los medios Trigo, PPB y MYEB, obtenidos en los días 5, 7 y 9. Cada carril está identificado según corresponde. Se observa que en los tres medios se repiten las bandas con un peso molecular aproximado de ~20 kDa. Sin embargo, en el medio PPB, a los 9 y 14 días, se observaron bandas adicionales.



**Figura 5.** SDS-PAGE de los sobrenadantes precipitados al 70%.

La proteasa comercial de *S. griseus* en polvo, producida por Sigma Aldrich, contiene tanto Proteasa A como Proteasa B de *S. griseus*, con un peso molecular aproximado de 20 kDa, coincidiendo con las bandas reportadas en la Figura 5 (Merck, 2024).

Las bandas observadas en el gel de poliacrilamida al 10% (Figura 5) muestran que el peso molecular de alrededor de 20 kDa, es comparable a los reportados por Bressollier *et al.* (1999), Jurášek *et al.* (1974), Yum *et al.* (1994), Awad *et al.* (1972), Gertler y Trop (1971) y Yoshida *et al.* (1988), quienes informaron valores que varían entre 18, 19 y 27 kDa para serina proteasas extracelulares, endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas.



En los sobrenadantes del medio PPB, parcialmente purificados al 70% con sulfato de amonio, correspondientes a los días 9 y 14, se observaron más bandas en el gel de poliacrilamida. Esto podría deberse a la presencia de proteínas adicionales, variantes, contaminantes o problemas relacionados con la desnaturalización de las proteínas. Por lo tanto, en futuros estudios es fundamental optimizar los pasos de purificación para mejorar la claridad y precisión de los resultados.

#### 4. Conclusiones

El medio PPB demostró ser el más eficaz para la producción de proteasas en la cepa C1M10, superando a los medios MYEB y Trigo. Esto se atribuye a su equilibrada combinación de peptonas, sacarosa, fosfatos y sales, que favorece de manera óptima la producción enzimática.

La mayor actividad proteolítica se registró en el día 7, utilizando el medio PPB purificado parcialmente al 70% con sulfato de amonio, alcanzando un valor de  $0.00489 \frac{U}{mg}$ .

Los análisis realizados mediante SDS-PAGE y la actividad enzimática sugieren la existencia de una proteasa extracelular con un peso molecular aproximado de 20 kDa en los

sobrenadantes de la cepa C1M10 durante los días 7, 9 y 14, independientemente del medio utilizado (PPB, MYEB o Trigo).

Los hallazgos de esta investigación permitieron enriquecer y purificar parcialmente la actividad proteolítica producida por *S. huasconensis*, por lo que es una proteasa candidata a ser utilizada en diversas aplicaciones biotecnológicas.



## Referencias bibliográficas

- Awad, W. M., Soto, A. R., Siegei, S., Skiba, W. E., Bernstrom, G. G., & Ochoa, M. S. (1972). The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). Purification of four serine endopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 4144-4154.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 1–43.
- Bascaran, V., Hardisson, V., & Brana, A. (1990). Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:208-213.
- Benimana, F., Potoroko, I., Bagale, U. D., Maniriho, O., & Felicien, K. (2020). Protease Activity in fresh leaves of *Bidens pilosa*. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 9(3): 3108-3112.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., & Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6):2570–2576.
- Böckle, B., Galunsky, B., & Müller, R. (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10):3705–3710.
- Chandrasekaran, S. & Dhar, S. C. (1987). Multiple protease from *Streptomyces moderatus*. 1. Isolation and purification of five extracellular proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 257:395-401.
- Cortés-Albayay, C., Dorador, C., Schumann, P., Andrews, B., Asenjo, J., & Nouioui, I. (2019). *Streptomyces huasconensis* sp. nov., an haloalkalitolerant actinobacterium isolated from a high altitude saline wetland at the Chilean Altiplano. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(8), 2315–2322.
- Cupp-Enyard C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19.
- Félix Soto, J. N., Gutiérrez Castrejón, T., Lemos Pastrana, A., Ortiz Jiménez, M. A.,



Pescador Elizondo, N. L., & Varela Fregoso, L. (1996). *Manual de laboratorio de ecología microbiana*. Instituto Politécnico Nacional.

Fink, T., & Jerala, R. (2022). Designed protease-based signaling networks. *Current Opinion in Chemical Biology*, 68, 102146.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chess, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Geotlete, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M. A., & Feller, G. (2000). Cold adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnology*, 18:103–107.

Gertler, A. & Trop, M. (1971). The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (Pronase). Isolation and partial characterization. *European Journal of Biochemistry* 19, 90-96.

Hernández-Saldaña, O. F., Barboza-Corona, J. E., & Casados Vázquez, L. E. (2018). Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de cepas del género *Streptomyces* para su producción, análisis y caracterización. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3:53-58.

Johnvesly, B., & Naik, G. R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic

*Bacillus sp.* JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37:139–144.

Jurasek, L., Carpenter, M. R., Smillie, L. B., Gertler, A., Levy, S., & Ericsson, L. H. (1974). Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* protease B, a major component of Pronase. *Biochemical and biophysical research communications*, 61 4, 1095-100.

Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline protease; from a bio industrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561–594.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Liu, R., Deng, Z., & Liu, T. (2018). *Streptomyces species*: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metabolic Engineering*, 50, 74–84.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.



Ludwig, W., Euzéby, J., & Whitman, W. B. (2012). Taxonomic outline of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 29–31.

Maldonado-Salvador, F. A. (2015). Proteasas de *Streptomyces fradiae*: obtención por fermentación y aplicaciones industriales [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid - Facultad de Farmacia.

Merck KGaA. (2024). Proteasa from *Streptomyces griseus*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/p6911>

Mitra, P., & Chakrabarty, P. K. (2005). An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64:978-983.

Muro, T., Murakami, T., Tominaga, Y., Tokuyama, T., & Okada, S. (1991). Purification and some properties of protease I having transfer actino from *Streptomyces griseus var. alcalophilus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55:307-314.

Pokorny, M., Vitale, Lj., Turk, V., Renko, M., & Zuvanic, J. (1979). *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 1. Characterization and evaluation of various crude preparations.

*European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8:81-90.

Quiñones-Aguilar, E. E., Evangelista-Martínez, Z., & Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 101:59-64.

Ramesh, S., Rajesh, M., & Mathivanan, N. (2009). Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6):791–800.

Ramírez Moreno, M. E., De Nova Ocampo, M. A., Náder García, E., & Monsalvo Reyes, A. (2014). Manual de prácticas de biología molecular. Instituto Politécnico Nacional. México.

Renko, M., Pokorny, M., Vitale, Lj., & Turk, V. (1981). *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11:166-171.

Renko, M., Vitale, Lj., Kokalj, M., & Pokorny, M. (1989). *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 4, Trypsin-like proteinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31:38-44.





Sánchez Henao, C. P., Gómez Grimaldos, N. A., & Quintero Díaz, J. C. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*: evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *Dyna*, 79(175), 158-165.

Simkhada, J. R., Mander, P., Cho, S. S., & Yoo, J. C. (2010). A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces sp.* CS684. *Process Biochemistry*, 45(1):88–93.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85.

Yeoman, K. H., & Edwards, C. (1994). Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on rapemeal-derived media. *Journal of Applied Microbiology*, 77:264-270.

Yoshida, N., Tsuruyama, S., Nagata, K., Hirayama, K., Noda, K., & Makisumi, S. (1988). Purification and characterization of an acidic amino acid specific endopeptidase of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). *Journal of Biochemistry* 104, 451-456.