

Obtención y caracterización de proteasa alcalina en mejillón (*Mytilus edulis platensis*)

Characterization of alkaline protease from mussel (*Mytilus edulis platensis*)

*Cecilia Crovetto¹, Vanesa Alvarez¹, Susana Risso¹, Martin Varisco^{1,2}

¹Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, UNPSJB, Km4, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

²Instituto de Desarrollo Costero (IDC), Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

*cecicrove@gmail.com

Resumen

La tripsina es una endoproteasa digestiva, con máxima actividad catalítica a pH alcalino. La mayor parte de la tripsina comercial se obtiene del duodeno y/o del páncreas bovino. La tripsina de origen marino tiene gran interés debido a que exhibe mayor actividad catalítica que la de los mamíferos y retiene un alto grado de actividad a temperaturas elevadas, beneficioso para los procesos biotecnológicos. El objetivo del trabajo fue obtener proteasas alcalinas del hepatopáncreas del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) y realizar su caracterización bioquímica como paso primordial para evaluar a posteriori las posibilidades de aprovechamiento de su hepatopáncreas en la industria.

Los mejillones fueron recolectados manualmente en Caleta del Fondo, Golfo San Jorge, Argentina. Se obtuvo el homogenato multienzimático a partir del hepatopáncreas. Se cuantificaron proteínas totales solubles mediante la técnica de Lowry. El extracto multienzimático se separó por electroforesis SDS-PAGE y se identificó la actividad proteásica mediante zimografía a pH 9 utilizando gelatina co-polimerizada como sustrato. En la fracción proteica se detectó la presencia de una banda correspondiente a 24 kDa, compatible con masa molecular aparente de tripsina. La temperatura óptima de actividad enzimática fue a 60 °C y el pH 9, determinados utilizando BAPNA como sustrato. La tripsina aislada mostró termorresistencia lo que la convierte en una enzima de interés para potenciales aplicaciones tecnológicas. Su caracterización parcial ha sido un paso primordial para evaluar *a posteriori* las posibilidades de aprovechamiento del hepatopáncreas del mejillón *Mytilus edulis*.

Palabras clave: Hepatopáncreas, mejillón, proteasa, tripsina

Abstract

Trypsin is a digestive endoprotease, with maximum catalytic activity at alkaline pH. Most commercial trypsin is obtained from bovine duodenum and/or pancreas. The trypsin of marine origin is of great interest because it exhibits greater catalytic activity than that of mammals and retains a high degree of activity at high temperatures, beneficial for biotechnological processes. The objective of the work was to obtain alkaline proteases from the digestive gland of the blue mussel (*Mytilus edulis platensis*) and to carry out its biochemical characterization as a fundamental step to evaluate a posteriori the possibilities of using its hepatopancreas in the industry.

The mussels were collected manually in Caleta del Fondo, San Jorge Gulf, Argentina. The multienzyme homogenate was obtained from the digestive gland (hepatopancreas). Total soluble proteins were quantified using the Lowry technique. The multi-enzyme extract was separated by SDS-PAGE electrophoresis and protease activity was identified by zymography at pH 9 using co-polymerized gelatin as substrate. In the protein fraction, the presence of a band corresponding to 24 kDa was detected, compatible with the apparent molecular mass of trypsin. The optimal temperature of enzymatic activity was at 60 °C and pH 9, determined using BAPNA as a substrate. The isolated trypsin showed thermoresistance, which makes it an interesting enzyme for potential technological applications. Its partial characterization has been a fundamental step to evaluate a posteriori the possibilities of using the hepatopancreas of the mussel *Mytilus edulis*.

Keywords: hepatopancreas, mussel, protease, trypsin.

Introducción

El mejillón (*Mytilus edulis platensis*) es un molusco bivalvo sujeto a explotación comercial en el golfo San Jorge, Argentina. La especie es también objeto de varias experiencias e iniciativas de maricultura en la región patagónica. Debido al interés comercial de la especie, se han estudiado su composición química y calidad nutricional (Colombo et al.

2016). Los mejillones poseen una hepatopáncreas como glándula digestiva que cumple a la vez las funciones de hígado y páncreas, por lo que es productor de una gran cantidad de proteasas digestivas, de las cuales, no se han reportado estudios bioquímicos hasta el momento.

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una enzima miembro de la familia de las serin-

proteasas que hidroliza específicamente proteínas y péptidos del extremo Carboxilo terminal, entre los residuos arginina y lisina, cumpliendo un rol importante en procesos biológicos (Cao et al. 2000). Posee máxima actividad catalítica a pH alcalino y se utiliza en la industria para el servicio de lavandería, alisado de cueros, elaboración de cerveza, ablandamiento de carnes y en la industria farmacéutica entre otras.

Al presente, la mayor parte de la tripsina comercial es de origen bovino obteniéndola del duodeno y/o del páncreas. Sin embargo, países con alto desarrollo de la pesca han realizado estudios de aislamiento y caracterización de estas enzimas a partir de vísceras de peces como: atún rojo (*Thunnus thynnus*) (Essed, 2002), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al, 2005), Sardina monterrey (*S.sagax cearula*) (Castillo Yañez et al., 2005), atún amarillo (*Thunnus albacores*) (Klomklao et al 2006), atún (*Katsuwonus pelamos*) (Klomklao et al. 2007) pez bonito (*Sarda sarda*) (Klomklao et al. 2007), Sardinella (*Sardinella aurita*) (Khaled et al. 2008), lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) (Cai et al., 2011). En la Argentina se ha aislado y caracterizado la tripsina de merluza (*Merluccius hubbsi*) (Lamas,

2015) y de anchoíta *Engraulis anchoita* (Lamas et al., 2017).

El aislamiento y estudio de las enzimas proteolíticas de invertebrados han revelado la presencia de enzimas a pH neutro o alcalino (Dumitru, 1978). La tripsina de crustáceos fue aislada y caracterizada por primera vez de la glándula digestiva del langostino *Penaeus setiferus* (Gates, 1969). En Chile, se aisló la enzima de glándula digestiva de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835) (Buñuelos-Vargas et al., 2018). En el caso de los moluscos, a pesar de ser uno de los phyla de invertebrados más abundantes, los estudios de este tipo son escasos. En particular, no se han reportado estudios sobre la actividad de proteasas alcalinas aisladas de la glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis platensis*.

Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue obtener proteasas alcalinas del hepatopáncreas del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) y realizar su caracterización bioquímica como paso primordial para evaluar *a posteriori* las posibilidades de aprovechamiento de su hepatopáncreas en la industria.

Materiales y métodos

Obtención del extracto multienzimático a partir del hepatopáncreas de mejillón

Para la obtención del material biológico se utilizaron 50 mejillones recolectados manualmente en Caleta del Fondo en el Golfo San Jorge, en la provincia de Santa Cruz, Argentina (46°01'S, 67°35'O). Los hepatopáncreas fueron pesados, y homogeneizados a 4 °C, en buffer fosfato 40 mM pH 7,4 con el fin de obtener el extracto multienzimático. El mismo se mantuvo a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación de proteínas solubles

Para la determinación de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de Lowry (Lowry, 1951). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 750 nm. La recta patrón se construyó con una solución estándar de albúmina bovina 1 mg/ml.

Determinación de la masa molecular mediante Electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de analizar los extractos proteicos multienzimáticos y evidenciar la presencia de proteasas alcalinas y su masa molecular aparente, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según el método de Shagger y von Jagow (1987). Se utilizó un equipo Mini-Protean II de

BioRad en un sistema discontinuo de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). Se sembraron 5 ul de Marcador de peso molecular Rainbow Marker (Full Range) y 5 ul y 10 ul del extracto multienzimático del hepatopáncreas.

Determinación de actividad de proteasa alcalina

La actividad de proteasa alcalina se analizó por el método propuesto por Erlanger (1961), usando BAPNA 1 mM (N- α -Benzoilo-DL-arginina-4-nitroanilida) en Tris HCl 50 mM pH 8, 20 mM CaCl₂ como sustrato para la enzima tripsina, donde la unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 umol de p-nitroanilida liberada por minuto, el cual se midió por espectrofotometría a 410 nm. Se determinó la temperatura óptima de actividad enzimática ensayando la reacción a 4, 37 y 60 °C (Jesús-Ramirez, 2017). La actividad proteolítica se expresó en U/mg %. Se determinó el pH óptimo de actividad enzimática realizando la reacción a pH entre 4 y 11 utilizando un buffer universal (Stauffer, 1989) en función del tiempo de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de Actividad proteásica mediante Zimografía

Esta técnica electroforética simple, sensible y cuantificable se utilizó para el análisis de la actividad proteolítica. Se basa en el uso de un gel de poliacrilamida co-polimerizado con un sustrato proteico, en particular gelatina, caseína o fibrina (García- Carreño, 1992; Merino-Contreras, 2018).

Se realizó un tipo de zimografía que utiliza gelatina como sustrato, ampliamente utilizada para evidenciar actividad de gelatinasas (Lockwoods et al. 1987). La gelatina soluble (colágeno desnaturalizado) es co-polimerizada con poliacrilamida para formar el gel. Se utilizan condiciones suaves de desnaturalización (sin agentes reductores) para evitar la pérdida definitiva de la actividad de las enzimas estudiadas. La electroforesis se realizó en buffer Tris-glicina-SDS a 75 mV (por gel) a voltaje constante y en frío, durante 2,5 horas. El gel se lavó con 50 mL de TritonX-100 al 2.5% durante 20-30 min en agitación continua por tres veces consecutivas. Luego se incubó en 50 mL de buffer Tris-HCl a pH 9,0 a 4°C durante 12 h. Una vez desarrolladas las áreas para la detección de la actividad enzimática, se tiñeron con

azul de Coomassie R-250 0,1 % p/v por 12 h. y se destiñó con solución decolorante que contiene metanol, ácido acético y agua (3:1:6). Se utilizó un marcador de peso molecular PB-L Productos Bio-Lógicos (Low Range): Lisozima 14.000 Da, Inhibidor de tripsina soja 21.000 Da, Anhidrasa carbónica 29.000 Da, Ovoalbúmina 45.000 Da, Albúmina sérica bovina 66.000 Da y Fosforilasa B 94.000 Da.

Resultados

Cuantificación de proteínas totales en homogenato

La concentración de proteínas totales solubles en homogenatos del hepatopáncreas fue de: $0,16 \pm 0,03$ g/100 g carne. Para el cálculo se utilizó una curva de calibración con Seroalbúmina Bovina como patrón.

Determinación de la masa molecular mediante Electroforesis SDS-PAGE

La fracción proteica detectada en el extracto crudo del hepatopáncreas de mejillón mostró un rango de 6 a 100 kDa. Se observa en la calle 2 y 3 la presencia de una banda correspondiente a 24 kDa, que sería compatible con la masa molecular aparente de la tripsina (Figura 1).

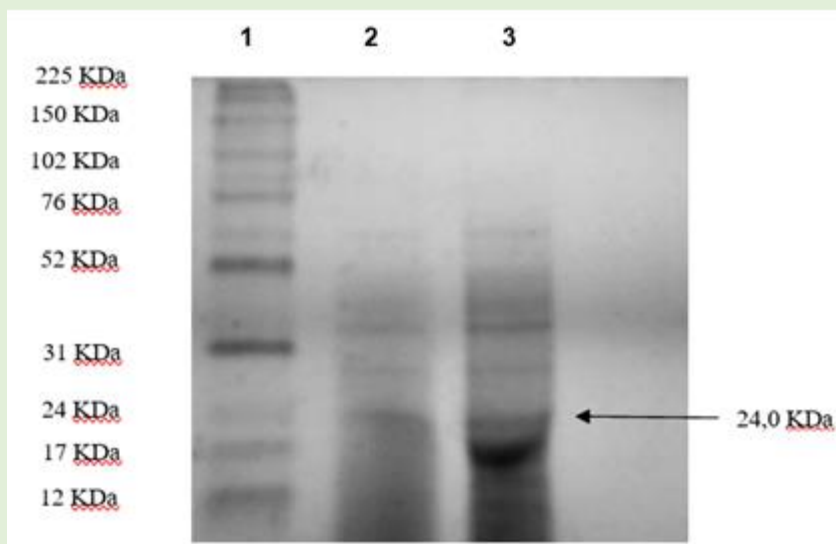


Figura 1: SDS-PAGE de hepatopáncreas de mejillón. Calle 1: Marcador de peso molecular Rainbow Marker (Full Range) (con proteínas de 12, 17, 24, 31, 52, 76, 102, 150 y 225 kDa). Calles 2 y 3: homogenato de hepatopáncreas de mejillón (5 y 10 ul de muestra respectivamente).

Figure 1: SDS-PAGE of mussel hepatopancreas. Lane 1: Rainbow Marker (Full Range) (with proteins of 12, 17, 24, 31, 52, 76, 102, 150 y 225 kDa). Lane 2 and 3: mussel hepatopancreas homogenate (5 and 10 ul respectively).

Determinación de actividad de proteasa alcalina

Se observó actividad de proteasa alcalina a las temperaturas ensayadas de 4, 37 y 60 °C utilizando BAPNA como sustrato para evidenciar tripsina, hasta los 60 minutos

de incubación, evidenciando una disminución de la actividad luego de los 30 minutos de incubación. La mayor actividad se observó a 60 °C y a los 20 minutos de incubación (Figura 2).

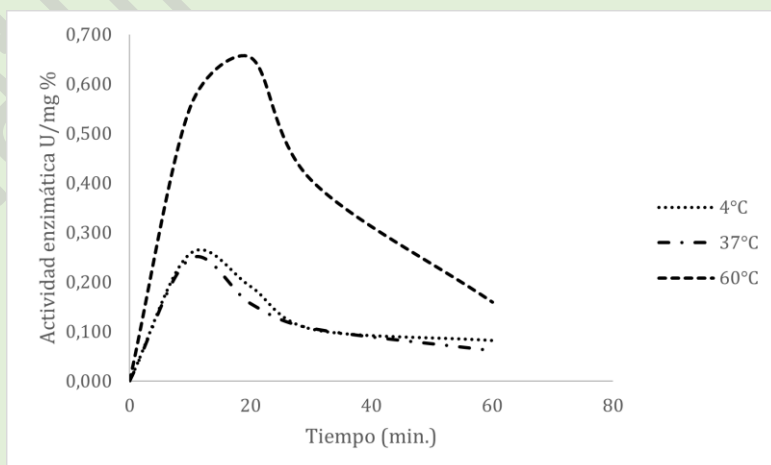


Figura 2: Actividad proteolítica (U/mg%) a diferentes temperaturas en función del tiempo de incubación.
Figure 2: Proteolytic activity (U/mg%) at different temperatures as a function of incubation time.

En la figura 3 se observa la actividad enzimática del hepatopáncreas de mejillón a 60 °C, a diferentes pH ensayados entre 4

y 11. La actividad es máxima a pH 9 y decae notoriamente a pH 10.

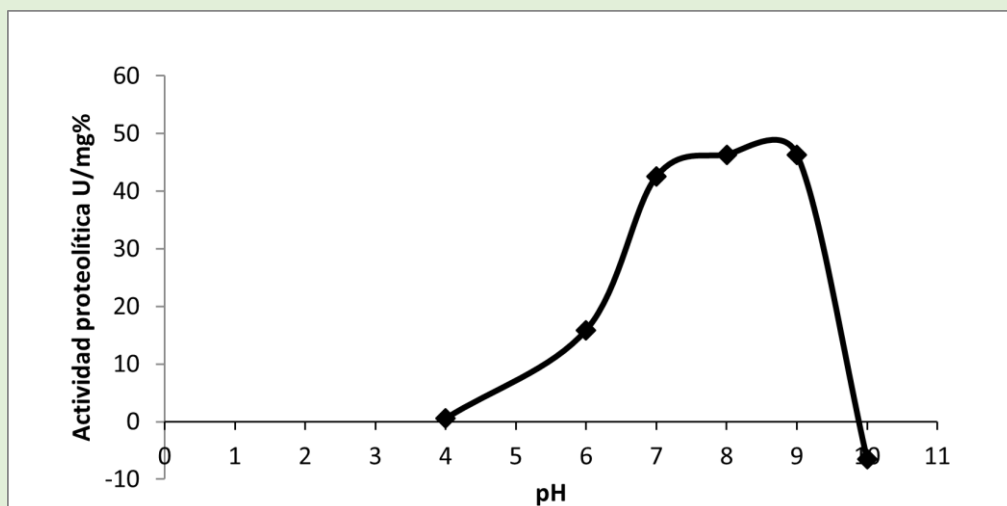


Figura 3: Efecto del pH sobre la Actividad proteolítica (U/mg%).

Figure 3: Effect of pH on proteolytic activity (U/mg%).

Determinación de Actividad proteásica mediante Zimografía

Luego de teñir el gel con azul de Coomassie se observó una zona clara, con degradación de sustrato, correspondiente a

la digestión con proteasa. Esta banda de digestión de gelatina en condiciones alcalinas (pH 9), coincide con masa molecular aparente de 24 kDa (Figura 4).

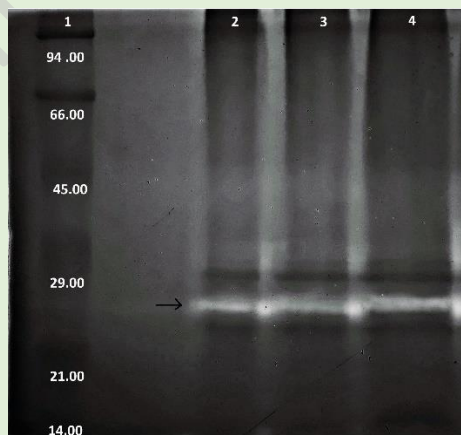


Figura 4: Zimografía de hepatopáncreas de mejillón a pH 9. Calle 1: Marcador de peso molecular (PB-L (Low Range) con proteínas de: 14.000 Da, 21.000 Da, 29.000 Da, 45.000 Da, 66.000 Da, y 94.000 Da. Calles 2, 3 y 4: homogenato de hepatopáncreas de mejillón.

Figure 4: Zymography of mussel hepatopancreas at pH 9. Lane 1: Molecular weight marker (PB-L (Low Range) with proteins of: 14,000 Da, 21,000 Da, 29,000 Da, 45,000 Da, 66,000 Da and 94,000 Da. Lanes 2, 3 and 4: mussel hepatopancreas homogenate.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran, en los homogenatos del hepatopáncreas de mejillón (*Mytilus edulis platensis*), la presencia de una proteína con actividad proteolítica en medio alcalino. Esta actividad fue evidenciada mediante el ensayo que utiliza BAPNA como sustrato para tripsina (Erlanger et al., 1961), así como en la zimografía, tratándose de una proteína de masa molecular aparente de 24 kDa determinada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La banda proteica obtenida se localiza dentro del rango (de 21 a 30 kDa) de otras tripsinas purificadas en especies marinas: 25,0 kDa la tripsina de anchoíta *Engraulis anchoita* (Lamas et al., 2017), 21,5 kDa la de lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Cai et al., 2011), 25,0 kDa la de sardina *Sardina pilchardus* (Simpson et al., 2000, Castro-Ceseña, 2012), 25,0 kDa la tripsina de merluza *Merluccius hubbsi* (Lamas et al., 2015), 24 kDa en vísceras de atún (*Katsuwonus pelamos*) (Klomklao et al., 2007) y 22,5 kDa la de chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al. 2017).

Se ha detectado que las proteasas digestivas alcalinas son altamente termorresistentes, pues soportan temperaturas desde 45 °C hasta 65 °C

(Essed et al., 2002). Las proteasas digestivas alcalinas de los crustáceos (*Lithodes santolla*) (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835) presentaron actividad óptima a 60 °C (Bañuelos-Vargas et al. 2018) y en el intestino de los peces chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al. 2017), sargo (*Archosargus probatocephalus*) (Merino-Contreras et al., 2018) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al., 2005) que muestran una temperatura óptima de 55 °C.

En consecuencia, la proteasa aislada del hepatopáncreas de mejillón presentó mayor actividad a 60 °C y pH 9, a los 20 minutos de incubación. Resultados similares se reportaron para especies como chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al. 2017), para la lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Cai et al., 2011) y para el pez sargo (*Archosargus probatocephalus*) (Merino-Contreras et al., 2018), entre otros, con un pH de máxima actividad entre 9 y 10.

Cabe destacar que los valores óptimos de temperatura y la estabilidad térmica de las actividades de las proteasas son solo parámetros operativos de las enzimas, y no corresponden a parámetros fisiológicos de las especies, sino a la afinidad de la

enzima con su sustrato a una determinada temperatura al alcanzar la máxima catálisis.

En la zimografía se evidencia la presencia de una banda clara, de digestión de la gelatina, correspondiente al peso molecular aparente de la tripsina, que coincidiría con la actividad de esta proteasa alcalina. Esta metodología, utilizada por varios autores, entre ellos Jesús -Ramírez (2017), Bañuelos-Vargas (2018) y Merino-Contreras (2018) nos permite determinar la actividad proteolítica en medio alcalino. De esta manera, con los datos obtenidos sobre la actividad a pH alcalino, podríamos confirmar la presencia de esta enzima en el hepatopáncreas de mejillón, su relevante termorresistencia y su potencial utilización en aplicaciones tecnológicas.

El mejillón *M. edulis platensis* es un molusco bivalvo con una amplia distribución en el Mar Argentino y dominante en muchos ambientes submareales someros. Además, la especie es de interés pesquero y para la acuicultura, las principales iniciativas de maricultura tienen como objeto esta especie. Las iniciativas de cultivo en el país son escasas y están limitadas a unas pocas localidades del litoral argentino como Camarones, C. Rivadavia y Ushuaia (Isola, 2019). Este trabajo aporta los

primeros datos la actividad proteolítica en esta especie y revela que las proteasas de la especie presentan rasgos de interés para su aplicación biotecnológica. Los mejillones son comercializados enteros, (hepatopáncreas incluido). Sin embargo, el cultivo del mejillón genera toneladas de subproducto en todo el mundo, considerándose el 27% de la cosecha como material de rechazo, lo cual ha conducido a la búsqueda de alternativas que permitan el aprovechamiento integral de la producción y contribuir positivamente a la economía circular (Naik et al. 2019, 2020).

Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran, en los homogenatos del hepatopáncreas de mejillón (*Mytilus edulis platensis*), la presencia de una proteasa con actividad proteolítica óptima a pH 9,0 y a 60 °C, evidenciada mediante zimografía, tratándose de una proteína de 24 kDa determinada por SDS-PAGE.

Bibliografía

Bañuelos-Vargas, I., Cárdenas-Chávez, F., Paschke, K., Román-Reyes, J., Salazar-Leyva, J. & Martínez-Montaña, E. 2018. Caracterización bioquímica parcial de proteasas digestivas presentes en los jugos gástricos de dos crustáceos chilenos, *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835). *Lat. A.m. J. Aquat.*

- Res., **46**: 289-300.
- Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Coelho, L.C.B. & Carvalho, L.B. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.*, **40**: 1829-1834.
- Blanco, M., Simpson, B.K., Perez-Martín, R.I. & Sotelo G.C. 2014. Isolation and partial and characterization of trypsin from pancreas of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J. Food Biochem.*, **38**: 196-206.
- Cai, Q.F., Jiang, Y.K., Zhou, L.G., Sun, L.C., Liu, G.M., Osatomi, K. & Cao, M.J. 2011. Biochemical characterization of trypsins from the hepatopáncreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Comp. Biochem. Fisiol.*, **159** (B): 183-189.
- Castillo-Yañez, F. J, Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. & Navarrete-Del Toro, M.A. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **140** (B): 91-98.
- Castro-Ceseña, A.B., Sánchez Saavedra, M.P. & Márquez Rocha F.J. 2012. Characterisation and parcial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry*, **135**: 583-589.
- Colombo, J., Crovetto, C., Varisco, M. & Risso, S. 2016. Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón (*Mytilus edulis*) provenientes de cultivos y bancos naturales en el Golfo San Jorge, Argentina. *Rev. biol. mar. oceanogr.* **51** (2): 12-19.
- Erlanger, B. F., Kokorsky, N. & Cohen, W. 1961. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **96**: 271-278.
- Essed, Z., Fernández, I., Alarcón, J.F. & Moyano, F.J. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **18** (1-4): 99-107.
- García-Carreño, F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103** (b): 575-578.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L. & Haard, N. 1993. Substrate-Gel Electrophoresis for composition and Molecular Weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, **214**: 65-69.
- Gates, B. J. & Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (*Penaeus setiferus*). *Biochemistry*, **8**: 4483-4489.
- Isola, T. E. 2019. Aspectos tecnológicos y bioecológicos del asentamiento de mejillón, *Mytilus edulis platensis*, sobre colectores artificiales. Tesis doctoral Universidad Nacional del Sur. 169 pp.
- Jesús-Ramirez, F., Álvarez-González, C.A., Nolasco-Soria, H.G., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Conway, K. & Pohlenz, C. 2017. Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiológica*, **27** (3): 419-427.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K. & Saeki H. 2006. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **144** (B): 47-56.
- Lamas, D., Yeannes, M.I. & Massa, A.E. 2017. Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita*: partial purification and characterization. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, **98** (2): 103-112.

- Lamas, D., Yeannes, M.I. & Massa, A.E. 2015. Partial purification of proteolytic enzymes and characterization of trypsin from *Merluccius hubbsi* by products. *International Journal of food and nutritional sciences*, **4** (5):121-130.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lockwoods, B., North, M., Scott, K., Bremner, A. & Coombs, G. 1987. The use of highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**: 89-95.
- Merino-Contreras, M.L., Sánchez-Morales, F., Jiménez-Badillo, M.L., Peña-Marín, E.S., & Alvarez-González, C.A. 2018. Partial characterization of digestive proteases in sheepshead, *Archosargus probatocephalus* (Spariformes: Sparidae). *Neotropical Ichthyology*, **16** (4): e180020: 1-11.
- Naik, A.S.; Hayes, M. 2019. Bioprocessing of mussel by-products for value added ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, **92**: 111–121.
- Naik, A. S., Mora, L., & Hayes, M. 2020. Characterisation of seasonal *Mytilus edulis* by-products and generation of bioactive hydrolysates. *Applied Sciences*, **10** (19): 6892.
- Schägger, H. & von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Simpson, B. K. 2000. Digestive Proteases from Marine Animals. En N.F. Haard y B.K Simpson (eds), *Seafood Enzymes*. 191- 213.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold. Nueva York. 317 p.