

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

LEONARDO PREZZI DORNELLES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE PROTEASE
DE *Mytella charruana* (BIVALVIA: MYTILIDAE) NA OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

**RECIFE
2017**

LEONARDO PREZZI DORNELLES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE PROTEASE
DE *Mytella charruana* (BIVALVIA: MYTILIDAE) NA OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes
Paiva

**RECIFE
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Dornelles, Leonardo Prezzi

Purificação, caracterização e utilização de protease de *Mytella charruana* (Bivalvia: Mytilidae) na obtenção de peptídeos antimicrobianos / Leonardo Prezzi Dornelles - 2017.

65 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2017.

Inclui referências

1. Enzimas proteolíticas 2. Bivalve (molusco) 3. Peptídeos I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorient.) III. Título

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-029

LEONARDO PREZZI DORNELLES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE
PROTEASE DE *Mytella charruana* (BIVALVIA: MYTILIDAE) NA
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO (Presidente)

Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof. Dr. EMMANUEL VIANA PONTUAL (Membro Interno)

Departamento Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dra. THÂMARAH DE ALBUQUERQUE LIMA (Membro Externo)

Departamento de Bioquímica - UFPE

Dra. TATIANA SOARES (Membro Externo)

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Aprovado em: 17 / 02 / 2017

RECIFE

2017

***D**edico aos meus pais, Leonor e
Cleber, por todo o investimento feito para
a minha educação e formação, pela
paciência e pelo amor.... Não seria nada
sem vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meus pais, Leonor e Cleber, por todo o amor, carinho, incentivo e investimento na minha educação e na minha formação. Eu sei que, sem eles, eu não teria chegado até aqui e não seria a pessoa que eu sou.

Aos meus avós, tios e primos que, mesmo distantes, sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade.

Ao meu orientador Thiago Henrique Napoleão pelo incentivo à pesquisa, por acreditar na minha competência, na minha responsabilidade e principalmente na minha capacidade, por me mostrar os caminhos e por me fazer criar um amor muito grande pela ciência, bem como por dedicar seu tempo para corrigir esse trabalho.

À minha coorientadora Patrícia Paiva, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu laboratório desde o primeiro período do curso de graduação.

Aos meus melhores, Fernanda Ito, Júlio, Kézia, Thâmarah, Ana Patrícia, Belany, Rodolfo, Maria Alice e Ludymilla por todos os momentos de descontração, por todas as conversas, conselhos, risadas (foram muitas) e por todo o carinho que temos uns aos outros.

À minha amiga Suzana Iara Fetter, por ser a irmã que eu nunca tive, por todos os momentos que passamos juntos e que, mesmo distante, sempre está presente na minha vida.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica Djalma, Ademar, João, Maria, Miron, Dona Helena, Albérico, José Roberto e Jorge.

Ao CNPq, FACEPE, CAPES e UFPE pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

RESUMO

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de maneira seletiva, o que resulta na degradação de proteínas. Essas enzimas são amplamente utilizadas na indústria nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos, por exemplo, por apresentarem diversas aplicações biotecnológicas. Na sua estrutura nativa, proteínas de reserva geralmente não apresentam nenhuma atividade antimicrobiana, mas quando degradadas por proteases podem liberar peptídeos bioativos com ação antimicrobiana. Os objetivos da presente dissertação foram purificar e caracterizar uma protease a partir da massa visceral do mexilhão *Mytella charruana* (denominada MycP, do inglês *M. charruana protease*) e avaliar sua capacidade de hidrolisar caseína de leite e gerar peptídeos antimicrobianos. A massa visceral de *M. charruana* foi homogeneizada com Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e, após centrifugação, o extrato foi avaliado quanto à atividade proteolítica total. O efeito de inibidores de protease foi avaliado. MycP foi isolada através de cromatografia de gel filtração (Sephadex G-75) seguida de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex A25). A protease foi submetida à focalização isoeletrica e SDS-PAGE e avaliada quanto à atividade tripsina-símile. O efeito do pH e temperatura na atividade tripsina-símile foi determinado. MycP foi utilizada para realizar a hidrólise da caseína e o hidrolisado foi avaliado quanto à atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Micrococcus luteus*, e atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. O extrato da massa visceral teve sua atividade proteolítica inibida em 55%, 59% e 24%, respectivamente, indicando a presença de aspártico, serino e metalo proteases. MycP apresentou pI 4,1 e uma única banda polipeptídica de 83,1 kDa em SDS-PAGE. MycP apresentou atividade semelhante à tripsina com temperatura ótima de 40°C. Esta atividade foi estável numa ampla gama de pH (3,0-9,0). O K_m relativo à atividade tripsina-símile de MycP foi $4,28 \pm 0,34$ mM de BApNA e a $V_{m\acute{a}x}$ foi $0,056 \pm 0,001$ nmol de BApNA/min. MycP foi capaz de promover a hidrólise de caseína e o hidrolisado foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* com MIC de 5,0 µg/mL para todas essas bactérias. Não foi detectada atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* testadas. Em conclusão, a massa visceral de *M. charruana* contém uma protease com atividade tripsina-símile capaz de gerar peptídeos com efeito bacteriostático derivados da hidrólise da caseína.

Palavras-chave: Molusco bivalve. Caseína. Atividade proteolítica. Serinoproteases. Peptídeos bioativos.

ABSTRACT

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds in a selective way, which results in protein degradation. These enzymes are broadly used in chemical, pharmaceutical and food industries, for example, due to their several biotechnological applications. Storage proteins are produced by many organisms and their main function is the storage of amino acids that will be used during the embryonic development and growth. In their native structure, these proteins usually do not show any antimicrobial activity, but when degraded, they may release bioactive peptides with antimicrobial action. The aims of this work were to isolate and characterize a protease from the visceral mass of the mussel *Mytella charruana* (deemed MycP, *M. charruana* protease) and to evaluate its ability to hydrolyze milk casein and generate antimicrobial peptides. The *M. charruana* visceral mass was homogenized with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and, after centrifugation, the extract was evaluated for total protease activity. The effects of protease inhibitors were evaluated. MycP was isolated through gel filtration chromatography (Sephadex G-75) and ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A25). This protease was submitted to isoelectric focusing and SDS-PAGE as well as evaluated for trypsin-like activity. The effect of pH and temperature on trypsin-like activity was determined. MycP was used to hydrolyze casein and the hydrolysate was evaluated for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Micrococcus luteus*, and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. The extract from visceral mass had its protease activity inhibited in 55%, 59% and 24%, respectively, indicating the presence of aspartyl, serine and metallo proteases. MycP showed a single polypeptide band of 83.1 kDa in SDS-PAGE. MycP showed trypsin-like activity with optimal temperature of 40°C. This activity was stable in a wide pH range (3.0–9.0). The K_m regarding trypsin-like activity was 4.28 ± 0.34 mM of BApNA and the V_{max} was 0.056 ± 0.001 nmol BApNA/min. MycP was able to promote the hydrolysis of casein and the hydrolysate was able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* with MIC of 5.0 µg/mL for all bacteria. Antifungal activity against the tested *Candida* species was not detected. In conclusion, the visceral mass of *M. charruana* contains a trypsin-like protease that is able to generate peptides from casein, which showed bacteriostatic effect.

Keywords: Bivalve mollusk. Casein. Protease activity. Serine proteases. Bioactive peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de catálise de serinoproteases.	18
Figura 2. Esquema geral da anatomia de um molusco (A) e especificamente de um molusco bivalve (B).	29
Figura 3. Visão geral de um mexilhão da família Mytilidae.	32

ARTIGO

Figure 1. Purification of <i>Mytella charruana</i> protease (MycP). (A) Chromatography of visceral mass extract on Sephadex G-75 column performed using 0.15 M NaCl (flow rate: 0.5 mL/min) as mobile phase. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm). (B) Ion exchange chromatography of PI on DEAE-Sephadex column. Washing step used 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Elution was performed with this buffer containing 1.0 M NaCl. Fractions of 3.0 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and evaluated for ABS 280 nm. The insets show the isoelectric focusing, IEF (1) and SDS-PAGE (2) of MycP.	55
Figure 2. Trypsin-like activity of <i>Mytella charruana</i> protease (MycP) varying the temperature (A) and pH (B) of the enzymatic assay.	56
Figure 3. Michaelis–Menten plot of the catalytic activity of <i>Mytella charruana</i> protease (MycP) towards the substrate N- α -benzoyl-DL-arginyl- ρ -nitroanilide (BApNA).	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 PROTEASES	13
2.1.1 Serino proteases	15
2.1.2 Cisteíno proteases	18
2.1.3 Aspártico proteases	19
2.1.4 Metaloproteases	20
2.2. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS PROTEASES	21
2.2.1 Processamento de couro	21
2.2.2 Indústria de detergentes	22
2.2.3 Indústria alimentícia	23
2.2.4 Liberação de peptídeos bioativos	25
2.2.4.1 Liberação de peptídeos bioativos a partir da caseína	27
2.3 CLASSE BIVALVIA	28
2.3.1 <i>Mytella charruana</i> d' Orbigny (Bivalvia, Mytilidae)	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 GERAL	34
3.2 ESPECÍFICOS	34
4 ARTIGO	35
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas, resultando na degradação de proteínas (LÓPEZ-OTÍN & OVERALL, 2002). Essas enzimas, que ocorrem em todos os organismos vivos, realizam inúmeras funções fisiológicas. Em animais, as proteases participam de processos cruciais como digestão de alimentos, crescimento celular, morfogenia e desenvolvimento, inflamação, ativação de zimogênios e pró-hormônios, dentre vários outros (GODFREY & WEST, 1996).

As proteases são hidrolases que podem ser classificadas como exopeptidases, se clivam as ligações peptídicas presentes nos terminais amino ou carboxi, ou como endopeptidases (proteínases), se clivam as ligações peptídicas presentes no interior da molécula (TURK, 2006). De acordo com os aminoácidos do sítio ativo que estão envolvidos na catálise, essas enzimas são classificadas em serino proteases (possuem a tríade catalítica Ser, His e Asp no sítio ativo, sendo o resíduo nucleofílico de serina responsável pelo ataque à ligação peptídica), cisteíno proteases (tríade Cys, Asp e His, sendo a cisteína o resíduo nucleofílico) e aspártico proteases (possuem aspartato como o resíduo nucleofílico). Ainda, as proteases podem ser classificadas como metaloproteases caso necessitem de íons metálicos para exercerem sua atividade catalítica (MURI, 2014).

As proteases apresentam diversas aplicações biotecnológicas, o que tem estimulado a busca por novas fontes. Essas enzimas correspondem a cerca de 60% das enzimas utilizadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, por exemplo (KUMAR & BHALLA, 2005; SILVA *et al.*, 2009). Na indústria química, as proteases podem ser aplicadas como constituintes de detergentes, no tratamento de resíduos e na síntese de peptídeos. Na indústria alimentícia, são utilizadas na tenderização e maturação de carnes, na fermentação de farinhas, na coagulação de leite para produção de queijos e na hidrólise de proteínas de soja, gerando

produtos com atividade antioxidante e melhorando a vida-útil de alimentos (BHASKAR *et al.*, 2007; PONTUAL *et al.*, 2012; RAUT *et al.*, 2012). Na indústria farmacêutica, as proteases têm recebido destaque como ferramentas para uso em kits de diagnóstico (TURK, 2006) e na obtenção de peptídeos bioativos.

Proteínas de reserva – como aquelas presentes no leite e em sementes – têm sido apontadas como fontes naturais de peptídeos bioativos. Essas proteínas geralmente não apresentam tais atividades, mas quando clivadas liberam peptídeos com atividade antioxidante, imunomoduladora e antimicrobiana, por exemplo. A variedade de peptídeos (muitos deles multifuncionais) que pode ser obtida é enorme, podendo o tamanho variar de dois a algumas dezenas de resíduos de aminoácidos (MEISEL & FITZGERALD, 2003). Os tipos de arranjos são ainda mais variáveis quando se considera as especificidades de cada tipo de protease. A hidrólise de caseínas e proteínas do soro do leite tem sido utilizada na obtenção de peptídeos bioativos, mas somente uma pequena parte tem sido caracterizada e avaliada quanto à ação antimicrobiana (BENKERROUM, 2010).

O mexilhão *Mytella charruana* (Bivalvia, Mytilidae) é nativo do leste do Oceano Pacífico e tem ampla ocorrência nas Américas Central e do Sul (CARDENAS & ARANDA, 2000). É bastante difundido no nordeste do Brasil, onde é popularmente conhecido como “sururu” e explorado comercialmente como alimento (MAIOLI *et al.*, 2010). Adicionalmente, *M. charruana* tem sido utilizado como organismo indicador de poluição marinha e é considerado um dos melhores modelos aquáticos para monitorar a bioacumulação de hidrocarbonetos poliaromáticos em ecossistemas estuarinos (BAUMARD *et al.*, 1999).

A necessidade de novos agentes antimicrobianos é intermitente devido ao constante aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos corriqueiramente usados. A hidrólise de proteínas de reserva pode gerar peptídeos antimicrobianos de potencial variável de acordo

com o tamanho e composição. Tem sido demonstrado que a utilização de diferentes proteases gera diferentes fragmentos, os quais podem ter atividade antimicrobiana variável.

O presente projeto visa purificar e caracterizar uma nova protease a partir da massa visceral de *M. charruana*, bem como avaliar sua capacidade em gerar peptídeos com ação antibacteriana. Os peptídeos foram obtidos a partir da caseína. Dessa forma, espera-se disponibilizar uma nova protease como ferramenta biotecnológica útil na obtenção de peptídeos bioativos de importância médica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEASES

Proteases, peptídeo-hidrolases ou peptidases, são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas. As proteases (EC 3.4) são divididas em classes e sub-classes: enzimas que pertencem à sub-classe 3.4.21 (serinoproteases) possuem um resíduo de Ser no seu sítio ativo que é responsável pelo ataque nucleofílico das ligações peptídicas, enquanto nas que pertencem à 3.4.22 (cisteínoproteases) esse resíduo é Cys. As proteases que pertencem à 3.4.23 (asparticoproteases) dependem de um resíduo de Asp no seu sítio catalítico. Finalmente, as que pertencem à sub-classe 3.4.24 (metalo proteases) dependem de um íon metálico (geralmente Zn^{2+}) para exercerem sua função catalítica (ANTÃO, 2005).

As proteases também podem ser classificadas de acordo com a região do substrato sobre a qual atuam, sendo denominadas exopeptidases ou endopeptidases. As endopeptidases hidrolisam ligações presentes no interior da molécula de substrato, pois tendem a atuar longe das extremidades N- e C-terminal. Essas enzimas iniciam o processo de hidrólise de proteínas, gerando novos terminais amino e carboxi, que servirão então como substrato para as exopeptidases completarem o processo (POLAINA, 2007).

As exopeptidases clivam a molécula de substrato hidrolisando ligações peptídicas distantes não mais do que três resíduos das extremidades N- ou C-terminal. Elas são classificadas em: aminopeptidases: liberam um único resíduo de aminoácido do N-terminal; dipeptidases: hidrolisam um dipeptídeo, sendo que tanto a extremidade C-terminal quanto a N-terminal do outro aminoácido precisam estar livres; dipeptidil-peptidases: liberam um dipeptídeo do N-terminal do substrato; tripeptidil-peptidases: liberam um tripeptídeo do N-terminal do substrato; peptidil-dipeptidases: liberam um dipeptídeo do C-terminal do

substrato; carboxipeptidases: liberam um único resíduo de aminoácido do C-terminal do substrato. As proteases em geral também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam uma máxima atividade proteolítica, sendo ácidas (pH de 2,0 a 6,0), neutras (pH de 6,0 a 8,0) ou alcalinas (pH de 8,0 a 13,0) (SOUZA, 2015).

Essa variação de especificidade das proteases se deve ao fato de que os sítios ativos das mesmas contêm um arranjo característico de resíduos de aminoácidos que definem a interação enzima/substrato. O conhecimento dessas especificidades fornece informações que podem auxiliar na escolha de qual protease será utilizada para a quebra de determinado substrato ou determinar quais os produtos que serão liberados a partir da hidrólise, pois uma mesma fonte de proteína pode produzir diferentes hidrolisados usando-se proteases diferentes (TAVANO, 2013).

Em relação ao mecanismo de catálise, as serino e cisteíno proteases formam complexos covalentes entre a enzima e o substrato a ser clivado e possuem resíduos de aminoácidos fortemente nucleofílicos que produzem um ataque ao grupo carbonila da ligação peptídica. Já as aspártico e metaloproteases não formam intermediários no processo de clivagem, o qual é caracterizado pela catálise ácido-base geral, com participação de uma molécula de água (ANTÃO, 2005).

As proteases constituem um dos maiores e mais importantes grupos de enzimas industriais, contabilizando, pelo menos, um quarto de todas as enzimas comerciais produzidas. O mercado mundial de enzimas industriais movimenta mais de 1 bilhão de dólares por ano, sendo que 75% das enzimas comercializadas pertence ao grupo das hidrolases e, dentre essas, 60% são proteases. Elas são amplamente utilizadas na indústria de detergentes, proteínas, cervejaria, processamento de carnes, couro, soja e laticínios, além de serem usadas em indústrias de Biotecnologia (DADSHAHI, 2016; de CASTRO, 2015; CHERRY, 2003; ANWAR, 1998; RAO, 1998).

Proteínas fibrosas que constituem penas, unhas, pelos e cabelos são muito encontradas na natureza como resíduos e restos. Esses materiais podem ser convertidos em biomassa útil, concentrados de proteínas ou aminoácidos livres por meio da utilização de proteases. Os produtos gerados são bastante utilizados na indústria de rações de animais como aditivos alimentares. Essa conversão de biomassa acontece através da ação de enzimas proteolíticas que quebram as ligações peptídicas e, especialmente, as ligações dissulfeto que estão presentes em grande número nas proteínas fibrosas (FERRAREZE, 2016; PRAKASH, 2010; ANWAR, 1998).

Uma vez que a maioria dos processos fisiológicos envolve o controle de ativação e síntese de proteínas, as proteases têm papel fundamental na regulação de diversos eventos, tais como fecundação, digestão, proteção contra agentes externos, envelhecimento e até a morte, em todos os organismos vivos. Além disso, essas enzimas são essenciais em vírus, bactérias e parasitas para sua replicação e propagação de doenças infecciosas (SHEN, 2009).

2.1.1 Serino proteases

Serinoproteases constituem um grupo diverso de enzimas proteolíticas que são caracterizadas pela presença no sítio ativo de três aminoácidos que são críticos para sua função: histidina, aspartato e serina. Esse nome se dá pelo envolvimento chave da serina no processo de proteólise, como mencionado anteriormente (ALMONTE, 2012). As serinoproteases vêm sendo altamente estudadas devido aos seus efeitos na coagulação sanguínea, hemostase e hemodinâmica, além de poderem ser utilizadas no tratamento de inflamações e cicatrizações. Essas enzimas também estão associadas a processos fisiológicos que incluem a sinalização celular, digestão, desenvolvimento e resposta imune inata (LI-PING, 2016).

As serinoproteases são geralmente ativas em pH neutro a alcalino, com pH ótimo entre 7,0 e 11,0 (RAO, 1998). A massa molecular, em geral, está na faixa de 18 a 35 kDa; entretanto, serinoproteases maiores foram encontradas em alguns organismos, como é o caso da bactéria *Serratia marcescens*, que apresenta uma serinoprotease de massa molecular 53 kDa (ROMERO, 2001).

De acordo com similaridades estruturais, as serinoproteases de eucariotos e procariotos são agrupadas em cinco famílias, as quais são subdivididas em seis clãs de ancestrais comuns: o clã A, que agrupa enzimas que possuem origem comum com a quimotripsina; o clã B com a subtilisina; o clã C com as carboxipeptidases; o clã E com a peptidase D-Ala-D-Ala de *Escherichia coli*; o clã F com o repressor Lex A; e o clã G, que agrupa as serinoproteases dependentes de ATP (RAWLINGS, 2006).

A maioria das serinoproteases são produzidas e armazenadas na forma de zimogênio inativo. Esse armazenamento ocorre principalmente dentro de grânulos ligados a proteoglicanos, o que previne que essas enzimas entrem em contato com o citoplasma da célula e possam interagir com proteínas intracelulares. Além disso, o baixo pH dentro desses grânulos faz com que essas enzimas tenham uma menor atividade mesmo que sejam convertidas na forma ativa por algum motivo (HEUTINCK, 2010). A estrutura primária do zimogênio inclui um peptídeo sinalizador (pré-sequência), que é removido pelo sistema de secreção celular, e a pró-proteína, cuja clivagem leva à formação da enzima ativa.

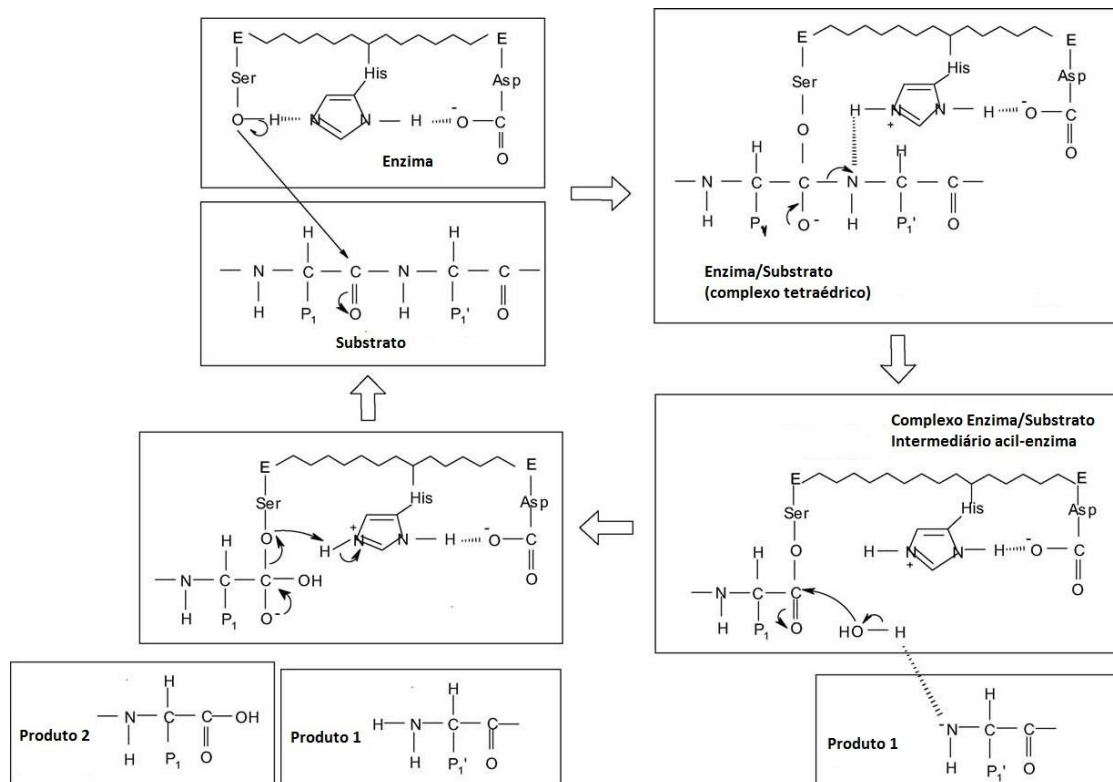
Uma classe de proteases, as proteases “*trypsin-like*”, inclui a tripsina, quimotripsina e neurotripsina, as quais foram primeiramente estudadas e caracterizadas por suas funções na digestão de alimentos em animais. A tripsina é uma enzima proteolítica bastante conhecida, ativada pela clivagem do tripsinogênio (pró-enzima pancreática) através de uma enteroquinase presente no trato digestivo. Oito genes de tripsina foram encontrados no genoma humano, mas apenas três desses são capazes de expressar proteínas, as quais são

denominadas tripsinogênio 1 (tripsinogênio catiônico), tripsinogênio 2 (tripsinogênio aniônico) e tripsinogênio 3 (mesotripsinogênio) (ALMONTE, 2012).

Diversas pesquisas vêm sendo feitas para evidenciar possíveis fontes de produção e isolamento de tripsinas. Essas enzimas são amplamente produzidas em peixes e outros animais marinhos. Balti *et al.* (2009) isolaram e caracterizaram uma tripsina termoestável de peso molecular 24 kDa a partir do hepatopâncreas do peixe *Sepia officinalis*. Freitas-Júnior *et al.* (2012) purificaram e caracterizaram uma tripsina do ceco pilórico do pirarucu gigante da Amazônia (*Arapaima gigas*) e observaram que essa enzima tem peso molecular de 28 kDa e seu pH e temperatura ótimos são 9,0 e 65°C, respectivamente. Ktari *et al.* (2012) também isolaram uma tripsina com características similares às citadas anteriormente a partir de *Salaria basilisca*, sendo pH 9,5, temperatura de 60°C e peso molecular de 27 kDa.

O mecanismo de catálise das serinoproteases é compartilhado com as cisteínoproteases, pois em ambos os casos haverá a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato, através de um ataque nucleofílico dos resíduos de aminoácidos no grupo carbonila das ligações peptídicas que formam o substrato. Logo após, haverá a quebra desse intermediário por uma molécula de água, liberando os produtos (ANTÃO, 2005).

Os dois passos básicos do mecanismo de catálise incluem: 1) formação de um éster entre o átomo de oxigênio da serina e a porção acil do substrato, o que produz um intermediário tetraédrico e libera a porção amino do substrato; 2) ataque desse complexo por uma molécula de água, quebrando-o e liberando a parte ácida do substrato, regenerando a forma original da enzima (ANTÃO, 2005). O processo é ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Mecanismo de catálise de serinoproteases

Fonte: ANTÃO (2005).

2.1.2. Cisteíno proteases

As cisteínoproteases são enzimas com peso molecular geralmente de 21 a 30 kDa e com máxima atividade proteolítica em faixas de pH ácido (4,0–6,5). Estão presentes em todos os seres vivos, sendo já descobertas mais de 21 famílias de cisteínoproteases, com quase a metade delas presente em vírus. Muitas dessas enzimas são encontradas em fungos, protozoários e plantas. Em mamíferos são encontrados dois principais grupos: calpaínas citosólicas e catepsinas lisossomais. Em plantas, o grupo mais estudado dentre as cisteínoproteases é o grupo das papaínas, extraídas de *Carica papaya* (GRZONKA, 2001).

O mecanismo de catálise dessa classe de enzimas é caracterizado pela presença de uma díade catalítica formada por resíduos de cisteína e histidina. Assim como nas serinoproteases,

há a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato. O intermediário é formado pelo ataque nucleofílico do grupamento tiol do resíduo de cisteína no grupo carbonila do substrato a ser hidrolisado, liberando a parte ácida como produto. O próximo passo é a reação entre uma molécula de água e o intermediário formado, onde o grupamento amino é liberado como produto final. No final desse ciclo haverá a regeneração da enzima para seu estado original, o que permitirá o início de outro processo de catálise enzimática (GRZONKA, 2001).

2.1.3. Aspártico proteases

Também chamadas de proteases ácidas, as aspártico proteases são endopeptidases que possuem no seu sítio catalítico pelo menos um resíduo de ácido aspártico, o qual é essencial para sua função como catalisadora da hidrólise de ligações peptídicas. Essas enzimas estão presentes em animais, vegetais, fungos, protozoários, bactérias e vírus e possuem importantes funções relacionadas com nutrição e patogenicidade (GONZÁLEZ, 2016). Muitas dessas enzimas são também sintetizadas como zimogênios ou precursores inativos visando proteção contra proteólise. O zimogênio é auto-convertido para sua forma ativa da enzima através de uma mudança de pH do meio.

Em relação às suas diferentes características moleculares e sua localização nos tecidos, as aspártico proteases de vertebrados foram classificadas como catepsinas D, catepsinas E, gastricinas, pepsinas, quimosinas e reninas. As aspártico proteases também são encontradas em invertebrados, plantas e microrganismos. O peso molecular dessa classe de proteases varia em torno de 30 a 45 kDa e elas apresentam afinidade por aminoácidos hidrofóbicos, usualmente fenilalanina. Essas proteases apresentam pH ótimo na faixa de 3-4 com ponto isoeletrico variando de 3,0 a 4,5 (GONZÁLEZ, 2016; KHALED, 2011)

O mecanismo de catálise envolve um resíduo de ácido aspártico no sítio ativo da cadeia polipeptídica, que se liga a uma molécula de água, formando um nucleófilo. O movimento dos elétrons nesse estágio faz com que a enzima consiga quebrar o substrato e libere o produto. Depois da catálise, uma nova molécula de água se liga à enzima e o ciclo é iniciado novamente. Nesse processo não há a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato, pois não haverá um ataque nucleofílico contra o grupo carbonila do substrato que será quebrado (GONZÁLEZ, 2016).

2.1.4. Metaloproteases

Essas enzimas representam uma classe de hidrolases que clivam as ligações peptídicas pela ação de uma molécula de água que é ativada pela formação de um complexo com íons metálicos bivalentes presentes no sítio ativo dessas proteases. É a classe mais diversa de proteases e inclui as collagenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de serpentes peçonhentas e termolisinas de bactérias, por exemplo (RANI, 2012; POLAINA, 2007).

As metaloproteases são definidas e inseridas em grupos por suas similaridades em relação às sequências e inibição por agentes quelantes ou por inibidores de metaloproteases presentes nos tecidos. Existem sete membros dessa família: collagenases intersticiais (EC 3.4.24.7), metaloproteinases de matriz 8, também chamadas de collagenase de neutrófilos (EC 3.4.24.34), estromelisina-1 (EC 3.4.24.17), estromelisina-2 (3.4.24.22), matrilisina (EC 3.4.24.23), gelatinase A (EC 3.4.24.24) e gelatinase B (EC 3.4.24.35). Essas enzimas são secretadas como pró-enzimas latentes que passam por uma clivagem proteolítica de um domínio amino-terminal durante a sua ativação (KHOKHA, 2013; KLEINER, 1993).

2.2 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS PROTEASES

2.2.1 Processamento de couro

Na indústria de couro, a retirada dos pelos de peles utilizando enzimas tem ganhado atenção nos últimos anos. Tradicionalmente, esse processo é feito pelo tratamento das peles com uma solução saturada de ácido clorídrico e sulfato de sódio, o que torna o processo caro, desagradável, pois libera fortes odores, e bastante poluente, já que um efluente tóxico é produzido e liberado. Para serem usadas na indústria de processamento de couro, é necessário que as proteases sejam estáveis e ativas sob condições alcalinas (faixas de pH que chegam a 12,0) (ANWAR, 1998).

Proteases alcalinas que possuem características elastolíticas e queranolíticas são amplamente utilizadas no biotratamento do couro, especialmente nos processos de depilação e lavagem de peles de animais. A hidrólise das proteínas dos folículos capilares permite a fácil retirada dos pelos. Logo após há o processo de degradação da elastina, queratina e colágeno presente nos materiais, o que permite produzir um couro macio e de boa qualidade que é empregado na fabricação de roupas e acessórios (PAUL, 2016; KUMAR, 1999).

Dayanandan *et al.* (2003) isolaram e caracterizaram uma protease alcalina do fungo *Aspergillus tamaraii* e avaliaram seu potencial para uso na limpeza do couro. A enzima foi eficaz na depilação e aumentou significativamente a qualidade do produto final, o que torna essa enzima um potencial substituto dos compostos químicos que são usados pela técnica tradicional. No caso da protease de *A. tamaraii*, essa enzima não apenas aumentou a qualidade do couro, como também reduziu os problemas gerados pela liberação de poluentes.

Contudo, existem desvantagens no uso de enzimas proteolíticas no processo de depilação do couro: necessidade de estabilidade frente a diferentes temperaturas e faixas de

pH, duração da atividade enzimática e custos de produção e aplicação das enzimas. (DAYANANDAN, 2003; ANWAR, 1998). Exemplos de proteases utilizadas nos processos de produção de couro são as queratinases que são produzidas em larga escala por bactérias do gênero *Bacillus* (PAUL, 2016). Além das queratinases, as collagenases também são empregadas nesse tipo de indústria e vem sendo produzidas utilizando bactérias do gênero *Vibrio* (GEORGE, 2014).

2.2.2 Indústria de detergentes

A indústria de detergentes é a maior consumidora de enzimas hidrolíticas que atuam em pH alcalino. Os detergentes contêm diferentes tipos de enzimas, como proteases, amilases e lipases. As proteases conseguem hidrolisar manchas proteínicas, as amilases são bastante efetivas contra amido e outros carboidratos e as lipases são utilizadas para retirada de manchas de óleos e gorduras (PAUL, 2016; CHERRY, 2003; ANWAR, 1998).

Além disso, as enzimas podem substituir fosfatos aplicados na fabricação de detergentes de uso comercial. Os fosfatos são utilizados nos detergentes por possuírem propriedades surfactantes que auxiliam na retirada de manchas de tecidos. Contudo, o uso de fosfatos vem sendo abolido devido à liberação de poluentes que podem gerar eutrofização, o que pode provocar graves impactos ambientais. Com a finalidade de reduzir esses impactos promovidos pelos fosfatos, as enzimas são excelentes substituintes desses compostos, visto que elas não geram efluentes tóxicos no processo de lavagem (PAUL, 2016; SAVITHA, 2011)

Porém, para que uma enzima possa ser utilizada nessa indústria, deve ser estável e ativa em pH alcalino e tem de ser compatível com outros agentes químicos presentes nos detergentes. Além disso, as enzimas devem ser estáveis em temperaturas maiores de 40°C,

atuar sobre diferentes substratos e precisam estar presentes em baixas concentrações nas formulações (CHERRY, 2003; ANWAR, 1998).

O aumento no uso dessas enzimas na fabricação de detergentes é devido ao elevado poder de limpeza das proteases alcalinas em detergentes não fosfatados e ecologicamente corretos. Além da melhora nas propriedades de limpeza dos detergentes, essas enzimas permitem que o processo de lavagem aconteça em menores temperaturas e períodos de agitação menores, o que resulta em um menor gasto de energia (SAVITHA, 2011; KUMAR, 1999)

As subtilisinas são as proteases mais empregadas na fabricação de detergentes, pois sua estabilidade foi aumentada a partir de mutagênese direcionada, tornando-as ideal para sua aplicação no processo. Muitas proteases alcalinas já foram purificadas e caracterizadas de bactérias do gênero *Bacillus* e, devido à sua alta especificidade, subtilisinas produzidas por *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* são as enzimas escolhidas para o uso na indústria de detergentes (HADDAR, 2009; BHASKAR, 2007; DODDAPANENI, 2007; PATEL, 2006). Além da subtilisina, duas proteases extraídas do fungo *Tritirachium album* também são aplicadas nessa indústria por sua alta estabilidade frente aos outros componentes do detergente (ANWAR, 1998).

2.2.3 Indústria alimentícia

Na indústria de alimentos, as proteases são principalmente aplicadas na produção de laticínios. Essas enzimas possuem propriedades coagulantes de leite e a maioria delas pertence à classe de aspártico proteases. Tanto proteases animais quanto vegetais e microbianas são utilizadas para coagulação do leite durante a fabricação de queijos (RANI, 2012; GUPTA, 2002). Essas proteases realizam a hidrólise de ligações peptídicas específicas

da molécula de caseína (proteína de reserva encontrada no leite) para a geração de ρ -caseína e outros macropeptídeos. A quimosina, produzida principalmente por leveduras, é a protease mais utilizada na produção de queijos e derivados devido a uma alta especificidade pela molécula de caseína e é responsável por um excelente desempenho na indústria de derivados do leite. Essa excelência é devida ao fato de que ela é completamente inativada em temperaturas de pasteurização, além de não deixar sabor amargo no produto final (RANI, 2012).

Sementes de soja são uma rica fonte de proteínas e suas proteases vêm sendo usadas na preparação de molho de soja e outros produtos derivados desse vegetal. As proteases alcalinas e neutras têm uma participação muito importante no processamento de soja, visto que atuam na hidrólise das proteínas dessas sementes. O tratamento das sementes com as proteases resulta em hidrolisados com grande solubilidade, altos teores protéicos e com sabores pouco amargos, sendo que esses hidrolisados são utilizados para a produção de bebidas ricas em aminoácidos, suplementos alimentares e alimentos dietéticos (RANI, 2012).

O amaciamento de carnes de origem bovina é outro processo que pode ser realizado com o uso de enzimas proteolíticas. A enzima proteolítica papaína é bastante conhecida e utilizada para o amaciamento de cortes de carne, pois ela é muito potente na hidrólise de proteínas fibrosas e tecido conjuntivo, tornando a carne mais macia e palpável para os consumidores (RANI, 2012).

Além da papaína, existem outras proteases isoladas de plantas que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, mais especificamente no amaciamento de carnes. São elas: bromelaína, que é extraída do abacaxi; actinidina, que é extraída do kiwi; e zingibaína, extraída do gengibre (RYDER, 2015; HA, 2012). Uma desvantagem dessas enzimas é que elas não são específicas e podem deixar a carne com textura indesejada e gosto amargo. Com

isso, proteases com maior especificidade produzidas por bactérias e fungos vêm sendo estudadas para resolver esses problemas (RYDER, 2015; HA, 2013).

Os hidrolisados proteicos geralmente formados a partir de caseína e proteínas do soro do leite e proteínas de soja possuem diversas aplicações como constituintes de alimentos dietéticos e produtos naturais, formulações infantis, suplementos para nutrição clínica, além de serem usadas em alimentos para pessoas alérgicas às proteínas do leite (SOUZA, 2015).

2.2.4 Liberação de peptídeos bioativos

Compostos bioativos são compostos essenciais e não essenciais que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia trófica e podem mostrar efeitos na saúde humana. Esses compostos naturais, que são constituintes dos alimentos, podem promover benefícios à saúde, além dos efeitos nutricionais básicos, como componentes “extra-nutricionais”.

As proteínas, além de exercerem funções nutricionais e tecnológicas, possuem dentro de sua estrutura primária sequências de aminoácidos que, ao sofrerem o processo de hidrólise, apresentam atividades biológicas, bioquímicas e fisiológicas nos organismos. Esses peptídeos liberados são chamados de peptídeos bioativos ou peptídeos biologicamente ativos (SHARMA, 2011; HEBERT, 2010; FIALHO 2015). Peptídeos bioativos podem ser definidos como fragmentos específicos de proteínas que possuem um impacto positivo nas funções do corpo humano e que podem influenciar na saúde. Numerosos peptídeos são estudados por possuírem efeitos benéficos na saúde do sistema cardiovascular, digestivo, imune e sistema nervoso, tudo dependendo da composição e sequência de aminoácidos liberados (TAVANO, 2013).

A liberação de peptídeos biologicamente ativos ocorre durante a digestão de proteínas no intestino, durante a hidrólise enzimática, através de processos químicos ou pelo processo

de fermentação. Pepsina, quimotripsina e especialmente tripsina são as enzimas mais empregadas para simular a liberação de peptídeos que ocorre na digestão gastrointestinal de proteínas. Outras enzimas, como as alcalases e termolisinas, também são estudadas para a produção de peptídeos. A liberação de fragmentos produzidos por diferentes proteases pode produzir peptídeos com uma ampla variedade de ações e aplicações (TAVANO, 2013).

Os peptídeos bioativos são caracterizados por exercerem atividades antimicrobiana, antitrombótica, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antinociceptiva e hipocolesterolêmica. O tamanho das sequências ativas desses peptídeos pode variar de 2 até 20 aminoácidos, dependendo de como ocorreu sua produção (KORHONEN, 2009; FIALHO, 2015 KORHONEN, 2006).

Recentemente, peptídeos biologicamente ativos vêm sendo sintetizados quimicamente para comprovar as propriedades fisiológicas apresentadas associadas às sequências específicas de aminoácidos. Existem evidências que muitos desses compostos bioativos possuem papéis multifuncionais, ou seja, alguns peptídeos possuem sequências que apresentam mais de uma atividade biológica. Ainda, aqueles com atividades semelhantes geralmente compartilham sequências similares (JABBARI, 2012). Algumas regiões das estruturas primárias das proteínas de reserva contêm sequências de peptídeos muito similares e que exercem diferentes papéis biológicos, como é o caso da caseína bovina e da caseína humana. Essas regiões são consideradas como zonas estratégicas que são parcialmente protegidas contra a ação da hidrólise por proteases (SRINIVAS, 2010).

Muitos pesquisadores vêm dando atenção para os peptídeos antimicrobianos derivados de animais e plantas por causa das suas atividades bastante efetivas contra microrganismos patogênicos, o que pode ser comparado com alguns antibióticos atuais. Peptídeos antimicrobianos derivados de proteínas de reserva apresentam vantagens sobre outras

substâncias por seu uso ser seguro tanto na medicina, prevenindo e tratando doenças, quanto na indústria alimentícia, para conservação de alimentos (BIRKEMO, 2009; JABBARI, 2012)

Atualmente, as proteínas do leite são consideradas como a fonte mais importante de peptídeos bioativos. Há um aumento no número de peptídeos identificados em hidrolisados das proteínas do leite e em produtos fermentados, o que se deve às propriedades que esses peptídeos liberados possuem (KORHONEN, 2006).

2.2.4.1 Liberação de peptídeos bioativos a partir da caseína

O uso de proteínas de reserva presentes em alimentos como fontes de peptídeos antimicrobianos vem sendo bastante estudado, pois há uma busca de novas moléculas com essas propriedades que sejam obtidas através de formas naturais. Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de reportar as propriedades antimicrobianas de algumas proteínas de alimentos, como a lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase, além de avaliarem sua capacidade de gerar peptídeos através de hidrólise enzimática (ADOUI, 2013). Os peptídeos liberados podem exercer também funções antioxidantes e anti-hipertensivas (DAROIT, 2012).

Caseínas são as proteínas mais abundantes no leite e são consideradas como uma fonte de vários peptídeos bioativos. De acordo com Lynch *et al.* (1998), a caseína tem um potencial em liberar peptídeos biologicamente ativos durante a sua digestão, pois elas estão presentes em altas concentrações no leite. Alguns peptídeos antimicrobianos já foram obtidos a partir da hidrólise da caseína com o uso de pepsina e quimosina e apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. (MALKOSKI, 2001; MINERVINI, 2003; BIRKEMO, 2009; LAHOV E REGELSON, 1996; LYNCH 1998).

Os peptídeos bioativos podem interagir com a carga negativa dos lipopolissacarídeos presentes na membrana exterior de bactérias gram-negativas e com a camada de ácido teicóico presente nos arredores do citoplasma de bactérias gram-positivas. O mecanismo de ação bactericida ainda precisa ser elucidado, mas parece incluir o aumento da permeabilidade da membrana celular, possível interferência desses peptídeos com algumas funções vitais das bactérias, bem como a incorporação dos peptídeos no citoplasma e inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas. Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis à ação desses peptídeos devido à ausência de uma membrana mais externa, que promove uma maior proteção (WADA, 2014; AGUILERA, 1999; HAUKLAND, 2001; ULVATNE, 2004).

Além da atividade antimicrobiana apresentada pelos peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína por proteases, esses peptídeos também apresentam atividades fisiológicas importantes. Peptídeos anti-hipertensivos que inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA) foram derivados da caseína através de hidrólise trípica. Peptídeos antitrombóticos que inibem a agregação plaquetária e impedem a ligação do fibrinogênio com receptores específicos nas plaquetas também foram derivados da hidrólise da caseína. Alguns peptídeos derivados da caseína apresentaram aumento na atividade fagocitária dos macrófagos humanos, participando de processos imunomodulatórios e de proliferação celular. E alguns peptídeos mostraram efeitos opióides similares aos efeitos da morfina através da hidrólise da caseína bovina por pepsinas (CHOBERT, 2012; SILVA, 2005)

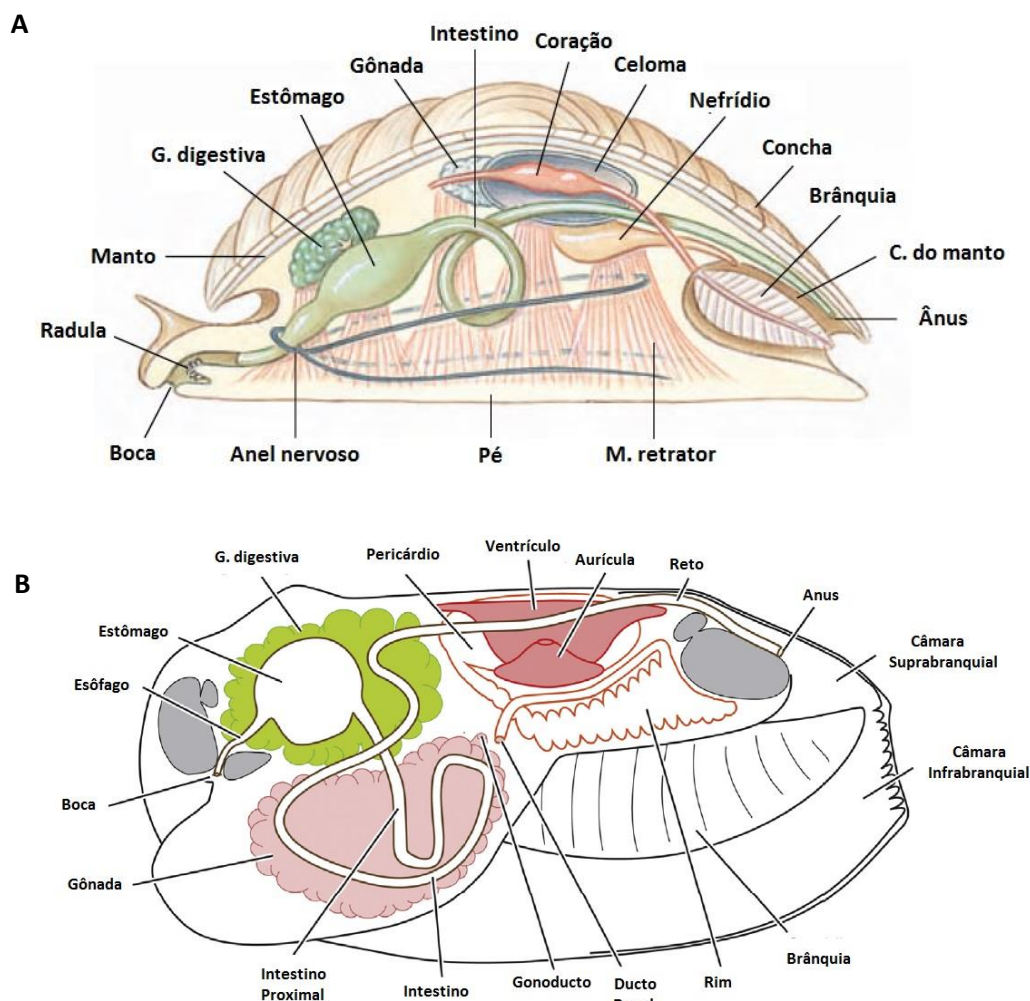
2.3 CLASSE BIVALVIA

A classe Bivalvia pertence ao filo Mollusca, sendo também denominada de Pelecypoda. É a segunda maior em número de espécies, depois de Gastropoda, com cerca de 20 mil espécies viventes descritas. O molusco bivalve típico (Figura 2) consiste de um corpo

com uma massa visceral, um pé, rodeado por um par de conchas calcificadas, e um manto, o qual produz a concha (MACIEL, 2011; CUMMINGS, 2015).

A concha dos bivalves serve como um ponto de ancoramento para diversos músculos, sendo as duas valvas articuladas por um ligamento dorsal elástico. Internamente, a massa visceral é composta pelo intestino, gônadas, coração e um sistema de nefrídeos (Figura 2B) que incluem uma hemocle aberta, o que permite e facilita a circulação e promove um suporte para o balanço hidrostático (CUMMINGS, 2015).

Figura 2 - Esquema geral da anatomia de um molusco (A) e especificamente de um molusco bivalve (B).



Fontes: HICKMAN (2001); CUMMINGS (2015)

A alimentação dessa classe de animais ocorre através da filtração de matéria orgânica. As partículas nutritivas selecionadas pelo animal são capturadas, percorrem o esôfago e chegam a um sistema digestivo complexo (Figura 2B) composto por um estômago, uma glândula digestiva, passam pelo intestino e são excretadas pelo ânus. A digestão ocorre parcialmente de maneira extracelular no lúmen do estômago. A digestão intracelular ocorre na glândula digestiva por meio de absorção e assimilação dos nutrientes ingeridos na dieta (CHEVALIER, 1995).

Os bivalves são amplamente utilizados como alimento e fornecem importante fonte de nutrientes, especialmente proteínas. Ostras, vieiras, amêijoas, berbigões e mexilhões são exemplos de animais dessa classe que são extensamente consumidos, podendo ser ingeridos crus ou cozidos. Por serem animais filtradores de matéria orgânica, o seu consumo pode ser perigoso quando os animais são coletados de ambientes poluídos, pois eles conseguem reter uma quantidade grande de contaminantes, podendo o consumidor sofrer algum tipo de intoxicação (BRUSCA, 2007; RUPPERT, 2005).

Além da importância econômica dessa classe, os bivalves têm grande importância ecológica em ambientes marinhos e estuarinos. Eles são excelentes indicadores de poluição ambiental, pois podem se desenvolver em comunidades com alta densidade de indivíduos devido à grande quantidade de matéria orgânica presente no ambiente, visto que esses animais se alimentam através da filtração da água e nutrientes que passam por toda a extensão do seu sistema digestivo completo (BRUSCA, 2007; RUPPERT, 2005).

Os estudos sobre enzimas proteolíticas de invertebrados têm sido focados nas suas funções na alimentação e digestão desses animais. Algumas proteases ácidas de bivalves marinhos já vêm sendo purificadas e caracterizadas. Além da participação dessas proteases na digestão dos moluscos, elas também contribuem para a síntese e degradação de proteínas que

participam da produção da matriz presente na concha (HOMAEI, 2016; MANNELLO, 2001; AIKAWA, 1982).

De acordo com Espinosa *et al.* (2016), um total de 23 proteases já foram identificadas e caracterizadas nas secreções mucosas de *Crassostrea virginica* (ostra americana), incluindo aspártico, cisteíno, metalo e serinoproteases. Um estudo anterior feito por Brun *et al.* (2000) mostrou que o muco secretado por ostras da espécie *Crassostrea virginica* possui pelo menos 3 proteases identificadas como protease ácida (96 kDa), uma metaloprotease dependente de zinco (64 kDa) e uma serinoprotease (33 kDa).

2.3.1 *Mytella charruana* d'Orbigny (Bivalvia, Mytilidae)

O gênero de moluscos bivalves *Mytella* (Figura 3) pertence à Família Mytilidae, Superfamília Mytiloidea, Ordem Mytilida, Subclasse Pteriomorphia. Dentre as espécies mais conhecidas estão *M. strigata* (mexilhão estriado), *M. charruana* (sururu de manta ou de pasta) e *M. guyanensis* (sururu de dedo ou bico-de-ouro). As conchas dos representantes dessas espécies são alongadas e contêm um umbo subterminal. A parte anterior do corpo desses animais é fina e sensível e exibe de 3 a 4 cavidades que servem como suporte para os músculos retratores frontais, que são igualmente finos e sensíveis (INTROINI, 2010).

Os espécimes variam de 22 a 50 mm e são bastante variados quanto à morfologia. A concha anterior é pequena e arredondada, o ângulo dorsal é proeminente e suas cores variam de amarelo/marrom até esverdeado na sua região dorsal, com coloração roxa na região interior das conchas (INTROINI, 2010).

M. charruana ocorre ao longo da costa brasileira e na região nordeste e é popularmente consumido como alimento típico da culinária local. Além do Brasil, essa espécie é distribuída ao longo do Pacífico, percorrendo a costa do México até o Equador e

Ilhas Galápagos. Já ao longo do Atlântico, percorre a costa da Venezuela até a Argentina (INTROINI, 2010 BORDREAUX E WALTERS, 2006). Milhares de espécimes de *M. charruana* são encontrados em zonas interditais, vivendo em populações de altas densidades em sedimentos arenosos e regiões estuarinas (INTROINI, 2010).

Figura 3 - Visão geral de um mexilhão da família Mytilidae.



Fonte: Rainer Zenz

Esses animais têm sido extensivamente usados como indicadores de poluição marinha e são considerados ótimos monitores de bioacumulação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em ambientes estuarinos. São animais que filtram grande quantidade de água marinha e podem acumular enormes quantidades de poluentes, sendo uma fonte de contaminantes de organismos marinhos que se alimentam deles (MAIOLI, 2010).

Entretanto, *M. charruana* tem o potencial de causar grandes problemas, pois quando introduzido de forma invasiva, esses animais podem se desenvolver em grandes densidades, tornando-se uma espécie invasora e com potencial risco de competição com outras espécies. (YUAN, 2010; PEREIRA, 2003).

Animais do gênero *Mytella* são amplamente utilizados para pesquisas na área de conservação e preservação do meio ambiente por serem excelentes indicadores de poluição ambiental por metais pesados e outros contaminantes. Porém, ainda não há estudos relatando os potenciais biotecnológicos que podem estar associados a estes animais, como purificação de enzimas digestivas, que são amplamente utilizadas na indústria de diversos segmentos. Além disso, esses animais podem ser utilizados e estudados com maior atenção no escopo da Biotecnologia.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Purificar e caracterizar uma protease presentes na massa visceral de *M. charruana* (MycP, do inglês *M. charruana* protease) e avaliar seu potencial na geração de peptídeos antimicrobianos a partir de caseína.

3.2 ESPECÍFICOS

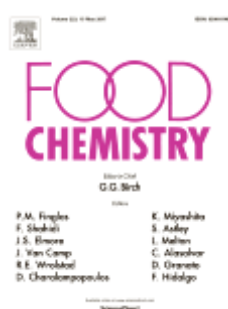
- Extrair proteases da massa visceral de *M. charruana*.
- Caracterizar a atividade proteolítica do extrato quanto à presença de serino, cisteíno, aspártico e metalo proteases.
- Purificar MycP a partir do extrato da massa visceral.
- Caracterizar a protease isolada quanto a ponto isoelétrico, massa molecular e composição em subunidades.
- Avaliar MycP quanto à atividade tripsina-símile.
- Caracterizar a atividade tripsina-símile de MycP frente a variações de temperatura e pH.
- Determinar parâmetros cinéticos da atividade tripsina-símile de MycP (K_m e $V_{máx}$).
- Obter hidrolisados de caseína utilizando MycP.
- Avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico dos peptídeos presentes no hidrolisado obtido.

4 ARTIGO

PURIFICATION OF A TRYPSIN-LIKE PROTEASE FROM THE VISCERAL MASS OF *Mytella charruana* AND EVALUATION OF ITS USE TO OBTAIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES DERIVED FROM CASEIN

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Food Chemistry”



Fator de Impacto: 4,052

Purification of a trypsin-like protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and evaluation of its use to obtain antimicrobial peptides derived from casein

Leonardo Prezzi Dornelles^a, Maria de Fátima Deodato de Souza^a, Ricardo Salas Roldan Filho, Pollyanna Michelle da Silva^a, Thamara Figueiredo Procópio^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Emmanuel Viana Pontual^b, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.*

^b*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: thiago86@yahoo.com.br

Abstract

Proteases have several biotechnological applications in chemical, pharmaceutical and food industries, for example. Storage proteins, such as those present in milk, have been pointed out as natural sources of bioactive peptides. The present work describes the purification and characterization of a protease from visceral mass of the mussel *Mytella charruana* (MycP) and evaluates its ability to hydrolyze milk casein and generate antimicrobial peptides. MycP was isolated through gel filtration chromatography (Sephadex G-75) and ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A25). MycP showed a pI of 4.1 and a single polypeptide band of 83.1 kDa in SDS-PAGE. MycP showed trypsin-like activity with optimal temperature of 40°C. This activity was stable in a wide pH range (3.0–9.0). The K_m for MycP was 4.28 ± 0.34 mM of BApNA and the V_{max} was 0.056 ± 0.001 nmol BApNA/min. MycP was able to promote the hydrolysis of casein and the hydrolysate was able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* with MIC of 5.0 µg/mL for all bacteria. Antifungal activity against the tested *Candida* species was not detected. In conclusion, the visceral mass of *M. charruana* contains a trypsin-like protease able to generate peptides with bacteriostatic effect from casein.

Keywords: protease; casein; antibacterial activity; bioactive peptides; bivalve mollusk.

1. Introduction

Proteases, enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds, occur in all organisms and display several physiological functions. In animals, proteases participate in essential processes such as food digestion, cell growth, morphogenesis, development, inflammation, activation of zymogens and prohormones, among others (Godfrey and West, 1996). In a biotechnological standpoint, proteases correspond to about 60% of the enzymes market for use in chemical, pharmaceutical and food industries (Kamal et al., 2016). In this scenario, new sources of proteases with biotechnological potential have been searched (Dadshahi et al., 2016; Marathe et al., 2016; Muthu et al., 2017).

In the chemical industry, proteases can be applied as constituents of detergents, in waste management and in the synthesis of peptides (Gúzman et al., 2007; Cavello et al., 2013; Bouacem et al., 2015). In food production, they can be used in the tenderization and maturation of meats, the fermentation of flours, and coagulation of milk, for example (Wang et al., 2009; Pontual et al., 2012; Zhang et al., 2017). In the pharmaceutical area, proteases have been highlighted as tools for diagnostic kits and production of bioactive peptides (Turk, 2006; Maestri et al., 2016).

Storage proteins, such as those present in milk and seeds, have been pointed out as natural sources of bioactive peptides. In their native state, these proteins usually do not exhibit the desired bioactivities, but when cleaved they release peptides with antioxidant, immunomodulatory and antimicrobial activity, for example (Pihlanto, 2016; Rémond et al., 2016). The variety of peptides that can be obtained is enormous, considering the specificity of each protease; in addition, many of these peptides are multifunctional (Meisel and Fitzgerald, 2003; Agyei et al., 2015). The hydrolysis of milk caseins has been applied to obtain peptides with different properties such as immunomodulatory, antioxidant, and angiotensin-converting enzyme inhibitory action (Phelan et al., 2009; Ibrahim et al., 2017).

The mussel *Mytella charruana* d'Orbigny (Bivalvia, Mytilidae) is native of the eastern Pacific Ocean and has widespread occurrence in Atlantic coast of South America and the Pacific coast of Central and South America being also known as an invasive species in North America (Cardenas and Aranda, 2000; Yuan et al.; 2010). In northeastern Brazil, *M. charruana* is popularly known as "sururu" and commercially exploited as food (Maioli et al., 2010). In addition, *M. charruana* is used as an indicator of marine pollution and is considered one of the best aquatic models to monitor the bioaccumulation of polyaromatic hydrocarbons in estuarine ecosystems (Baumard et al., 1999; Maioli et al., 2010). The biotechnological potential of this mussel has been little explored.

The need for novel antimicrobial agents is intermittent due to the constant appearance of strains resistant to commonly used antibiotics (Chaudhary, 2016). The hydrolysis of storage proteins can be an alternative to generate antimicrobial peptides. In this sense, the present work aimed to purify and characterize a new protease from *M. charruana* visceral mass, which was deemed MycP, as well as to evaluate its ability to hydrolyze milk casein and generate peptides with antibacterial and antifungal action.

2. Materials and methods

2.1. Protein extraction

M. charruana individuals were collected at the municipality of Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brazil (7°45'31.8"S 34°52'46.0"W). The mussels were transferred to the laboratory and the shells were opened. The fresh visceral mass (10 g) was homogenized with 0.1. M Tris-HCl pH 8.0 (100 mL) during 5 min using a blender. Next, the mixture was centrifuged (9,000 *g*, 15 min) and the supernatant corresponded to the extract. Protein

concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL) as standard.

2.2. *Protease activity assay*

Protease activity was evaluated as described by Azeez et al. (2007) with minor modifications. The sample (100 µL), 0.6% (w/v) azocasein (50 µL) and 0.1% (v/v) Triton X-100 (100 µL) were added to 300 µL of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 and this mixture was incubated at 37°C for 3 h. The reaction was stopped with the addition of 200 µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and the assay was incubated at 4°C for 30 min. Then, centrifugation (9,000 *g*, 10 min) was performed and the absorbance of the supernatant at 366 nm was read. Negative controls were carried out and differed from the test assays regarding the moment of TCA addition, which occurred prior to incubation at 37°C for 3 h, in order to prevent protease action. One unit (U) of protease activity corresponded to the amount of enzyme able to generate peptides in a concentration enough to increase the absorbance by 0.01 in comparison with the control. Specific protease activity was calculated by the ratio between the enzyme activity (U) and the amount of proteins (mg) used in the test. The assays were performed in triplicate.

2.3. *Effects of inhibitors on protease activity*

The extract from *M. charruana* visceral mass (100 µL) was incubated (37°C, 30 min) separately with inhibitor (8 mM, 100 µL) of serine proteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), cysteine proteases [trans-Epoxy succinyl-L-leucyl-amido (4-guanidino)butane; E-64], aspartyl proteases (pepstatin A) or metalloproteases (ethylene-diaminetetraacetic acid,

EDTA). Then, protease activity assay was performed as described in the previous section. Residual protease activity was determined in comparison with control without inhibitors (100% of activity).

2.4. *Protease purification*

The *M. charruana* extract (2 mL; 2.6 mg of protein) was submitted to a gel filtration chromatography using a Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) column previously equilibrated with 0.15 M NaCl. A flow rate of 20 mL/h was maintained and fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and protease activity. The protein peak from this chromatography with highest specific protease activity was dried by lyophilization, resuspended in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and loaded (2 mL; 3.6 mg of protein) onto a DEAE-Sephadex A25 (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) column previously equilibrated with this buffer. After washing step for removal of non-adsorbed proteins, the elution was performed using 1.0 M NaCl. The collected fractions (2.0 mL) were evaluated for absorbance at 280 nm and, after dialysis for removal of salt, the protein peaks were investigated for protease activity. The protein peak eluted with 1.0 M NaCl corresponded to MyCP.

2.5. *Protease characterization*

Electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970) to determine the number of subunits in MycP structure and estimate their molecular mass. For this, molecular mass markers (12–225 kDa, GE Healthcare Life

Sciences) were loaded on the same gel, which was stained with Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid (0.02%, v/v).

Isoelectric focusing (IEF) step was performed in order to determine the isoelectric point of MycP. The protease (150 μ g) was solubilized in rehydration buffer (8.0 M urea; 2%, w/v, CHAPS; IPG buffer pH 3-10 at 1%, v/v; 0.002% w/v bromophenol blue) and this solution was used in the rehydration of the strip (7 cm; linear gradient pH 3-10) for 16 h at 28°C. IEF was performed on the Ettan IPGPhor III (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) system at 25°C according to manufacturer's instructions. The strip was stained with 0.02% (w/v) Coomassie Blue G. After discoloration, the analysis was performed using ImageMaster (GE Healthcare) software.

Trypsin-like activity of MycP was evaluated using the synthetic substrate *N*-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA). The enzyme (50 μ L, 170 μ g of protein) was incubated for 30 min at 37°C with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (135 μ L) and the substrate (8 mM, 15 μ L). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of substrate per minute.

The optimal pH and temperature values for the trypsin-like activity of MycP were determined as described in the paragraph above but replacing the Tris buffer by others at different pH values (0.1 M citrate phosphate buffer pH 3.0 to 6.0, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 9.0) or changing the incubation temperature (30–100°C).

Kinetic parameters were calculated from the results of trypsin-like activity assays performed using different substrate concentrations (1.56–25 mM). The activity values were plotted on a graph and the Michaelis–Menten asymptotic kinetic parameters ($V_{\max}$ and K_m) were calculated using the MicrocalTM OriginTM program version 6.0 (Software Inc., USA).

2.6. Casein hydrolysis

MycP (100 μ L; 0.3 mg) was mixed with 300 μ L of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 and 50 μ L of 0.6% (w/v) casein. Next, 100 μ L of 0.1% (v/v) Triton X-100 was added and the assay was incubated at 37°C for 3 h. The reaction was stopped by heating at 100°C. Then, centrifugation (9,000 *g*, 10 min) was performed and the absorbance of the supernatant at 280 nm was read. In negative controls, the assay was heated prior to the incubation at 37°C. Casein hydrolysis was followed by the increase in absorbance. The assays were performed in triplicate and the values expressed as mean $\pm$ S.D. The supernatants corresponded to the peptide solution used in the antibacterial assay.

2.7. Antimicrobial assay

The peptides were evaluated for antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC-25922, *Micrococcus luteus* ATCC-2225, *Bacillus subtilis* UFPE-86 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665, all obtained from the culture collection (WDCM114) of the *Departamento de Antibióticos* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). Antifungal activity was evaluated against *Candida albicans* (URM 5901), *Candida tropicalis* (URM 6551), and *Candida krusei* (URM 6391) obtained from the Culture Collections of the University Recife Mycologia (URM), *Departamento de Micologia* from UFPE).

The bacteria were cultured in Mueller Hinton Broth (MHB) at 37°C overnight under gentle shaking. The yeasts were cultivated in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) at 30°C. For the experiments, the density of cultures was adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 3×10^6 CFU/mL. In each row of a 96-well microplate, 100 μ L of the peptides mixture (10 μ g/mL) were two-fold serial diluted in culture medium until a final ratio of 1:1,024. Next

20 μ L of microbial culture were added to each well. Wells containing only the culture medium or only the microorganisms in culture medium were used as sterility and 100% culture growth controls, respectively. The optical density (OD₆₀₀) was measured at time zero at 600 nm and then the assays were incubated at 37°C (bacteria) or 30°C (yeasts) for 24 h. After this period, the OD₆₀₀ was recorded again. The increase in OD₆₀₀ in comparison with time zero was considered as microbial growth. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration able to promote a reduction of OD₆₀₀ higher or equal to 50% in comparison with the 100% growth control. To determine the minimal bactericidal (MBC) or fungicidal (MFC) concentration, the supernatant (10 μ L) from each well where the growth inhibition was higher or equal to 50% was transferred to Mueller Hinton Agar (bacteria) or Sabouraud Dextrose Agar (yeast) plates, and incubated for 24 h. The MBC or MFC corresponded to the lowest concentration able to reduce the number of CFU in 99.9% in comparison with the initial inoculum. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

Antimicrobial assays were also performed using MycP (1.0 mg/mL) in order to eliminate the possibility of that the antimicrobial effect detected would be related with the presence of protease traces in the sample.

2.8. Statistical analysis

The data were expressed as the mean or the percent mean $\pm$ standard deviation (SD) and statistical differences were determined using Tukey's test; a *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

Studies on proteolytic enzymes of invertebrates have been performed demonstrating their functions in feeding and digestion processes of these animals. Some acidic proteases of marine bivalves have been purified and characterized and, besides the participation in the digestion, these enzymes contribute to the synthesis and degradation of the shell matrix (Aikawa, 1982; Mannello, 2001; Homaei, 2016). According to Espinosa et al. (2016), a total of 23 proteases were identified and characterized in the mucous secretions of *Crassostrea virginica* (American oyster), including aspartic, cysteine, metallo and serine proteases.

The extract of *M. charruana* visceral mass showed a high protease activity of 339.5 ± 8.5 U/mg, which stimulated us to undertake efforts to isolate an enzyme from this material. The protease inhibitors pepstatin A, PMSF and EDTA reduced significantly ($p < 0.05$) the enzyme activity of the extract in 55%, 59% and 24%, respectively, indicating the presence of aspartic, serine and metallo proteases. Since the buffers used in the protein extraction and enzyme activity assay did not contain metal ions, it can be assumed that the ions present in the metalloproteases in the extract are tightly bound to the enzyme structure and were removed only by treatment with the chelating agent EDTA.

Gel filtration chromatography of the *M. charruana* extract resulted in the separation of two protein peaks (Figure 1A), which were called PI and PII. Only PI showed protease activity and was then submitted to an ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A25 column. The chromatographic profile (Figure 1B) showed a single adsorbed protein peak eluted with 1.0 M NaCl, which showed protease activity and was deemed MycP. On the other hand, the peak containing the unadsorbed proteins did not show protease activity. MycP showed a single spot (pI 4.1) in IEF and a single polypeptide band in SDS-PAGE (Figure 1B, insets), confirming its homogeneity.

SDS-PAGE revealed a molecular mass of 83.1 kDa for MycP. The molecular mass found for MycP is not usual but a wide range of molecular mass have been reported for proteases from mollusks and other organisms. For example, Brun et al. (2000) showed that the mucus secreted by oysters of the species *Crassostrea virginica* has an acidic protease of 96 kDa, a zinc-dependent metalloprotease of 64 kDa and a serine protease of 33 kDa. Lee et al. (2003) purified and characterized a serine protease from the fungus *Aspergillus oryzae* and observed that the enzyme has a molecular weight of 90 kDa.

It has been reported the isolation of many serine proteases found in marine invertebrates. The digestive juice of the mollusk *Archachatina ventricosa* contains serine proteases (Guionie et al., 2003) and enzymes with trypsin activity are expressed in the liver, gut, gills, heart, foot, adductor muscle and gonads of the bivalve *Hyrio psiscumingii* (Wang et al., 2014). These enzymes participate in immunological responses, such as hemolymph coagulation and synthesis of antimicrobial peptides (Zhu et al., 2007). Due to the widespread occurrence of serine proteases in marine organisms and since PMSF (serine protease inhibitor) promoted the highest reduction in protease activity of *M. charruana* extract, we investigated MycP for trypsin-like activity using the substrate BApNA. Indeed, this protease was able to promote the cleavage of this substrate (1.198 mU/mg) being then an enzyme able to break peptide bonds involving arginine residues.

MycP showed highest trypsin-like activity when the incubation with the substrate occurred at 40°C. The enzyme had its catalytic activity remarkably reduced when the assays were performed at 50–70°C but did not work only at temperatures from 80°C (Figure 2A). The highest activity was detected in assay performed at pH 3.0 but the enzyme remained active at a wide pH range evaluated (Figure 2B). According to the results from kinetic assay (Figure 3), the K_m for MycP was 4.28 ± 0.34 mM of BApNA and the V_{max} was 0.056 ± 0.001 nmol BApNA/min.

The *Tiliapia nilotica* protease showed optimal pH and temperature of 2.5 and 35°C, respectively, values near to those found for *M. charruana* protease (El-Beltagy et al., 2004). Aikawa et al. (1982) also reported protease activity from mollusk tissues with optimum pH between 2.5 and 3.5. Also similarly to MycP, a trypsin-like protease from the bivalve *Chlamys hericius* was active in the broad pH range 2.5–7.5 (Reid et al., 1970) and Lee et al. (2003) reported a serine protease with trypsin-like activity from *A. oryzae* with optimum pH around 4.0.

MycP was able to promote the hydrolysis of casein (ABS 280nm: 0.100) and the hydrolysate was then evaluated for antibacterial activity. The peptides generated were able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* with MIC of 5.0 µg/mL for all bacteria. However, the bacteria were able to grow on agar plates when removed from the liquid medium containing the peptides. These results show that the peptides released from the hydrolysis of casein by *M. charruana* protease only showed bacteriostatic effect. Antifungal activity against the tested *Candida* species was not detected.

Adoui et al. (2013) evaluated the effects of peptides released from casein hydrolysis by pepsin on several strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Similar to our results, these authors detected only bacteriostatic activity. Daroit et al. (2013) also observed bacteriostatic activity of hydrolysates from ovine casein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *E. coli*, *Celluloma fimi* and *Listeria monocytogenes*. Casecidin, a peptide derived from casein hydrolysis by chymosin, showed antibacterial activity against several pathogens, such as *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus pyogenes*, and isracidin, another peptide derived from casein, demonstrated antibacterial and antifungal activity against *S. aureus* and *Candida albicans*, respectively (Rutherford-Markwick, 2005)

4. Conclusion

The visceral mass of *M. charruana* contains a trypsin-like protease that display good catalytic property at a broad pH range and temperature until 50°C as well as able to generate peptides with bacteriostatic effect from casein.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (PMGP), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. LPD would like to thank CNPq for graduate scholarship. TAL would like to thank FACEPE for researcher fixation (BFP-0089-2.08/16) scholarship.

References

- Adoui, F., Boughera, F., Chataigne, G., Chihib, N., Hameur, H. El, Dhulster, P., & Zidoune, M. N. (2013). A Simple Method to Separate the Antimicrobial Peptides from Complex Peptic Casein Hydrolysate and Identification of a Novel Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine α s -Casein, 5(February), 179–187.
- Agyei, D., Potumarthi, R. and Danquah, M. K. (2015) Food derived multifunctional bioactive proteins and peptides, in *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and*

- applications (eds V. K. Gupta and M. G. Tuohy), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9781118733103.ch19
- John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9781118733103.ch19
- Aikawa, T., & Aikawa, Y. (1982). Distribution of Acid Proteinase Activity in Molluscs. *Biochemical Systematics And Ecology*, 10(2), 175–179.
- Azeez, A., Sane, A. P., Bhatnagar, D., & Nath, P. (2007). Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, 68(10), 1352–1357. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.027>
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., & Bellocq, J. (1998). Concentrations of PHAs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, 36(12), 951–960. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00088-5)
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Laribi-Habchi, H., Elhoul, M. Ben, Hmida-Sayari, A., Hacene, H., ... Bejar, S. (2015). Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.011>
- Brun, N. T.; Ross, N. W.; Boghen, A. D. (2000) Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma Cyprinae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75 (2), 163-170
- Cardenas, E. B., & Aranda, D. A. (2000). A Review Of Reproductive Patterns Of Bivalve Mollusks From Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 66(1), 13–27.
- Cavello, I. a., Hours, R. a., Rojas, N. L., & Cavalitto, S. F. (2013). Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS

876. *Process Biochemistry*, 48(5-6), 972–978.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.012>

Chaudhary, A. S. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics?? discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6), 552–556.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.004>

Dadshahi, Z., Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R. H., & Khajeh, K. (2016). Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*,

202, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.104>

Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Canales, M. M., Coelho, J. G., Hidalgo, M. E., Tichota, D. M., ... Brandelli, A. (2012). Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. *Dairy Science and Technology*, 92(4), 335–351.

<https://doi.org/10.1007/s13594-012-0068-3>

El-Beltagy, a. E., El-Adawy, T. a., Rahma, E. H., & El-Bedawey, a. a. (2005). Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Journal of Food Biochemistry*, 29(5), 445–458.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00019.x>

Espinosa, E. P., Koller, A., & Allam, B. (2015). Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Proteomics*, 132, 63–

76. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018>

Guionie, O., Moallic, C., Niamké, S., Placier, G., Sine, J.-P., & Colas, B. (2003). Identification and primary characterization of specific proteases in the digestive juice

of *Archachantina ventricosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 135, 503–510. <https://doi.org/10.1016/S1096-4959>

- Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide Synthesis: Chemical or Enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1–42. <https://doi.org/10.2225/vol10>
- Homaei, A., Lavajoo, F., & Sariri, R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>
- Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002>
- Kamran, A., Ur Rehman, H., Ul Qader, S. A., Baloch, A. H., & Kamal, M. (2015). Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.01.002>
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, B. R., Furukawa, M., Yamashita, K., Kanasugi, Y., Kawabata, C., Hirano, K., ... Ichishima, E. (2003). Aorsin, a novel serine proteinase with trypsin-like specificity at acidic pH. *The Biochemical Journal*, 371(Pt 2), 541–548. <https://doi.org/10.1042/BJ20021691>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maestri, E., Marmioli, M., & Marmioli, N. (2016). Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *Journal of Proteomics*, 147, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.048>

- Maioli, O. L. G., Rodrigues, K. C., Knoppers, B. a., & Azevedo, D. a. (2010). Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Munda?? Lagoon, Brazil. *Microchemical Journal*, 96(1), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.03.001>
- Mannello, F., Canesi, L., Gazzanelli, G., & Gallo, G. (2001). Biochemical properties of metalloproteinases from the hemolymph of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(3), 507–515. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00352-3](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00352-3)
- Marathe, K., Kasar, S., Chaudhari, A., & Maheshwari, V. (2016). Purification and characterization of a novel heterodimer protease inhibitor from *Streptomyces* spp. VL J2 with potential biopesticidal activity against *H. armigera*. *Process Biochemistry*, 51(10), 1650–1663. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.010>
- Meisel H. and FitzGerald R. J. (2003). Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(7), 1289–1295. <https://doi.org/10.2174/1381612033454847>
- Muthu, S., Gopal, V. B., Soundararajan, S., Nattarayan, K., Narayan, K. S., Lakshmikanthan, M., ... Perumal, P. (2017). Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.003>
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.001>
- Pihlanto, A. (2016). Milk Proteins: Bioactive Peptides. In *Encyclopedia fo Dairy Sceiences* (Second Ed. pp. 879–886).

- Pontual, E. V., Carvalho, B. E. a, Bezerra, R. S., Coelho, L. C. B. B., Napole??o, T. H., & Paiva, P. M. G. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135(3), 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>
- Reid, R. G. B., & Rauchert, K. (1972). Protein Digestion in Members of the Genus *Macoma* (Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.*, 41, 887 – 895.
- Rémond, D., Savary-Auzeloux, I., & Boutrou, R. (2016). Bioactive Peptides Derived From Food Proteins. In *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins* (pp. 3–11). Tokyo: ACADEMIC PRESS, INC.
- Rutherford-Marwick, K. J., & Moughan, P. J. (2005). Bioactive Peptides Derived from Food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955–966.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 785–799. <https://doi.org/10.1038/nrd2092>
- Wang, H., Liang, J., Zhao, Y., Liu, Q., Li, Y., Yi, Z., ... Xiao, T. (2014). Molecular cloning, characterization and expression analysis of trypsin-like serine protease from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.032>
- Wang, R., Godoy, L. C., Shaarani, S. M., Melikoglu, M., Koutinas, A., & Webb, C. (2009). Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(4), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.002>
- Yuan, W., Walters, L. J., Schneider, K. R., & Hoffman, E. a. (2010). Exploring the Survival Threshold: A Study of Salinity Tolerance of the Nonnative Mussel *Mytella Charruana*. *Journal of Shellfish Research*, 29(2), 415–422. <https://doi.org/10.2983/035.029.0218>

- Zhang, B., Sun, Q., Liu, H.-J., Li, S.-Z., & Jiang, Z.-Q. (2017). Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.012>
- Zhu, L., Song, L., Zhao, J., Xu, W., & Chang, Y. (2007). Molecular cloning, characterization and expression of a serine protease with clip-domain homologue from scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol*, 22(5), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.002>

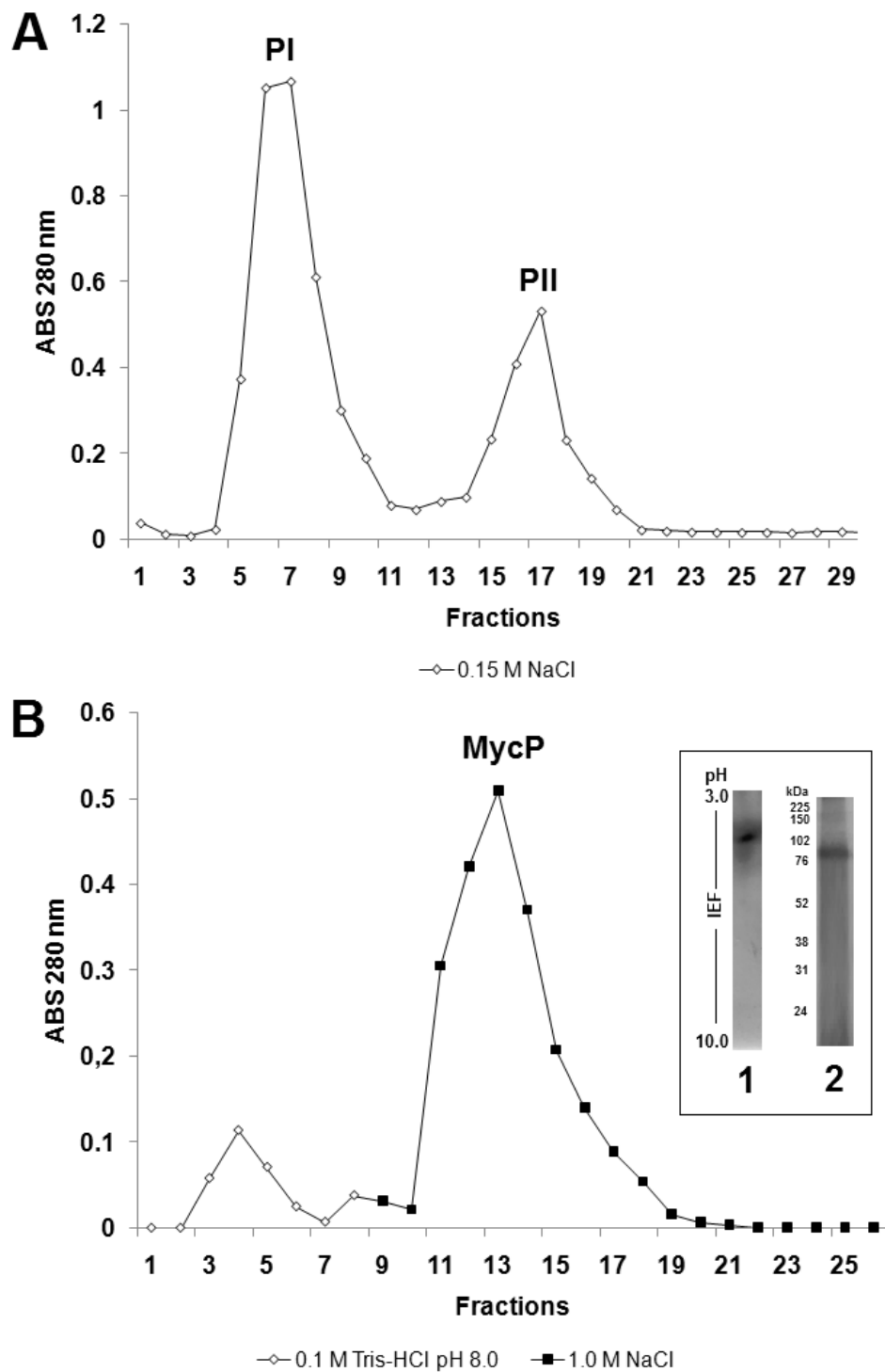


Figure 1. Purification of *Mytella charruana* protease (MycP). (A) Chromatography of visceral mass extract on Sephadex G-75 column performed using 0.15 M NaCl (flow rate: 0.5 mL/min) as mobile phase. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm). (B) Ion exchange chromatography of PI on DEAE-Sephadex column. Washing step used 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Elution was performed with this buffer containing 1.0 M NaCl. Fractions of 3.0 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and evaluated for ABS 280 nm. The insets show the isoelectric focusing, IEF (1) and SDS-PAGE (2) of MycP.

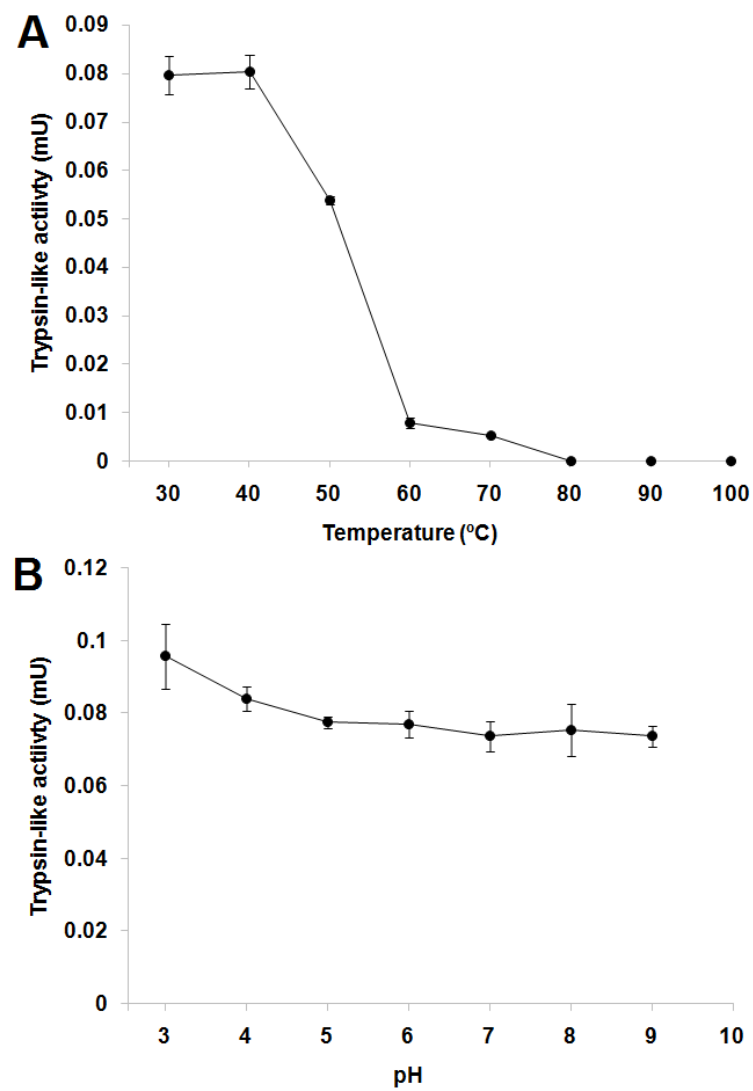


Figure 2. Trypsin-like activity of *Mytella charruana* protease (MycP) varying the temperature (A) and pH (B) of the enzymatic assay.

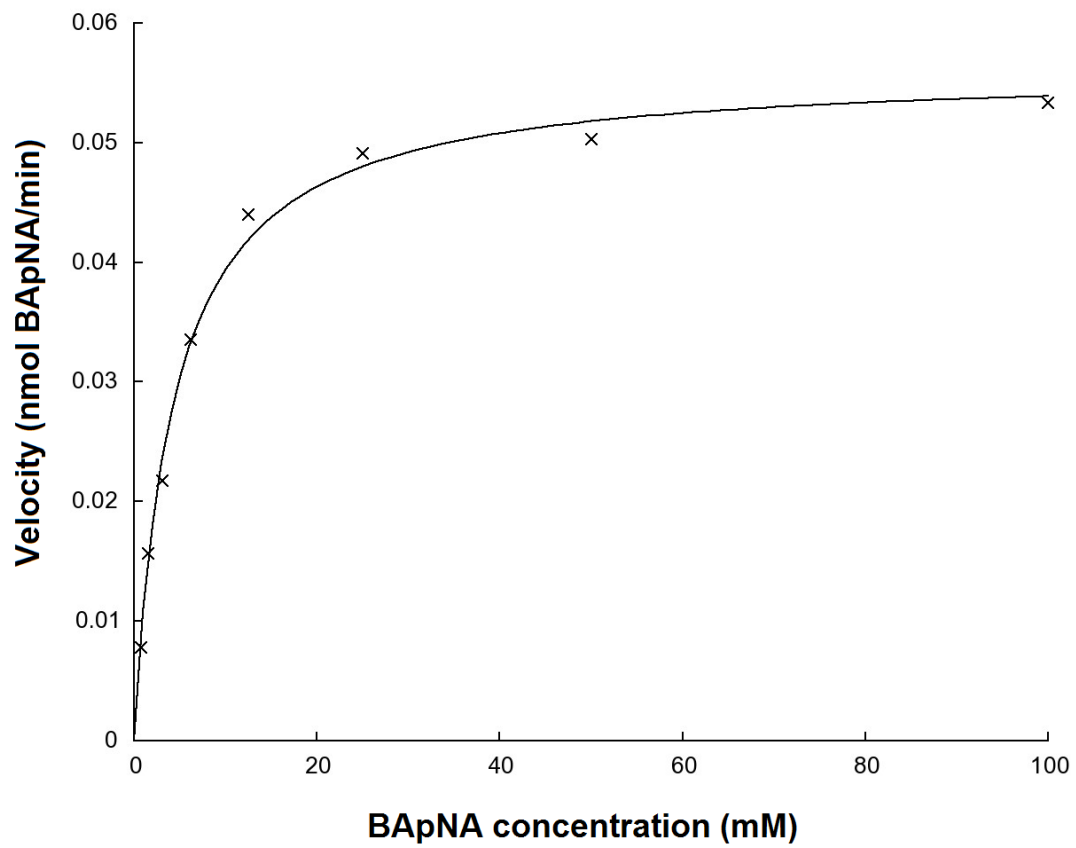


Figure 3. Michaelis–Menten plot of the catalytic activity of *Mytella charruana* protease (MycP) towards the substrate N- α -benzoyl-DL-arginyl- p -nitroanilide (BApNA).

5 CONCLUSÃO

A massa visceral de *Mytella charruana* contém uma protease (MycP) com atividade tripsina-símile que apresentou propriedades catalíticas estáveis em uma ampla faixa de pH e em temperaturas de até 50° C. MycP apresentou atividade caseinolítica, liberando peptídeos que apresentaram atividade bacteriostática contra 4 espécies diferentes de bactérias.

REFERÊNCIAS

ADOUI, F. et al. A Simple Method to Separate the Antimicrobial Peptides from Complex Peptic Casein Hydrolysate and Identification of a Novel Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine α s -Casein. v. 5, n. February, p. 179–187, 2013.

AGUILERA, O. et al. Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. **FEBS Letters**, v. 462, n. 3, p. 273–277, 1999.

AIKAWA, T.; AIKAWA, Y. Distribution of Acid Proteinase Activity in Molluscs. v. 10, n. 2, p. 175–179, 1982.

ALMONTE, A. G.; SWEATT, J. D. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. **Brain Research**, v. 1407, p. 107–122, 2011.

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 637–650, 2005.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175–183, 1998.

BALTI, R. et al. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 146–154, 2009.

BHASKAR, N. et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2758–2764, 2007.

BIRKEMO, G. A. et al. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 233–240, 2009.

BOUDREAUX, M. L.; WALTERS, L. J. *Mytella charruana* (Bivalvia: Mytilidae): a new, invasive bivalve in Mosquito Lagoon, Florida. **The Nautilus**, v. 120, n. 1, p. 34–36, 2006.

BRUN, N. T.; ROSS, N. W.; BOGHEN, A. D. Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the

turbellarian *Urastoma Cyprinae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 2, p. 163-170, 2000.

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C. **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.p. 1092

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: An update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438–443, 2003.

CHOBERT, J.-M. Milk protein modification to improve functional and biological properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 47, n. 3, p. 171–197, 2003.

CUMMINGS, K. S.; GRAF, D. L. **Class Bivalvia**. In: THORP, J. H.; ROGERS, D. C. Thorp and Couch's Freshwater Invertebrates. London: Academic Press, 2015. p. 423-506

DADSHAHI, Z. et al. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.

DAROIT, D. J. et al. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science and Technology**, v. 92, n. 4, p. 335–351, 2012.

DAYANANDAN, A. et al. Application of an alkaline protease in leather processing: An ecofriendly approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 11, n. 5, p. 533–536, 2003.

DE CASTRO, R. J. S. et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199–207, 2015.

DE SOUZA, T. O. et al. Population structure and identification of two matrilinear and one patrilinear mitochondrial lineages in the mussel *Mytella charruana*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 156, n. 1, p. 165–174, 2015.

DODDAPANENI, K. K. et al. Purification and characterization of two novel extra cellular proteases from *Serratia rubidaea*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1229–1236, 2007.

ESPINOSA, E. P.; KOLLER, A.; ALLAM, B. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of proteomics**, v. 132, p. 63–76, 2015.

FERRAREZE, P. A. G.; CORREA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102–109, 2016.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo minas artesanal da Camastra**. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2015

FREITAS, A. C. V et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596–1602, 2012.

GEORGE, N. et al. Approach to ecofriendly leather: Characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale. **Journal of Cleaner Production**, v. 79, p. 249–257, 2014.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

HA, M. et al. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 95–105, 2012.

HADDAR, A. et al. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3366–3373, 2009.

HAUKLAND, H. H. et al. The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. **FEBS Letters**, v. 508, n. 3, p. 389–393, 2001.

HEBERT, E. M.; SAAVEDRA, L.; FERRANTI, P. Bioactive Peptides Derived from Casein and Whey Proteins. In: MOZZI, F.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. *Biotechnology of larvicidal bacteria: novel applications*. Ames: **Wiley-Blackwell**. p. 233-249, 2010

HEUTINCK, K. M. et al. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1943–1955, 2010.

HICKMAN, C.; ROBERTS, L.; LARSON, A. **Integrated Principles of Zoology**. Edição 11. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 918

HOMAEI, A.; LAVAJOO, F.; SARIRI, R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 542–552, 2016.

KHALED, H. BEN et al. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 847–853, 2011.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 9, p. 649–65, 2013.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 891–897, 1993.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006.

KTARI, N. et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 467–474, 2012.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561–594, 1999.

INTROÍNI, G. O. et al. Sperm ultrastructure of *Mytella* (Bivalvia) populations from distinct habitats along the northern coast of São Paulo State, Brazil. **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 103–111, 2010.

JABBARI, S. et al. Antimicrobial Peptides from Milk Proteins : A Prospectus. **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 11, p. 5313–5318, 2012.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casacidin, isracidin peptides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 131–145, 1996.

LE CHEVALIER, P.; SELLOS, D.; VAN WORMHOUDT, A. Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from the digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 4, p. 777–784, 1995.

LI-PING, G. A N.; REN-HUA, L. I. U.; YAN-JIE, L. I. Serine proteinase (SP) and serine protease inhibitor (serpin) gene expression after hormone treatment in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1203–1210, 2016.

LYNCH, J.M.; BARBANO, D. M.; FLEMING, J. R. Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: collaborative study. **J. AOAC Int**, v. 81, n. 4, p. 763-774, 1998

MACIEL, D. C. Reproductive Biology Tributyltin effects on *Mytella charruana* and *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia-Mollusca) from Capibaribe River Estuary, Pernambuco. p. 95, 2011

MAIOLI, O. L. G. et al. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Munda?? Lagoon, Brazil. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 172–179, 2010.

MALKOSKI, M. et al. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2309–2315, 2001.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. et al. Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. xx, p. 76–82, 2015.

MANNELLO, F. et al. Biochemical properties of metalloproteinases from the hemolymph of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 3, p. 507–515, 2001.

MEISEL H. AND FITZGERALD R. J. Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 7, p. 1289–1295, 2003.

MINERVINI, F. et al. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5297–5305, 2003.

PATEL, R. K. et al. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2002–2009, 2006.

PAUL, T. et al. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8–22, 2016.

PEREIRA, O. M. et al. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do Estuário de Ilha Comprida – SP – BRASIL. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 29, n. 2, p. 139–149, 2003.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 625–633, 2010.

POLAINA, J.; MACCABE, A. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Dordench: Springer, 2007. p. 641

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on Latest Overview of Proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 12–18, 2012.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRET A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270-D272, 2006.

ROMERO, F. J. et al. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507–515, 2001.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 2005. p. 1168

RYDER, K. et al. Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. **Food Chemistry**, v. 172, p. 197–206, 2015.

SAVITHA, S. et al. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298–304, 2011.

SHARMA, S.; SINGH, R.; RANA, S. Bioactive Peptides: A Review. **Int. J. Bioautomation**, v. 15, n. 4, p. 223–250, 2011.

SHEN, H. B.; CHOU, K. C. Identification of proteases and their types. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 153–160, 2009.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Casein as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, p. 16, 945–960, 2005.

SRINIVAS, S.; PRAKASH, V. Bioactive peptides from bovine milk κ -casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 16, n. 1, p. 7–15, 2010.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

ULVATNE, H. et al. Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 377–384, 2004.

WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503–14, 2014.

YUAN, W. et al. Exploring the Survival Threshold: A Study of Salinity Tolerance of the Nonnative Mussel *Mytella Charruana*. **Journal of Shellfish Research**, v. 29, n. 2, p. 415–422, 2010.