

## Anti-cancer, Anti-diabetic and Anti-inflammatory Activities of Methionine gamma-lyase Produced by *Streptomyces maritimus* Isolated from Soil

### Atividades Anticancerígena, Antidiabética e Anti-inflamatória da Metionina gama-liase Produzida por *Streptomyces maritimus* Isolada do Solo

Nada Zaki Mahdi <sup>1</sup> , Amina Mohammed Ali <sup>1</sup> , Suhair Sh. Al-Siraj <sup>1</sup> , Temilade Adekunle <sup>2</sup> ,  
Rebeca André <sup>2,3</sup> , Patricia Rijo <sup>2,3,4</sup> , Amr Hassan <sup>5</sup> , Eman M. Sharaf <sup>6</sup> , & Maha F. Lofty <sup>7</sup>

**Keywords:** Methionine gamma-lyase, Hep-2 cell-line, anti-cancer, anti-diabetic, anti-inflammatory

**Palavras-chave:** Metionina gama-liase; linha celular Hep-2; anticancerígeno; antidiabético; anti-inflamatório

#### Abstract

Cancer and diabetes are prevalent global disorders that affect large segments of the population and exert substantial burdens on national economies, quality of life, and morbidity and mortality indicators. In this study, the therapeutic potential of methionine gamma-lyase (MGL) was investigated as a candidate anticancer, antidiabetic, and anti-inflammatory agent. MGL was produced following the isolation of *Streptomyces maritimus* from soil, and both starch nitrate agar and a modified formulation were employed as differential and selective media to support biochemical identification of the bacterial isolates. Enzyme purification was achieved through sequential application of acetone precipitation, ammonium sulfate fractionation, gel filtration chromatography, and ion-exchange chromatography, yielding a substantially enriched protein as confirmed by SDS-PAGE analysis. The biological activities of MGL were assessed using an MTT cytotoxicity assay, an in vitro  $\alpha$ -amylase inhibitory assay, and an in vitro anti-inflammatory assay to determine its suitability as an effective and cost-efficient alternative to commonly used protocols. The findings demonstrated that only 14% of Hep-2 cells remained viable at the highest concentration of MGL extract, erythrocyte hemolysis inhibition reached 29% at the lowest concentration tested, and the enzyme exhibited an  $IC_{50}$  of  $78 \mu\text{g mL}^{-1}$  for  $\alpha$ -amylase inhibition, suggesting a promising capacity to attenuate postprandial blood glucose excursions in individuals with diabetes.

#### Resumo

O cancro e a diabetes são doenças globais prevalentes que afetam grandes segmentos da população e exercem encargos substanciais sobre as economias nacionais, a qualidade de vida e os indicadores de morbidade e mortalidade. Neste estudo, foi investigado o potencial terapêutico da metionina gama-liase (MGL) como candidata a agente anticancerígeno, antidiabético e anti-inflamatório. A MGL foi produzida após o isolamento de *Streptomyces maritimus* a partir do solo, tendo sido utilizados tanto o ágar nitrato de amido como uma formulação modificada como meios diferenciais e seletivos para apoiar a identificação bioquímica dos isolados bacterianos. A purificação da enzima foi alcançada através da aplicação sequencial de precipitação com acetona, fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca iónica, resultando numa proteína substancialmente enriquecida, conforme confirmado por análise SDS-PAGE. As atividades biológicas da MGL foram avaliadas através do ensaio de citotoxicidade MTT, de um ensaio in vitro de inibição da  $\alpha$ -amilase e de um ensaio in vitro anti-inflamatório, com o objetivo de determinar a sua adequação como alternativa eficaz e economicamente viável aos protocolos habitualmente utilizados. Os resultados demonstraram que apenas 14% das células Hep-2 permaneceram viáveis na concentração mais elevada do extrato de MGL, a inibição da hemólise eritrocitária atingiu 29% na menor concentração testada, e a enzima apresentou um  $IC_{50}$  de  $78 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a inibição da  $\alpha$ -amilase, sugerindo uma capacidade promissora para atenuar as excursões glicémicas pós-prandiais em indivíduos com diabetes.

#### To Cite:

Mahdi, N. Z. (2026) Anti-cancer, Anti-diabetic and Anti-inflammatory Activities of Methionine gamma-lyase Produced by *Streptomyces maritimus* Isolated from Soil. *BBR - Pharmacology & Technology*, 23, 374, 1-24.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.pht.23.374>

1 - Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad 10052, Iraq

2 - CBIOS - Lusófona University's Research Center for Biosciences and Health Technologies, 1749-024 Lisbon, Portugal

3 - Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

4 - Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisbon, Portugal

5 - Department of Bioinformatics, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRI), University of Sadat City, Sadat 32897, Egypt

6 - Department of Bacteriology, Immunology, and Mycology, Animal Health Research Institute (ARC), Shebin El Kom 32511, Egypt

7 - Department of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo 11241, Egypt

Correspondence to / Correspondência a: smnk@uomustansiriyah.edu.iq

Received / Recebido: 16/10/2025

Accepted / Aceite: 29/01/2026

Journal correspondence / Correspondência dos jornais: bbr@alies.pt

## Introduction

Cancer and diabetes are among the most pervasive global health challenges, together accounting for immense morbidity and mortality. In 2022, an estimated 20 million new cancer cases were diagnosed worldwide, with 9.7 million related deaths, while diabetes afflicts over 537 million adults globally, with projections indicating continued growth in disease burden. Chronic inflammation not only accompanies these diseases but also constitutes a major pathogenic driver linking metabolic dysregulation, immune imbalance, and oncogenic transformation, thereby exacerbating disease progression and therapeutic resistance (1-3).

Chronic low-grade inflammation represents a unifying biological mechanism linking cancer, diabetes, and metabolic disorders. In diabetes, persistent inflammatory signaling driven by cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and CRP contributes to insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction, while in cancer, similar inflammatory mediators promote genomic instability, angiogenesis, and tumor immune evasion. Metabolic reprogramming and chronic inflammation reinforce one another through oxidative stress, altered amino acid metabolism, and dysregulated immune responses, creating a permissive environment for both oncogenesis and metabolic disease progression. Increasing evidence indicates that targeting metabolic-inflammatory crosstalk can yield therapeutic benefits across these conditions, supporting the investigation of metabolic enzymes with immunomodulatory potential as multi-disease intervention strategies (4,5).

One emerging therapeutic strategy is the use of enzymes to selectively target metabolic vulnerabilities in diseased cells. Enzyme-based therapies have gained increasing attention due to their specificity and ability to modulate key biochemical pathways, as exemplified by clinically approved amino acid-depleting enzymes. Tumor cells frequently exhibit auxotrophies for essential amino acids, creating exploitable metabolic dependencies. In particular, methionine dependence is a hallmark of many malignancies, rendering them susceptible to enzymatic methionine depletion approaches (6,7).

## Introdução

O cancro e a diabetes estão entre os desafios de saúde global mais generalizados, sendo conjuntamente responsáveis por uma enorme morbidade e mortalidade. Em 2022, estimou-se que foram diagnosticados cerca de 20 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo, com 9,7 milhões de mortes associadas, enquanto a diabetes afeta mais de 537 milhões de adultos globalmente, com projeções que indicam um crescimento contínuo da carga da doença. A inflamação crónica não só acompanha estas patologias, como também constitui um importante fator patogénico que liga a desregulação metabólica, o desequilíbrio imunitário e a transformação oncogénica, agravando assim a progressão da doença e a resistência terapêutica (1-3).

A inflamação crónica de baixo grau representa um mecanismo biológico unificador que liga o cancro, a diabetes e as perturbações metabólicas. Na diabetes, a sinalização inflamatória persistente, mediada por citocinas como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a CRP, contribui para a resistência à insulina e para a disfunção das células  $\beta$ , enquanto no cancro mediadores inflamatórios semelhantes promovem a instabilidade genómica, a angiogénese e a evasão imunitária tumoral. A reprogramação metabólica e a inflamação crónica reforçam-se mutuamente através do stress oxidativo, da alteração do metabolismo dos aminoácidos e de respostas imunitárias desreguladas, criando um ambiente permissivo tanto para a oncogénese como para a progressão das doenças metabólicas. Evidências crescentes indicam que o direcionamento da interligação metabólico-inflamatória pode proporcionar benefícios terapêuticos nestas condições, apoiando a investigação de enzimas metabólicas com potencial imunomodulador como estratégias de intervenção multidoença (4,5).

Uma estratégia terapêutica emergente consiste na utilização de enzimas para direcionar seletivamente vulnerabilidades metabólicas em células doentes. As terapias enzimáticas têm recebido atenção crescente devido à sua especificidade e capacidade de modular vias bioquímicas essenciais, como exemplificado por enzimas de depleção de aminoácidos aprovadas clinicamente. As células tumorais exibem frequentemente auxotrofia para aminoácidos essenciais, criando dependências metabólicas exploráveis. Em particular, a dependência de metionina é uma característica marcante de muitas neoplasias, tornando-as suscetíveis a abordagens enzimáticas de depleção de metionina (6,7).

Methionine  $\gamma$ -lyase (MGL), also known as methioninase, catalyzes the  $\gamma$ -elimination of L-methionine to generate methanethiol, ammonia, and  $\alpha$ -ketobutyrate, thereby reducing extracellular methionine availability. Cancer cells display a pronounced "methionine addiction," characterized by impaired proliferation and cell-cycle arrest under methionine restriction, while normal cells maintain adaptive metabolic flexibility. Recombinant and microbial MGLs have demonstrated potent antiproliferative activity across diverse cancer models, enhancing chemosensitivity and impairing tumor growth *in vitro* and *in vivo* (8,9).

Beyond oncology, methionine metabolism plays a critical role in systemic metabolic regulation and inflammatory signaling. Experimental methionine restriction has been shown to improve insulin sensitivity, reduce adiposity, and modulate glucose homeostasis through hormonal and mitochondrial adaptations. These metabolic shifts are accompanied by attenuation of chronic inflammation and oxidative stress, which are central to the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. Consequently, enzymatic methionine depletion via MGL represents a plausible strategy to mimic the beneficial effects of dietary methionine restriction in metabolic and inflammatory disorders (10,11).

Actinomycetes, particularly members of the genus *Streptomyces*, are prolific producers of bioactive enzymes and secondary metabolites with pharmaceutical relevance. Although many *Streptomyces* species are traditionally associated with terrestrial soils, marine-associated and halotolerant taxa exhibit remarkable ecological plasticity, allowing survival in saline, arid, and mineral-rich environments. *Streptomyces maritimus*, originally described as a marine-associated species, has demonstrated adaptability to non-marine habitats, supporting its isolation from inland saline soils. This ecological versatility underscores its potential as a source of functionally robust enzymes with biomedical applications (12,13).

Based on these considerations, the present study investigates the biological activities of MGL produced by *Streptomyces maritimus* isolated from saline soils, focusing on its anticancer, antidiabetic, and anti-inflammatory potential. By integrating enzymatic

A metionina  $\gamma$ -liase (MGL), também conhecida como metioninase, catalisa a  $\gamma$ -eliminação da L-metionina para gerar metanotiol, amônia e  $\alpha$ -cetobutirato, reduzindo assim a disponibilidade extracelular de metionina. As células cancerígenas apresentam uma acentuada "adição à metionina", caracterizada por proliferação comprometida e paragem do ciclo celular sob restrição de metionina, enquanto as células normais mantêm uma flexibilidade metabólica adaptativa. MGLs recombinantes e microbianas demonstraram potente atividade antiproliferativa em diversos modelos de cancro, aumentando a quimiossensibilidade e inibindo o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (8,9).

Para além da oncologia, o metabolismo da metionina desempenha um papel crucial na regulação metabólica sistémica e na sinalização inflamatória. Demonstrou-se que a restrição experimental de metionina melhora a sensibilidade à insulina, reduz a adiposidade e modula a homeostase da glicose através de adaptações hormonais e mitocondriais. Estas alterações metabólicas são acompanhadas pela atenuação da inflamação crónica e do stress oxidativo, que são centrais na patogénese da diabetes tipo 2 e das suas complicações. Consequentemente, a depleção enzimática de metionina através da MGL representa uma estratégia plausível para mimetizar os efeitos benéficos da restrição dietética de metionina em perturbações metabólicas e inflamatórias (10,11).

Os actinomicetos, particularmente os membros do género *Streptomyces*, são produtores prolíficos de enzimas bioativas e metabolitos secundários com relevância farmacêutica. Embora muitas espécies de *Streptomyces* estejam tradicionalmente associadas a solos terrestres, táxones marinhos e halotolerantes exibem uma notável plasticidade ecológica, permitindo a sobrevivência em ambientes salinos, áridos e ricos em minerais. *Streptomyces maritimus*, originalmente descrita como uma espécie associada ao ambiente marinho, demonstrou adaptabilidade a habitats não marinhos, sustentando o seu isolamento a partir de solos salinos interiores. Esta versatilidade ecológica reforça o seu potencial como fonte de enzimas funcionalmente robustas com aplicações biomédicas (12,13).

Com base nestas considerações, o presente estudo investiga as atividades biológicas da MGL produzida por *Streptomyces maritimus* isolada de solos salinos, com enfoque no seu potencial anticancerígeno, antidiabético e anti-inflamatório. Ao integrar ensaios de atividade enzimática com modelos biológicos

activity assays with disease-relevant biological models, this work aims to expand the functional scope of microbial MGL beyond oncology and provide mechanistic insight into its relevance for metabolic and inflammatory disorders.

## Materials and Methods

### *Streptomyces maritimus* strains isolation from soil

Fifty soil samples were collected between 18 June and 22 March from terrestrial arid and semi-arid saline soils of western Iraq, including the margins of Razzaza and Habbaniyah lakes (Figure 1). Sampling locations were selected based on saline and mineral-rich soil characteristics, which are considered favorable environments for isolating halotolerant *Streptomyces* species. Samples were collected using sterile stainless-steel soil augers at depths of 5–15 cm after removal of surface debris.

Each sample was placed in sterile, labeled zipper bags indicating the collection site and sample number, transported to the laboratory, and stored at 4 °C for no longer than 48 h prior to processing. In the laboratory, 1.0 g of each soil sample was suspended in 100 mL sterile physiological saline, shaken at 200 rpm for 30 min at 28 °C in an orbital incubator, and allowed to settle.

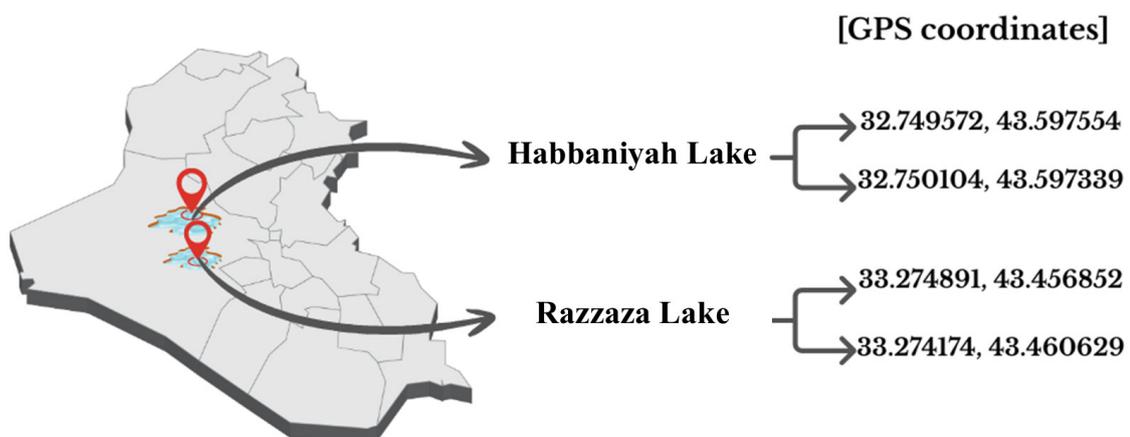
relevantes para estas doenças, este trabalho visa expandir o âmbito funcional da MGL microbiana para além da oncologia e fornecer uma perspetiva mecanística sobre a sua relevância em perturbações metabólicas e inflamatórias.

## Materiais e Métodos

### *Isolamento de estirpes de Streptomyces maritimus a partir do solo*

Foram recolhidas cinquenta amostras de solo entre 18 de junho e 22 de março, provenientes de solos salinos terrestres áridos e semiáridos do oeste do Iraque, incluindo as margens dos lagos Razzaza e Habbaniyah (Figura 1). Os locais de amostragem foram selecionados com base nas características salinas e ricas em minerais do solo, consideradas ambientes favoráveis para o isolamento de espécies halotolerantes de *Streptomyces*. As amostras foram recolhidas utilizando trados de solo de aço inoxidável esterilizados, a uma profundidade de 5–15 cm, após remoção de detritos superficiais.

Cada amostra foi colocada em sacos estéreis com fecho hermético, devidamente rotulados com o local de recolha e o número da amostra, transportada para o laboratório e armazenada a 4 °C por um período não superior a 48 h antes do processamento. No laboratório, 1,0 g de cada amostra de solo foi suspenso em 100 mL de solução salina fisiológica estéril, agitada a 200 rpm durante 30 min a 28 °C num incubador orbital, e deixada em repouso para sedimentação.



**Figure 1** - Map of western Iraq showing soil sampling sites for the isolation of *Streptomyces* spp., with corresponding GPS coordinates.

**Figura 1** - Mapa do oeste do Iraque mostrando os locais de amostragem de solo para o isolamento de *Streptomyces* spp., com as correspondentes coordenadas GPS.

Serial dilutions up to  $10^{-4}$  were prepared in sterile saline, and 0.1 mL aliquots were plated onto starch casein agar, *Streptomyces* agar, and actinomycete isolation agar (HiMedia, Mumbai, India), each supplemented with 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amphotericin B. Plates were incubated at 28 °C and examined after 48, 72, and 96 h. *Streptomyces*-like colonies were purified by repeated streaking and cryopreserved at  $-80$  °C in 50% (v/v) glycerol. Putative *Streptomyces maritimus* isolates were subsequently identified using phenotypic and biochemical analyses (14).

#### *Biochemical identification of Streptomyces maritimus strains*

Glycerol stock cultures were inoculated onto starch-nitrate agar plates and incubated at 28°C for 7 days, yielding pure *Streptomyces maritimus* colonies that were maintained at 4°C on slants. Isolates were screened for L-methionine catabolism as the sole nitrogen source using modified starch agar. Isolates were streaked onto phenol red-supplemented (0.07% w/v) modified starch agar (pH 7.0). Pink coloration of colonies or surrounding media, indicative of ammonia liberation via MGL-L-methionine interaction according to Williams and Hariharan, confirmed MGL production (15).

#### *Production of MGL enzyme from Streptomyces maritimus strains*

The adapted Esaki and Soda method was employed to evaluate the bacterial strain's capacity to synthesize MGL (16). The production medium consisted of 0.1% polypeptone, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25% L-methionine, 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% glycerol, and 0.02% yeast extract. A 100 ml Erlenmeyer flask containing 25 ml medium was inoculated with a loopful of bacterial culture and incubated at 37°C, 120 rpm for 3 days. Cells were pelleted by centrifugation ( $5000 \times g$ , 10 min), washed with 10 mM sterile phosphate buffer, and crude cellular protein extracted per Manukhov's method (17).

Bacterial cells (0.5 g) were resuspended in 5 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) supplemented with 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and subjected to ultrasonication for 4 min under cooling. The lysate was vortexed for 15 min and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min at 4°C to remove cell debris.

Foram preparadas diluições seriadas até  $10^{-4}$  em solução salina estéril, e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em ágar caseína-amido, ágar *Streptomyces* e ágar de isolamento de actinomicetos (HiMedia, Mumbai, Índia), cada um suplementado com 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B. As placas foram incubadas a 28 °C e examinadas após 48, 72 e 96 h. Colônias com morfologia semelhante a *Streptomyces* foram purificadas por repicagens sucessivas e criopreservadas a  $-80$  °C em glicerol a 50% (v/v). Os isolados presumíveis de *Streptomyces maritimus* foram posteriormente identificados através de análises fenotípicas e bioquímicas (14).

#### *Identificação bioquímica de estirpes de Streptomyces maritimus*

Culturas *stock* de glicerol foram inoculadas em placas de ágar amido-nitrato e incubadas a 28 °C durante 7 dias, originando colônias puras de *Streptomyces maritimus*, que foram mantidas a 4 °C em tubos inclinados. Os isolados foram rastreados quanto ao catabolismo da L-metionina como única fonte de azoto, utilizando ágar amido modificado. Os isolados foram estriados em ágar amido modificado suplementado com vermelho de fenol (0,07% p/v) (pH 7,0). A coloração rosa das colônias ou do meio circundante, indicativa da libertação de amônia através da interação entre a MGL e a L-metionina, de acordo com Williams e Hariharan, confirmou a produção de MGL (15).

#### *Produção da enzima MGL a partir de estirpes de Streptomyces maritimus*

O método adaptado de Esaki e Soda foi utilizado para avaliar a capacidade da estirpe bacteriana em sintetizar MGL (16). O meio de cultura consistiu em 0,1% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25% de L-metionina, 0,1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,01% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de glicerol e 0,02% de extrato de levedura. Um frasco de Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio foi inoculado com uma ansa de cultura bacteriana e incubado a 37 °C, a 120 rpm, durante 3 dias. As células foram sedimentadas por centrifugação ( $5000 \times g$ , 10 min), lavadas com tampão fosfato estéril 10 mM, e a proteína celular bruta foi extraída de acordo com o método de Manukhov (17).

As células bacterianas (0,5 g) foram ressuspensas em 5 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,8), suplementado com 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), e submetidas a ultrassonicação durante 4 min sob arrefecimento. O lisado foi misturado num vortex durante 15 min e centrifugado a  $10\,000 \times g$  durante 10 min a 4 °C para remover os detritos celulares.

The resulting supernatant, representing crude intracellular MGL, was analyzed for enzymatic activity and protein content.

### **Purification of MGL enzyme**

#### *Pre-treatment of enzyme extract by acetone*

The crude enzyme extract was precipitated with acetone at 4°C (30–60% v/v) to yield purified MGL. The extract was incrementally combined with acetone (precooled to -20°C) to reach 30% (v/v), incubated overnight at 4°C, and centrifuged (12,100 × g, 15 min, 4°C) to recover the precipitate. Acetone concentration was then elevated to 40% (v/v). Post-centrifugation, the supernatant was further precipitated with acetone at 50% and 60% (v/v) as described. Precipitates were resuspended in 0.2 M citrate buffer (pH 6.0, adjusted with KOH). Uncapped tubes were held at 4°C for 4 h to facilitate acetone evaporation (18,19).

#### *Precipitation of enzyme using ammonium sulphate*

The enzyme extract underwent four ammonium sulfate fractionation steps (0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80% w/v saturation). Crude MGL was initially brought to 20% (w/v) saturation, incubated overnight at 4°C, and centrifuged (12,100 × g, 15 min, 4°C) to remove precipitate. Saturation was incrementally raised to 40%, 60%, and 80% (w/v), with precipitates collected similarly after each step. Solid ammonium sulfate was added gradually, with stirring, to achieve precise saturations. Precipitates were redissolved in 0.2 M citrate buffer (pH 6.0, KOH-adjusted) and dialyzed against 10-fold diluted buffer for 24 h at 4°C (20).

#### *Purification using DEAE-Sepharose followed by Sephadex G100*

A DEAE-cellulose column (3.8 × 30 cm) was equilibrated with 0.002 M Tris-HCl (pH 8.0). Protein (132 mg) from citrate buffer solubilized enzyme, fractionated by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, was loaded in 42 ml starting buffer. After collecting 50 10-ml fractions, elution proceeded with a gradient of 0.2 M NaCl in 0.002 M Tris-HCl (pH 8.0). Fractions were monitored at A<sub>280</sub> nm; conductivity was assessed every fifth

O sobrenadante resultante, representando a MGL intracelular bruta, foi analisado quanto à atividade enzimática e ao teor proteico.

### **Purificação da enzima MGL**

#### *Pré-tratamento do extrato enzimático com acetona*

O extrato enzimático bruto foi submetido a precipitação com acetona a 4 °C (30–60% v/v) para obtenção de MGL purificada. O extrato foi combinado incrementalmente com acetona previamente arrefecida a -20 °C até atingir 30% (v/v), incubado durante a noite a 4 °C e centrifugado (12 100 × g, 15 min, 4 °C) para recuperar o precipitado. A concentração de acetona foi posteriormente aumentada para 40% (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido a precipitação adicional com acetona a 50% e 60% (v/v), conforme descrito. Os precipitados foram ressuspensos em tampão citrato 0,2 M (pH 6,0, ajustado com KOH). Os tubos destapados foram mantidos a 4 °C durante 4 h para facilitar a evaporação da acetona (18,19).

#### *Precipitação da enzima utilizando sulfato de amônio*

O extrato enzimático foi submetido a quatro etapas de fracionamento com sulfato de amônio (0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80% de saturação p/v). A MGL bruta foi inicialmente ajustada para 20% (p/v) de saturação, incubada durante a noite a 4 °C e centrifugada (12 100 × g, 15 min, 4 °C) para remover o precipitado. A saturação foi aumentada incrementalmente para 40%, 60% e 80% (p/v), sendo os precipitados recolhidos de forma semelhante após cada etapa. O sulfato de amônio sólido foi adicionado gradualmente sob agitação para alcançar saturações precisas. Os precipitados foram redissolvidos em tampão citrato 0,2 M (pH 6,0, ajustado com KOH) e dialisados contra tampão diluído 10 vezes durante 24 h a 4 °C (20).

#### *Purificação utilizando DEAE-Sepharose seguida de Sephadex G100*

Uma coluna de DEAE-celulose (3,8 × 30 cm) foi equilibrada com Tris-HCl 0,002 M (pH 8,0). A proteína (132 mg) proveniente da enzima solubilizada em tampão citrato e fracionada com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi aplicada em 42 mL de tampão inicial. Após a recolha de 50 frações de 10 mL, a eluição prosseguiu com um gradiente de 0,2 M de NaCl em Tris-HCl 0,002 M (pH 8,0). As frações foram monitorizadas a A<sub>280</sub> nm; a condutividade foi avaliada a cada cinco tubos, com um caudal de 2 mL/min. A purificação adicional foi

tube at a flow rate of 2 ml/min. Further purification employed Sephadex G-100 gel filtration (2.5 × 40 cm) for size-based separation (21).

#### *Protein purity assessment via SDS-PAGE*

The purity and apparent molecular mass of the purified methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) were evaluated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions. Protein samples obtained after the final purification step were mixed with Laemmli sample buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol and heated at 95 °C for 5 min to ensure complete denaturation. Samples were then loaded onto a 12% polyacrylamide resolving gel with a 5% stacking gel, alongside a pre-stained protein molecular weight marker. Electrophoresis was performed at a constant voltage until the tracking dye reached the bottom of the gel. Following separation, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained to visualize protein bands. The electrophoretic profile was used to assess the degree of purity of the MGL preparation based on the presence of a dominant protein band corresponding to the expected molecular mass (22).

#### **Biochemical characterization of MGL enzyme**

##### *Evaluation of enzyme activity and stability across pH levels*

The effect of pH on methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) activity and stability was assessed over an experimental pH range of 4.0 to 10.5 using appropriate buffer systems. Enzyme activity was measured in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0–5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0–7.5), 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0–9.0), and 50 mM glycine–NaOH buffer (pH 9.5–10.5). Purified enzyme samples were incubated in each buffer at a constant temperature for a fixed period prior to initiating the standard activity assay. For pH stability determination, the enzyme was pre-incubated in the respective buffers for a defined time, after which residual activity was measured under optimal assay conditions and expressed as a percentage of the maximum activity. This buffer-based approach is routinely applied to define pH-optimal values and stability profiles of microbial enzymes, including sulfur-metabolizing lyases (23).

realizada por filtração em gel Sephadex G-100 (2,5 × 40 cm), para separação com base no tamanho molecular (21).

#### *Avaliação da pureza proteica por SDS-PAGE*

A pureza e a massa molecular aparente da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) purificada foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes. As amostras proteicas obtidas após a etapa final de purificação foram misturadas com tampão de amostra de Laemmli contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, e aquecidas a 95 °C durante 5 min, de modo a assegurar a desnaturação completa. As amostras foram então carregadas num gel de resolução de poliacrilamida a 12%, com um gel de empilhamento a 5%, juntamente com um marcador de peso molecular proteico pré-corado. A eletroforese foi realizada a voltagem constante até que o corante de migração atingisse a base do gel. Após a separação, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados para visualização das bandas proteicas. O perfil eletroforético foi utilizado para avaliar o grau de pureza da preparação de MGL, com base na presença de uma banda proteica dominante correspondente à massa molecular esperada (22).

#### **Caracterização bioquímica da enzima MGL**

##### *Avaliação da atividade e estabilidade enzimática em diferentes níveis de pH*

O efeito do pH na atividade e estabilidade da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) foi avaliado num intervalo experimental de pH entre 4,0 e 10,5, utilizando sistemas tampão apropriados. A atividade enzimática foi medida em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,0–5,5), tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0–7,5), tampão Tris–HCl 50 mM (pH 8,0–9,0) e tampão glicina–NaOH 50 mM (pH 9,5–10,5).

Amostras de enzima purificada foram incubadas em cada tampão a uma temperatura constante durante um período fixo, antes de se iniciar o ensaio padrão de atividade. Para a determinação da estabilidade ao pH, a enzima foi pré-incubada nos respetivos tampões durante um tempo definido, após o qual a atividade residual foi medida sob condições ótimas de ensaio e expressa como percentagem da atividade máxima. Esta abordagem baseada em tampões é regularmente aplicada para definir o valor ótimo de pH e os perfis de estabilidade de enzimas microbianas, incluindo liases envolvidas no metabolismo do enxofre (23).

### *Assessment of temperature-dependent enzyme activity and stability*

The temperature dependence of MGL activity and stability was determined by measuring enzyme catalytic performance at a series of defined temperatures ranging from 30 °C to 80 °C. For the activity profile, aliquots of purified MGL were equilibrated at each temperature for 10 min, and residual activity was then measured using the standard assay protocol under optimal pH conditions. For thermal stability assessment, enzyme samples were pre-incubated at each test temperature for 30 min prior to initiating the activity assay, and the remaining activity was expressed as a percentage relative to the activity at the temperature optimum. These procedures follow established temperature profiling methods for microbial enzymes to define both the catalytic optimum and the thermal resilience of the enzyme (24).

### *Metal ion-mediated modulation of enzyme activity*

The influence of selected metal ions and chemical reagents on MGL activity was assessed by pre-incubating purified enzyme with individual effectors at defined concentrations prior to activity measurement. Metal ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) were tested as their chloride salts at 10 mM final concentration, while chemical reagents (EDTA, sodium dodecyl sulfate, ethanol, sodium azide) were each tested at 1 mM (or 10% v/v for ethanol) in the assay mixture. Briefly, enzyme samples were incubated with each ion or reagent at room temperature for 15 min before initiating the standard activity assay, and residual activity was expressed as a percentage of the control assay without added effectors. This approach follows established protocols for characterizing effector influences on enzyme catalysis and structural stability, enabling identification of ions or chemicals that enhance, inhibit, or have negligible effects on the catalytic function (25).

### **Evaluation of biological activities of MGL enzyme**

#### *Anti-cancer activity using MTT assay*

For the MTT cytotoxicity assay, Hep-2 cells were seeded at a density of  $4 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> in 96-well culture plates, with 100 µL of cell suspension added

### *Avaliação da atividade e estabilidade enzimática dependente da temperatura*

A dependência da atividade e estabilidade da MGL em função da temperatura foi determinada através da medição do desempenho catalítico da enzima numa série de temperaturas definidas, variando entre 30 °C e 80 °C. Para o perfil de atividade, alíquotas de MGL purificada foram equilibradas a cada temperatura durante 10 min, e a atividade residual foi posteriormente medida utilizando o protocolo padrão de ensaio sob condições ótimas de pH. Para a avaliação da estabilidade térmica, as amostras enzimáticas foram pré-incubadas a cada temperatura de teste durante 30 min antes do início do ensaio de atividade, sendo a atividade remanescente expressa como porcentagem relativa à atividade na temperatura ótima. Estes procedimentos seguem métodos estabelecidos de determinação do perfil térmico de enzimas microbianas, permitindo definir tanto o ótimo catalítico como a resistência térmica da enzima (24).

### *Modulação da atividade enzimática mediada por íons metálicos*

A influência de íons metálicos selecionados e de reagentes químicos na atividade da MGL foi avaliada através da pré-incubação da enzima purificada com efetores individuais, em concentrações definidas, antes da medição da atividade. Os íons metálicos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) foram testados sob a forma dos respectivos sais de cloreto, numa concentração final de 10 mM, enquanto os reagentes químicos (EDTA, dodecil sulfato de sódio, etanol, azida de sódio) foram avaliados a 1 mM (ou 10% v/v no caso do etanol) na mistura de ensaio. De forma resumida, as amostras enzimáticas foram incubadas com cada íon ou reagente à temperatura ambiente durante 15 min antes do início do ensaio padrão de atividade, e a atividade residual foi expressa como porcentagem relativamente a um ensaio controle sem adição de efetores. Esta abordagem segue protocolos estabelecidos para caracterizar a influência de efetores na catálise enzimática e na estabilidade estrutural, permitindo identificar íons ou substâncias químicas que potenciam, inibem ou exercem efeitos negligenciáveis sobre a função catalítica (25).

### **Avaliação das atividades biológicas da enzima MGL**

#### *Atividade anticancerígena utilizando o ensaio MTT*

Para o ensaio de citotoxicidade MTT, células Hep-2 foram semeadas a uma densidade de  $4 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> em placas de cultura de 96 poços, sendo

per well. Hep-2 cells were selected due to their epithelial tumor origin, robust metabolic activity, and established suitability as an *in vitro* model for screening cytotoxic and antiproliferative effects of bioactive compounds, including microbial enzymes. Cells were incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> to allow cell attachment. The culture medium was then replaced with 100 µL of MGL extract at final concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 µg mL<sup>-1</sup>, while control wells received only culture medium.

After exposure for 24, 48, 72, and 96 h, the treatment solutions were removed, and the wells were replenished with 100 µL of fresh growth medium, followed by the addition of MTT solution [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to achieve a final concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. Plates were incubated at 37 °C in the dark for 4 h to allow formazan crystal formation. Subsequently, the MTT-containing medium was removed, and 12.5 µL of glycine buffer was added to stabilize the reaction environment, followed by 100 µL of DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) to solubilize the formazan crystals. Absorbance was measured at 560 nm with background subtraction at 620 nm using a UV-visible spectrophotometer (LKB Pharmacia, Bromma, Sweden).

In parallel, morphological changes in Hep-2 cells were examined at the same exposure time points using an inverted phase-contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at ×200 magnification, and representative micrographs were captured to document treatment-induced alterations such as cell rounding, shrinkage, loss of adherence, and membrane integrity compared with untreated controls.

All experiments were performed in triplicate, and data are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. Cell viability was expressed as a percentage relative to untreated control cells (26).

#### *In-vitro anti-inflammatory assay*

Hypotonic solutions of the extracts (100, 200, 400, 600, 800, and 1000 µg mL<sup>-1</sup>) were prepared in duplicate in 5 mL centrifuge tubes, while isotonic solutions containing the same extract concentrations (3.9–1000 µg mL<sup>-1</sup>) were prepared similarly. Control

adicionados 100 µL de suspensão celular por poço. As células Hep-2 foram selecionadas devido à sua origem tumoral epitelial, elevada atividade metabólica e adequação estabelecida como modelo *in vitro* para rastreamento de efeitos citotóxicos e antiproliferativos de compostos bioativos, incluindo enzimas microbianas. As células foram incubadas durante 24 h a 37 °C, numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir a adesão celular. O meio de cultura foi então substituído por 100 µL de extrato de MGL em concentrações finais de 31,25; 62,5; 125; 250; 500; e 1000 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto os poços controle receberam apenas meio de cultura.

Após exposição durante 24, 48, 72 e 96 h, as soluções de tratamento foram removidas e os poços foram reabastecidos com 100 µL de meio de crescimento fresco, seguido da adição de solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], de modo a atingir uma concentração final de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 37 °C, no escuro, durante 4 h, permitindo a formação de cristais de formazano. Subsequentemente, o meio contendo MTT foi removido e foram adicionados 12,5 µL de tampão glicina para estabilizar o ambiente reacional, seguido de 100 µL de DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) para solubilizar os cristais de formazano. A absorbância foi medida a 560 nm, com subtração do fundo a 620 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-visível (LKB Pharmacia, Bromma, Suécia).

Em paralelo, alterações morfológicas nas células Hep-2 foram examinadas nos mesmos tempos de exposição utilizando um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão), com ampliação de ×200, e foram capturadas micrografias representativas para documentar alterações induzidas pelo tratamento, tais como arredondamento celular, retração, perda de adesão e integridade da membrana, em comparação com os controles não tratados.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os dados são apresentados como média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi efetuada utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste pós-hoc de Tukey, considerando-se  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. A viabilidade celular foi expressa como percentagem relativamente às células controle não tratadas (26).

#### *Ensaio anti-inflamatório in vitro*

Foram preparadas, em duplicado, soluções hipotônicas dos extratos (100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>) em tubos de centrifugação de 5 mL, enquanto soluções isotônicas contendo as mesmas concentrações de extrato (3,9–1000 µg mL<sup>-1</sup>) foram preparadas de forma

tubes contained 5 mL of vehicle (distilled water) and indomethacin (3.9–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  final concentration). Erythrocyte suspension (0.1 mL) was added to each tube with gentle mixing, followed by incubation at 37 °C for 1 h and centrifugation at 1300  $\times$  g for 3 min. The hemoglobin content of the supernatants was determined spectrophotometrically at 540 nm (Spectronic, Milton Roy).

The erythrocyte membrane stabilization assay was employed as an *in vitro* screening method to evaluate membrane-protective activity, which is considered to be associated with anti-inflammatory potential through the stabilization of cellular and lysosomal membranes. Hemolysis inhibition was expressed as a percentage relative to complete (100%) hemolysis induced by distilled water (27). The percentage inhibition of hemolysis was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Hemolysis Inhibition} = \frac{\text{OD2} - \text{OD1}}{\text{OD3} - \text{OD1}} \times 100$$

where **OD1** represents test sample absorbance in an isotonic solution, **OD2** represents test sample absorbance in a hypotonic solution and **OD3** represents the control sample absorbance in a hypotonic solution.

#### ***In vitro* $\alpha$ -amylase inhibitory assay**

The  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the extracts was evaluated using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) method as an *in vitro* screening assay for carbohydrate digestion-related antidiabetic potential. Extracts were solubilized in 10% DMSO and adjusted to pH 6.9 using 0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer containing 0.006 M NaCl to obtain final concentrations ranging from 1.9 to 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . At 30 °C, 200  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -amylase solution (2 U  $\text{mL}^{-1}$ ) was added to each sample and incubated for 10 min. Subsequently, 200  $\mu\text{L}$  of 1% (w/v) starch solution was added, and the reaction mixture was incubated for an additional 3 min. The enzymatic reaction was terminated by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of DNSA reagent, prepared by dissolving 42 g sodium potassium tartrate tetrahydrate in 8 mL of 2 M NaOH and 20 mL of 96 mM 3,5-dinitrosalicylic acid. The tubes were heated in a water bath at 85–90 °C for 10 min, cooled to room temperature, diluted with 5 mL of distilled water, and the absorbance was measured at 540 nm using a Biosystem 310 UV–visible spectrophotometer.

semelhante. Os tubos controlo continham 5 mL de veículo (água destilada) e indometacina (concentração final de 3,9–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Uma suspensão de eritrócitos (0,1 mL) foi adicionada a cada tubo com agitação suave, seguida de incubação a 37 °C durante 1 h e centrifugação a 1300  $\times$  g durante 3 min. O teor de hemoglobina nos sobrenadantes foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm (Spectronic, Milton Roy).

O ensaio de estabilização da membrana eritrocitária foi utilizado como método de rastreio *in vitro* para avaliar a atividade protetora da membrana, considerada associada ao potencial anti-inflamatório através da estabilização das membranas celulares e lisossomais. A inibição da hemólise foi expressa como percentagem relativamente à hemólise completa (100%) induzida por água destilada (27). A percentagem de inibição da hemólise foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição da hemólise} = \frac{\text{OD2} - \text{OD1}}{\text{OD3} - \text{OD1}} \times 100$$

onde **OD1** representa a absorbância da amostra de teste em solução isotónica, **OD2** representa a absorbância da amostra de teste em solução hipotónica e **OD3** representa a absorbância da amostra controlo em solução hipotónica.

#### ***Ensaio in vitro* de inibição da $\alpha$ -amilase**

A atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase dos extratos foi avaliada utilizando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNSA) como ensaio de rastreio *in vitro* do potencial antidiabético relacionado com a digestão de hidratos de carbono. Os extratos foram solubilizados em 10% de DMSO e ajustados para pH 6,9 utilizando tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,02 M contendo 0,006 M de NaCl, de modo a obter concentrações finais entre 1,9 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A 30 °C, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de  $\alpha$ -amilase (2 U  $\text{mL}^{-1}$ ) a cada amostra e incubados durante 10 min. Subsequentemente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de amido a 1% (p/v), e a mistura reacional foi incubada por mais 3 min. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de reagente DNSA, preparado através da dissolução de 42 g de tartarato de sódio e potássio tetra hidratado em 8 mL de NaOH 2 M e 20 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico 96 mM. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 85–90 °C durante 10 min, arrefecidos à temperatura ambiente, diluídos com 5 mL de água destilada, e a absorbância foi medida a 540 nm utilizando um espectrofotómetro UV–visível Biosystem 310.

Acarbose was used as a reference inhibitor in the assay, as it is a clinically used carbohydrate-digestive enzyme inhibitor commonly employed for comparison in  $\alpha$ -amylase inhibition studies. The control sample representing 100% enzyme activity was prepared by replacing the extract with 200  $\mu$ L of buffer, while blank samples were prepared for each concentration by omitting the enzyme solution. The percentage inhibition of  $\alpha$ -amylase activity was calculated using the following equation:

$$\alpha \text{ amylase inhibition} = 100 * (\text{Abs}_{100\% \text{ control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{100\% \text{ control}}$$

The  $IC_{50}$  value, representing the extract concentration required to inhibit 50% of the  $\alpha$ -amylase activity, was determined from the plot of inhibition percentage versus extract concentration (28).

#### Statistical Analysis

Using the SPSS 17 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), the statistical analysis was conducted using a one-way ANOVA test with  $p < 0.05$ , which is considered statistically significant. Each experiment was conducted three times, followed by determination of the mean values and standard deviations (SD) (29-31)

## Results

#### *Number of Streptomyces maritimus isolates obtained*

A total of 50 independent soil samples were processed, yielding 23 isolates identified as *Streptomyces maritimus* based on biochemical characteristics. The isolates originated from different soil samples collected across multiple locations within the study area, corresponding to an isolation yield of 46% (23/50). Each isolate was recovered from a distinct colony following serial dilution and plating and was subsequently characterized using standard biochemical criteria. This isolate set was considered sufficient to support subsequent enzyme production, purification, and functional activity screening.

A acarbose foi utilizada como inibidor de referência no ensaio, uma vez que é um inibidor clinicamente utilizado de enzimas digestivas de hidratos de carbono e frequentemente empregue para comparação em estudos de inibição da  $\alpha$ -amilase. A amostra controle representando 100% de atividade enzimática foi preparada substituindo o extrato por 200  $\mu$ L de tampão, enquanto amostras em branco foram preparadas para cada concentração omitindo a solução enzimática. A percentagem de inibição da atividade da  $\alpha$ -amilase foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Inibição da } \alpha\text{-amilase} = 100 * (\text{Abs}_{100\% \text{ controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{100\% \text{ controle}}$$

O valor de  $IC_{50}$ , representando a concentração do extrato necessária para inibir 50% da atividade da  $\alpha$ -amilase, foi determinado a partir do gráfico da percentagem de inibição em função da concentração do extrato (28).

#### Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via, considerando-se  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Foi utilizado o software SPSS versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) (29-31).

## Resultados

#### *Número de isolados de Streptomyces maritimus obtidos*

Um total de 50 amostras de solo independentes foi processado, resultando em 23 isolados identificados como *Streptomyces maritimus* com base em características bioquímicas. Os isolados tiveram origem em diferentes amostras de solo recolhidas em múltiplas localizações dentro da área de estudo, correspondendo a um rendimento de isolamento de 46% (23/50). Cada isolado foi obtido a partir de uma colônia distinta após diluição seriada e sementeira em placa, sendo posteriormente caracterizado utilizando critérios bioquímicos padrão. Este conjunto de isolados foi considerado suficiente para suportar as etapas subsequentes de produção enzimática, purificação e rastreamento da atividade funcional.

**Table 1** - *Streptomyces maritimus* produced MGL's overall purification profile.**Tabela 1** - O *Streptomyces maritimus* produziu o perfil de purificação geral do MGL.

Steps	<i>Streptomyces maritimus</i>				
	Total Protein / Proteína total (mg/ml)	Total Activity / Atividade total ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Specific activity / Atividade específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Fold Purification / Purificação	Enzyme recovery / Recuperação enzimática (%)
Crude / Bruto	0.092	6.245	64.18	1	100
Acetone / Acetona	0.08	5.712	82	1.082	91.05
Ammonium sulphate / Sulfato de amônio	0.065	4.253	82.4	1.094	90.4
DEAE-Sepharose	0.056	3.421	92	2.632	65.04
Sephadex G100	0.048	3.11	99.73	2.865	40.72

#### Purification profile of MGL enzyme

Stepwise purification of methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) resulted in a progressive increase in enzyme purity and specific activity, accompanied by a gradual reduction in total activity and recovery across successive purification stages (Table 1). The crude enzyme extract exhibited a specific activity of  $64.18 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  with 100% recovery, providing the baseline for subsequent purification. Following acetone precipitation, specific activity increased to  $82.00 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , with 91.05% enzyme recovery, indicating efficient removal of non-target proteins with minimal activity loss. Ammonium sulfate fractionation maintained a comparable specific activity ( $82.40 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) and high recovery (90.40%), confirming preservation of catalytic integrity during salting-out. Substantial enrichment was achieved during ion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose), where specific activity increased to  $92.00 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , corresponding to a 2.63-fold purification, although enzyme recovery declined to 65.04%. Final purification by gel filtration (Sephadex G-100) yielded the highest specific activity ( $99.73 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) and the maximum overall purification fold (2.87-fold), with a final recovery of 40.72%. Collectively, these results demonstrate a clear purity–yield trade-off, with maximal enzyme enrichment achieved at the final gel-filtration step.

#### Perfil de purificação da enzima MGL

A purificação faseada da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) resultou num aumento progressivo da pureza enzimática e da atividade específica, acompanhado por uma redução gradual da atividade total e da recuperação ao longo das etapas sucessivas de purificação (Tabela 1). O extrato enzimático bruto apresentou uma atividade específica de  $64,18 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , com 100% de recuperação, constituindo a linha de base para a purificação subsequente. Após a precipitação com acetona, a atividade específica aumentou para  $82,00 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , com uma recuperação enzimática de 91,05%, indicando uma remoção eficiente de proteínas não-alvo com perda mínima de atividade. O fracionamento com sulfato de amônio manteve uma atividade específica comparável ( $82,40 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) e uma elevada recuperação (90,40%), confirmando a preservação da integridade catalítica durante o processo de salting-out. Um enriquecimento substancial foi alcançado durante a cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose), na qual a atividade específica aumentou para  $92,00 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , correspondendo a uma purificação de 2,63 vezes, embora a recuperação enzimática tenha diminuído para 65,04%. A purificação final por filtração em gel (Sephadex G-100) originou a atividade específica mais elevada ( $99,73 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) e o maior fator global de purificação (2,87 vezes), com uma recuperação final de 40,72%. conjunto, estes resultados demonstram claramente um compromisso entre pureza e rendimento, sendo o enriquecimento máximo da enzima obtido na etapa final de filtração em gel.

### SDS-PAGE analysis of the purified enzyme extract

SDS-PAGE analysis was performed to assess the purity and apparent molecular mass of the methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) following the final purification step (Figure 2). Lane M contained the pre-stained protein molecular weight marker, spanning approximately 11–180 kDa. The purified MGL preparation (lane 2) exhibited a dominant protein band migrating above the 100 kDa marker. In addition to the major band, faint lower-intensity bands were observed, indicating the presence of minor residual proteins. Nevertheless, the strong predominance of the main band suggests that MGL was substantially enriched through the applied purification strategy. These electrophoretic results support that the enzymatic and biological activities observed in subsequent assays are primarily attributable to the MGL protein rather than to nonspecific contaminating proteins.

### Biochemical characterization of MGL enzyme

#### *pH-based characterization of enzyme activity and stability*

The effect of pH on MGL activity was evaluated over a wide pH range (Figure 3). Enzyme activity increased progressively from acidic conditions toward a defined optimum region, where maximal catalytic activity was recorded. Outside this optimal range, activity declined sharply, with pronounced reductions observed under both strongly acidic and strongly alkaline conditions. At the extreme pH values, MGL retained only a small fraction of its maximal activity, indicating high sensitivity of catalytic performance

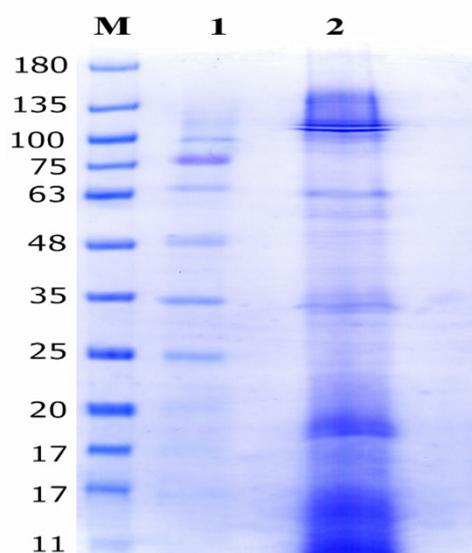
### Análise por SDS-PAGE do extrato enzimático purificado

A análise por SDS-PAGE foi realizada para avaliar a pureza e a massa molecular aparente da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) após a etapa final de purificação (Figura 2). A pista M continha o marcador de peso molecular proteico pré-corado, abrangendo aproximadamente 11–180 kDa. A preparação purificada de MGL (pista 2) apresentou uma banda proteica dominante, migrando acima do marcador de 100 kDa. Para além da banda principal, foram observadas bandas tênues de menor intensidade, indicando a presença de pequenas quantidades residuais de outras proteínas. Ainda assim, a predominância evidente da banda principal sugere que a MGL foi substancialmente enriquecida através da estratégia de purificação aplicada. Estes resultados eletroforéticos suportam que as atividades enzimáticas e biológicas observadas nos ensaios subsequentes são atribuíveis principalmente à proteína MGL, e não a proteínas contaminantes inespecíficas.

### Caracterização bioquímica da enzima MGL

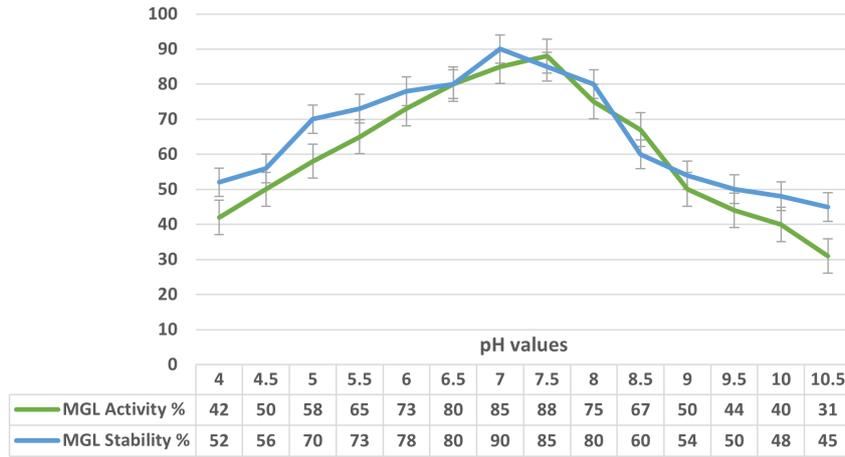
#### *Caracterização da atividade e estabilidade enzimática em função do pH*

O efeito do pH na atividade da MGL foi avaliado ao longo de um amplo intervalo de pH (Figura 3). A atividade enzimática aumentou progressivamente desde condições ácidas até uma região ótima definida, onde foi registada a atividade catalítica máxima. Fora deste intervalo ótimo, a atividade diminuiu acentuadamente, com reduções pronunciadas observadas tanto em condições fortemente ácidas como fortemente alcalinas. Nos valores extremos de pH, a MGL reteve apenas uma pequena fração da sua atividade máxima, indicando uma elevada

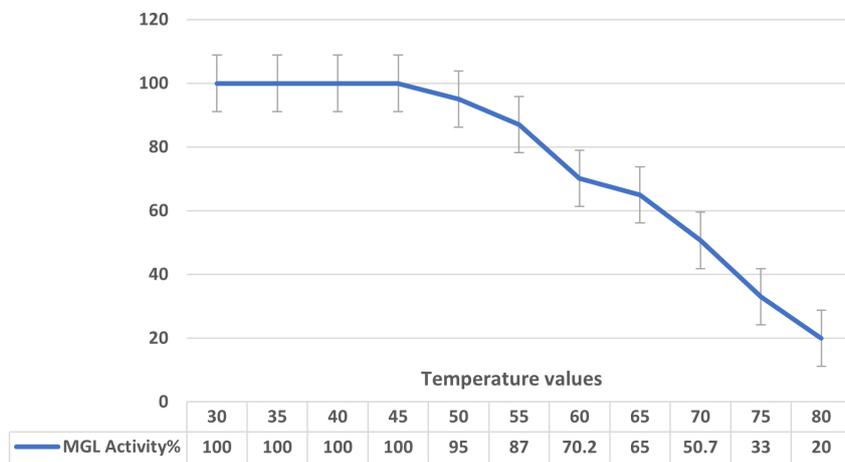


**Figure 2** - SDS-PAGE analysis of the MGL enzyme. Lane M: molecular weight marker (kDa); Lane 1: crude extract showing multiple non-specific proteins; Lane 2: purified MGL displaying a dominant band above 100 kDa.

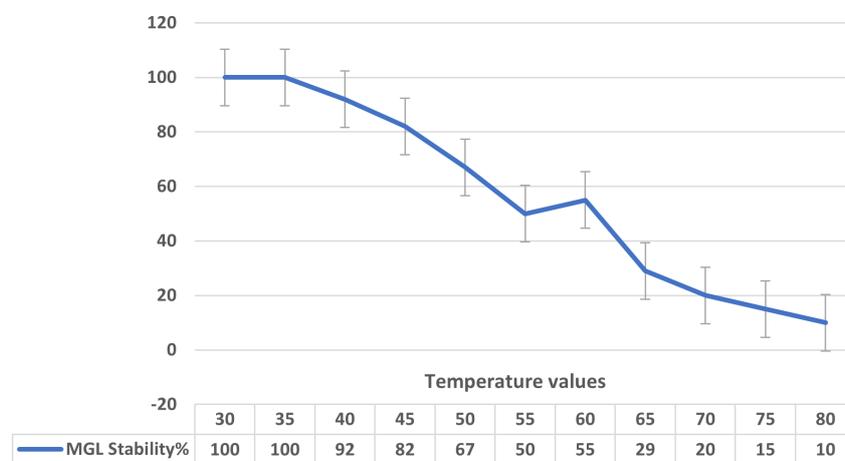
**Figura 2** - Análise SDS-PAGE da enzima MGL. Pista M: marcador de peso molecular (kDa); Pista 1: extrato bruto apresentando múltiplas proteínas não específicas; Pista 2: MGL purificada apresentando uma banda dominante acima de 100 kDa..



**Figure 3** - Calibrated graph displays influence of pH values on enzyme stability and activity.  
**Figura 3** - O gráfico calibrado mostra a influência dos valores de pH na estabilidade e atividade enzimática.



**Figure 4** - Calibrated graph displays influence of pH values on enzyme stability and activity  
**Figura 4** - O gráfico calibrado exibe a influência dos valores de pH na estabilidade e atividade enzimática.



**Figure 5** - Calibrated graph displays the influence of temperature on enzyme stability after 40 minutes of exposure for each temperature value.  
**Figura 5** - O gráfico calibrado exibe a influência da temperatura na estabilidade da enzima após 40 minutos de exposição para cada valor de temperatura.

**Table 2** - MGL activity in relation to various metal ions and chemical reagents.

**Tabela 2** - Atividade da MGL em relação a vários íões metálicos e reagentes químicos.

<b>Metal ions (Chloride salt, 10 mM) / Íões metálicos (Sal cloreto, 10 mM)</b>	<b>Relative activity / Atividade relativa (%)</b>	<b>Chemical reagents / Reagentes químicos (1 mM)</b>	<b>Relative activity / Atividade relativa (%)</b>
Control / Controlo	100	EDTA	91.5
Na <sup>+</sup>	99.6	SDS	50.2
K <sup>+</sup>	94.8	Ethanol / Etanol	99.5
Mg <sup>2+</sup>	82.3	Sodium Azide / Azida de sódio	40.8

to changes in the ionization state of functional groups involved in enzyme–substrate interaction. All measurements were performed in triplicate, and data are presented as mean ± standard deviation.

*Temperature-based characterization of enzyme activity and stability*

Temperature–activity profiling revealed a clear temperature-dependent pattern (Figure 4), with MGL displaying maximal activity within a defined temperature range, followed by a progressive decline at higher temperatures, consistent with thermal perturbation of enzyme structure. Thermal stability analysis conducted after 40 min of incubation at each temperature further distinguished catalytic activity from structural stability (Figure 5). MGL retained a substantial fraction of activity at moderate temperatures but showed pronounced inactivation at elevated temperatures, indicating that optimal operational conditions should account for both instantaneous activity and time-dependent thermal stability. Enzyme activity and stability values represent mean ± standard deviation of triplicate determinations.

*Metal ions-triggered inductive and inhibitory effect on enzyme activity*

The influence of metal ions and selected chemical reagents on MGL activity is summarized in Table 2. Among tested salts (10 mM), Na<sup>+</sup> had a negligible effect on enzyme activity (99.6%), while K<sup>+</sup> caused a slight reduction (94.8%). In contrast, Mg<sup>2+</sup> produced a more pronounced decrease in activity (82.3%).

sensibilidade do desempenho catalítico a alterações no estado de ionização dos grupos funcionais envolvidos na interação enzima–substrato. Todas as medições foram realizadas em triplicado, e os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

*Caracterização da atividade e estabilidade enzimática em função da temperatura*

O perfil temperatura–atividade revelou um padrão claramente dependente da temperatura (Figura 4), com a MGL a apresentar atividade máxima dentro de um intervalo térmico definido, seguido de um declínio progressivo a temperaturas mais elevadas, consistente com perturbações térmicas na estrutura enzimática. A análise da estabilidade térmica, realizada após 40 min de incubação a cada temperatura, permitiu distinguir adicionalmente a atividade catalítica da estabilidade estrutural (Figura 5). A MGL reteve uma fração substancial da atividade a temperaturas moderadas, mas apresentou uma inativação acentuada a temperaturas elevadas, indicando que as condições operacionais ótimas devem considerar tanto a atividade instantânea como a estabilidade térmica dependente do tempo. Os valores de atividade e estabilidade enzimática representam a média ± desvio padrão de determinações em triplicado.

*Efeito indutivo e inibitório desencadeado por íões metálicos na atividade enzimática*

A influência de íões metálicos e de reagentes químicos selecionados na atividade da MGL encontra-se resumida na Tabela 2. Entre os sais testados (10 mM), o Na<sup>+</sup> apresentou um efeito negligenciável na atividade enzimática (99,6%), enquanto o K<sup>+</sup> provocou uma ligeira redução (94,8%). Em contraste, o Mg<sup>2+</sup> originou uma diminuição mais pronunciada da atividade (82,3%).

Among chemical reagents (1 mM), EDTA resulted in only mild inhibition (91.5%), whereas SDS and sodium azide markedly suppressed activity to 50.2% and 40.8%, respectively. Ethanol exhibited minimal effect on catalytic performance (99.5%), indicating preservation of enzyme activity under the tested conditions. Relative activity values are expressed as percentages of the untreated control and represent mean values from triplicate measurements.

### Evaluation of biological activities of MGL enzyme

#### Anti-cancer activity using MTT assay

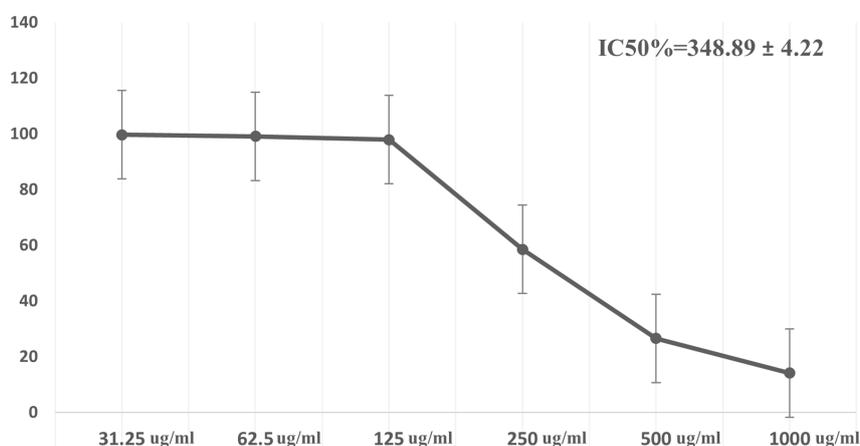
The MTT assay revealed a clear concentration-dependent reduction in Hep-2 cell viability following exposure to the MGL extract (Figure 6). Untreated control cells exhibited a mean optical density (OD) of  $0.693 \pm 0.0026$ , corresponding to 100% viability. At low concentrations (31.25 and 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), cell viability remained comparable to the control (99.66% and 99.13%, respectively), indicating negligible cytotoxic effects. Similarly, treatment with 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  maintained high cell viability (97.98%), suggesting that the cytotoxic threshold had not yet been reached. In contrast, a pronounced reduction in viability was observed at higher concentrations. Exposure to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  resulted in a decrease in mean OD to 0.4057, corresponding to 58.54% viability, indicating the onset of substantial cytotoxicity. This effect intensified at 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , where viability declined to 26.60%, and reached a maximum at 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , with viability reduced to 14.14%. These reductions were statistically significant compared with untreated controls ( $p < 0.05$ ).

Entre os reagentes químicos (1 mM), o EDTA resultou apenas numa inibição moderada (91,5%), enquanto o SDS e a azida de sódio suprimiram significativamente a atividade para 50,2% e 40,8%, respetivamente. O etanol exibiu um efeito mínimo no desempenho catalítico (99,5%), indicando preservação da atividade enzimática nas condições testadas. Os valores de atividade relativa são expressos como percentagem do controlo não tratado e representam médias de medições em triplicado.

### Avaliação das atividades biológicas da enzima MGL

#### Atividade anticancerígena utilizando o ensaio MTT

O ensaio MTT revelou uma redução clara e dependente da concentração na viabilidade das células Hep-2 após exposição ao extrato de MGL (Figura 6). As células controlo não tratadas apresentaram uma densidade ótica (DO) média de  $0,693 \pm 0,0026$ , correspondendo a 100% de viabilidade. Em concentrações baixas (31,25 e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a viabilidade celular manteve-se comparável à do controlo (99,66% e 99,13%, respetivamente), indicando efeitos citotóxicos negligenciáveis. De forma semelhante, o tratamento com 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  manteve uma elevada viabilidade celular (97,98%), sugerindo que o limiar citotóxico ainda não tinha sido atingido. Em contraste, foi observada uma redução acentuada da viabilidade em concentrações mais elevadas. A exposição a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  resultou numa diminuição da DO média para 0,4057, correspondendo a 58,54% de viabilidade, indicando o início de citotoxicidade substancial. Este efeito intensificou-se a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde a viabilidade diminuiu para 26,60%, atingindo o máximo a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com viabilidade reduzida para 14,14%. Estas reduções foram estatisticamente significativas em comparação com os controlos não tratados ( $p < 0,05$ ).



**Figure 6** - Effect of MGL extract on Hep-2 cell viability determined by MTT assay. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  $IC_{50}$  was calculated from the dose-response curve.

**Figura 6** - Efeito do extrato de MGL na viabilidade das células Hep-2 determinado pelo ensaio MTT. Os dados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). O  $IC_{50}$  foi calculado a partir da curva dose-resposta.

The calculated  $IC_{50}$  value was  $348.89 \pm 4.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ , consistent with the sharp transition in cell viability observed between 250 and  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Microscopic examination (Figure 7) corroborated these findings, revealing concentration-dependent morphological alterations and loss of cellular integrity at higher MGL concentrations. All values represent mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments.

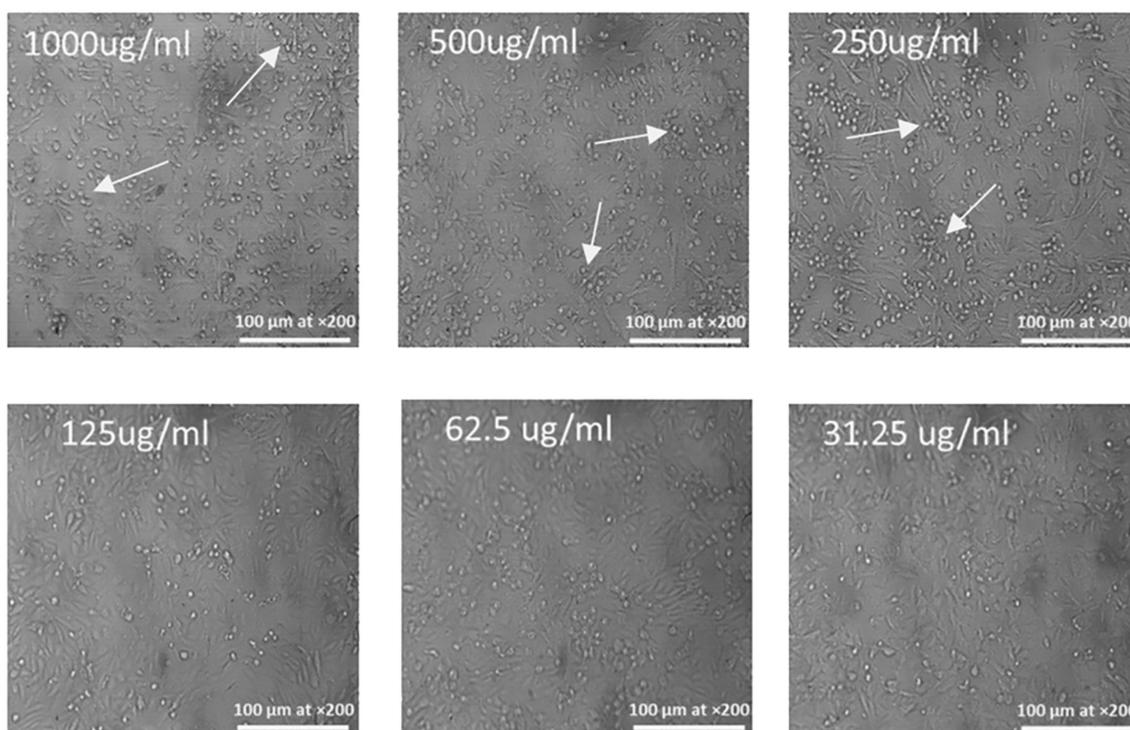
#### *In-vitro anti-inflammatory assay*

The membrane-stabilizing activity of MGL, assessed by the erythrocyte membrane stabilization (hemolysis inhibition) assay, demonstrated measurable inhibitory effects relative to the positive control indomethacin (Figure 8). At the lowest concentration evaluated ( $3.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), indomethacin achieved 44.1% hemolysis inhibition, whereas MGL exhibited 29.0% inhibition, indicating a lower but detectable membrane-protective effect under the same low-dose condition. Across the concentration range presented in Figure 8, MGL displayed a concentration-associated increase in hemolysis inhibition, reflecting membrane

O valor de  $IC_{50}$  calculado foi de  $348,89 \pm 4,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ , consistente com a transição abrupta na viabilidade celular observada entre 250 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A observação microscópica (Figura 7) corroborou estes resultados, revelando alterações morfológicas dependentes da concentração e perda da integridade celular em concentrações mais elevadas de MGL. Todos os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experiências independentes.

#### *Ensaio anti-inflamatório in vitro*

A atividade estabilizadora de membrana da MGL, avaliada através do ensaio de estabilização da membrana eritrocitária (inibição da hemólise), demonstrou efeitos inibitórios mensuráveis em relação ao controlo positivo indometacina (Figura 8). Na concentração mais baixa avaliada ( $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a indometacina atingiu 44,1% de inibição da hemólise, enquanto a MGL apresentou 29,0% de inibição, indicando um efeito protetor da membrana inferior, mas detetável, na mesma condição de baixa dose. Ao longo do intervalo de concentrações apresentado na Figura 8, a MGL exibiu um aumento



**Figure 7** - Phase-contrast micrographs of Hep-2 cells treated with MGL extract at different concentrations ( $31.25$ – $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Concentration-dependent morphological changes, including cell rounding and loss of adherence, are observed at higher concentrations. Arrows indicate rounded and detached cells. Images were acquired at  $\times 200$  magnification; scale bar =  $100 \mu\text{m}$ .

**Figura 7** - Micrografias de contraste de fase de células Hep-2 tratadas com extrato de MGL em diferentes concentrações ( $31,25$ – $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Alterações morfológicas dependentes da concentração, incluindo arredondamento celular e perda de aderência, são observadas em concentrações mais elevadas. As setas indicam células arredondadas e destacadas. As imagens foram obtidas com ampliação de  $\times 200$ ; barra de escala =  $100 \mu\text{m}$ .

stabilization behavior that is commonly associated with anti-inflammatory potential in *in vitro* screening assays. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate experiments.

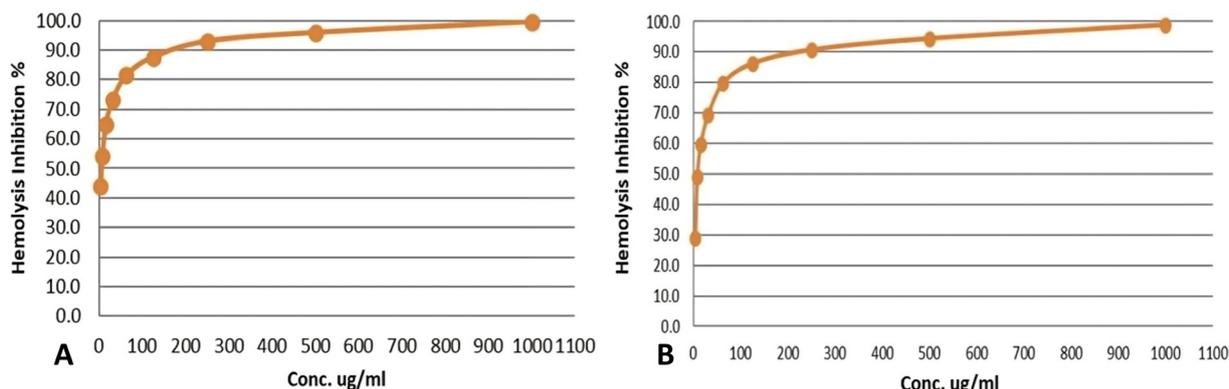
*In vitro*  $\alpha$ -amylase inhibitory assay

MGL exhibited inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase *in vitro* (Figure 9). The positive control acarbose displayed a strong inhibitory profile with an  $IC_{50}$  of  $4.21 \pm 0.004 \mu\text{g/mL}$ , confirming expected assay sensitivity and a steep inhibition response. Under the same assay framework, MGL inhibited  $\alpha$ -amylase with an  $IC_{50}$  of  $78.32 \mu\text{g/mL}$ , demonstrating clear enzyme inhibition at higher concentrations than acarbose. The inhibition curve presented in Figure 9 indicates concentration-dependent suppression of  $\alpha$ -amylase activity by MGL, supporting measurable anti-diabetic

associado à concentração na inibição da hemólise, refletindo um comportamento de estabilização de membrana frequentemente associado ao potencial anti-inflamatório em ensaios de rastreio *in vitro*. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experiências realizadas em triplicado.

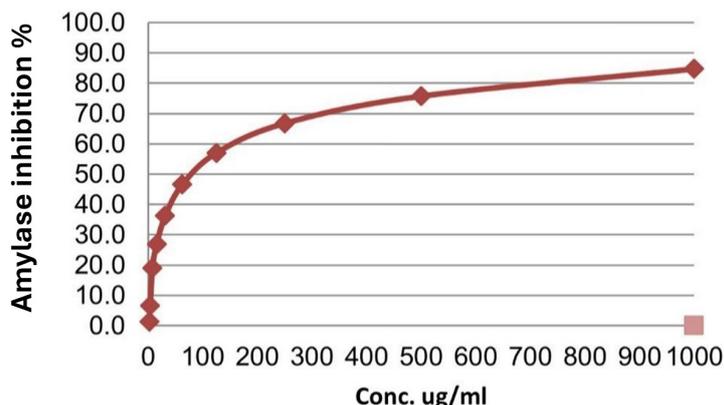
*Ensaio in vitro* de inibição da  $\alpha$ -amilase

A MGL apresentou atividade inibitória contra a  $\alpha$ -amilase *in vitro* (Figura 9). O controle positivo acarbose exibiu um perfil inibitório forte, com um  $IC_{50}$  de  $4,21 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$ , confirmando a sensibilidade esperada do ensaio e uma resposta de inibição acentuada. No mesmo enquadramento experimental, a MGL inibiu a  $\alpha$ -amilase com um  $IC_{50}$  de  $78,32 \mu\text{g/mL}$ , demonstrando uma inibição enzimática clara, embora em concentrações superiores às da acarbose. A curva de inibição apresentada na Figura 9 indica uma supressão dependente da concentração da atividade da  $\alpha$ -amilase pela MGL, sustentando um potencial



**Figure 8** - Percentage of hemolysis inhibition of erythrocyte membrane in relation to concentration of compounds used (A) Effect of MGL (B) Effect of Indomethacin (positive control).

**Figura 8** - Porcentagem de inibição da hemólise da membrana eritrocitária em relação à concentração dos compostos utilizados (A) Efeito do MGL (B) Efeito da indometacina (controle positivo).



**Figure 9** - Inhibition of  $\alpha$ -amylase enzyme activity at different concentrations of MGL.

**Figura 9** - Inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em diferentes concentrações de MGL.

potential in terms of enzymatic inhibition.  $IC_{50}$  values were calculated from dose–response curves and are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate measurements.

## Discussion

As reflected in reported statistical data, cancer continues to represent a major and growing global health burden. Recent estimates indicate that approximately 20 million new cancer cases and nearly 10 million cancer-related deaths occurred worldwide in 2022, with projections suggesting a substantial further increase driven by population growth and aging (32,33).

In this study, the therapeutic potential of methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) was evaluated for its anticancer and antidiabetic activities. MGL was produced from *Streptomyces maritimus* isolated from soil samples following protocols established in earlier investigations (34,35). The strain was biochemically identified using starch nitrate agar and its modified medium, and its ability to utilize L-methionine as a nitrogen source was confirmed. Culture conditions were optimized according to published recommendations (36). The enzyme was subsequently purified using standard acetone precipitation, ammonium sulfate fractionation, and chromatographic techniques, as previously validated (37). SDS-PAGE analysis of the purified methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) revealed a dominant protein band migrating above 100 kDa, with only faint minor bands, indicating substantial enrichment of the target enzyme. While many microbial MGLs have been reported to exhibit lower apparent molecular masses on SDS-PAGE, recent studies have documented variability in electrophoretic migration, including higher apparent molecular weights attributed to oligomeric stability or incomplete dissociation under denaturing conditions. Thus, the observed profile is consistent with reported MGL behavior and supports that the detected enzymatic and biological activities are primarily attributable to MGL rather than contaminating proteins (23,38).

In the MTT cytotoxicity assay on Hep-2 carcinoma cells, the purified *S. maritimus* MGL showed an  $IC_{50}$  of 348.9  $\mu$ g/mL. This potency is of the same order as fungal MGLs reported in the recently published research, such as Hendy et al. (2023), which observed

antidiabético mensurável em termos de inibição enzimática. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados a partir de curvas dose–resposta e são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de medições em triplicado.

## Discussion

Conforme refletido nos dados estatísticos reportados, o cancro continua a representar um fardo global de saúde significativo e crescente. Estimativas recentes indicam que aproximadamente 20 milhões de novos casos de cancro e quase 10 milhões de mortes relacionadas com cancro ocorreram em todo o mundo em 2022, com projeções que sugerem um aumento substancial adicional impulsionado pelo crescimento populacional e pelo envelhecimento (32,33).

Neste estudo, foi avaliado o potencial terapêutico da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) pelas suas atividades anticancerígena e antidiabética. A MGL foi produzida a partir de *Streptomyces maritimus* isolada de amostras de solo, seguindo protocolos estabelecidos por investigações anteriores (34,35). A estirpe foi identificada bioquimicamente utilizando ágar nitrato de amido e o respetivo meio modificado, tendo sido confirmada a sua capacidade de utilizar L-metionina como fonte de azoto. As condições de cultura foram otimizadas de acordo com recomendações publicadas (36). A enzima foi posteriormente purificada utilizando precipitação padrão com acetona, fracionamento com sulfato de amónio e técnicas cromatográficas, previamente validadas (37). A análise por SDS-PAGE da metionina  $\gamma$ -liase (MGL) purificada revelou uma banda proteica dominante migrando acima de 100 kDa, com apenas bandas menores ténues, indicando um enriquecimento substancial da enzima alvo. Embora muitas MGLs microbianas tenham sido reportadas com massas moleculares aparentes inferiores em SDS-PAGE, estudos recentes documentaram variabilidade na migração eletroforética, incluindo pesos moleculares aparentes mais elevados atribuídos à estabilidade oligomérica ou à dissociação incompleta sob condições desnaturantes. Assim, o perfil observado é consistente com o comportamento descrito para MGL e sustenta que as atividades enzimáticas e biológicas detetadas são atribuíveis principalmente à MGL, e não a proteínas contaminantes (23,38).

No ensaio de citotoxicidade MTT em células de carcinoma Hep-2, a MGL purificada de *S. maritimus* apresentou um  $IC_{50}$  em torno de 348,9  $\mu$ g/mL. Esta potência encontra-se na mesma ordem de grandeza das MGLs fúngicas reportadas em estudos recentes,

MGL  $IC_{50}$  values of 243  $\mu\text{g/mL}$  against Hep-G2 hepatocarcinoma cells (38). In contrast, a filamentous fungal MGL from *Trichoderma harzianum* was significantly more active, with  $IC_{50}$  values of only 14  $\mu\text{g/mL}$  on Hep-G2 and 20  $\mu\text{g/mL}$  on MCF-7 (39). These differences underscore how MGL source and enzyme properties impact cytotoxic efficacy.

Over and above, in the  $\alpha$ -amylase inhibition assay, *S. maritimus* MGL showed an  $IC_{50}$  of 78.3  $\mu\text{g/mL}$  for inhibiting starch-degrading activity, indicating a moderate enzyme inhibitory effect much weaker than the standard drug acarbose ( $IC_{50}$  4.2  $\mu\text{g/mL}$  in the same assay). Comparable studies explicitly assessing MGL's  $\alpha$ -amylase inhibition are scarce, as prior research on MGL's antidiabetic potential has focused on methionine-restriction effects rather than direct enzyme inhibition. As an example, oral administration of recombinant MGL from *Pseudomonas putida* in a mouse model of diet-induced diabetes kept blood glucose near normal levels (126 mg/dL vs 201 mg/dL in untreated controls) and significantly prevented weight gain (40).

Within a parallel aspect, the *in vitro* anti-inflammatory activity of *S. maritimus* MGL, assessed by erythrocyte hemolysis inhibition, showed modest yet promising effects, with 29% inhibition at 3.9  $\mu\text{g/mL}$  compared to 44% for indomethacin at the same dose, suggesting that MGL exerts a membrane-protective effect, possibly by mitigating oxidative or osmotic damage to cells. Although direct literature comparisons for MGL in such anti-inflammatory assays are only available to a limited extent, some analogous findings shed light on MGL's interaction with blood cells. A recent report on an MGL from *Alcaligenes aquatilis* noted that the enzyme caused no hemolysis of human erythrocytes even at high concentrations, indicating a high probability of MGL biocompatibility with cell membranes and demanding further research in that area to confirm this feature (41).

Despite the promising *in vitro* activities observed for methionine  $\gamma$ -lyase in the present study, the limitations also must be acknowledged, as all biological evaluations were conducted exclusively using *in vitro* assays, which do not fully recapitulate the complexity of *in vivo* physiological conditions,

como o trabalho de Hendy et al. (2023), que observou valores de  $IC_{50}$  de 243  $\mu\text{g/mL}$  contra células Hep-G2 de hepatocarcinoma (38). Em contraste, uma MGL de fungo filamentoso proveniente de *Trichoderma harzianum* foi significativamente mais ativa, com valores de  $IC_{50}$  de apenas 14  $\mu\text{g/mL}$  em Hep-G2 e 20  $\mu\text{g/mL}$  em MCF-7 (39). Estas diferenças evidenciam como a origem da MGL e as propriedades enzimáticas influenciam a eficácia citotóxica.

Adicionalmente, no ensaio de inibição da  $\alpha$ -amilase, a MGL de *S. maritimus* apresentou um  $IC_{50}$  de 78,3  $\mu\text{g/mL}$  na inibição da atividade de degradação do amido, indicando um efeito inibitório moderado, muito inferior ao do fármaco padrão acarbose ( $IC_{50}$  de 4,2  $\mu\text{g/mL}$  no mesmo ensaio). Estudos comparáveis que avaliem explicitamente a inibição da  $\alpha$ -amilase por MGL são escassos, uma vez que investigações anteriores sobre o potencial antidiabético da MGL se concentraram sobretudo nos efeitos da restrição de metionina, e não na inibição direta enzimática. Por exemplo, a administração oral de MGL recombinante de *Pseudomonas putida* num modelo murino de diabetes induzida por dieta manteve a glicemia próxima de valores normais (126 mg/dL versus 201 mg/dL em controlos não tratados) e preveniu significativamente o aumento de peso (40).

Num aspeto paralelo, a atividade anti-inflamatória *in vitro* da MGL de *S. maritimus*, avaliada pela inibição da hemólise eritrocitária, demonstrou efeitos modestos mas promissores, com 29% de inibição a 3,9  $\mu\text{g/mL}$ , comparativamente a 44% para a indometacina na mesma dose. Estes resultados sugerem que a MGL exerce um efeito protetor da membrana, possivelmente através da mitigação de danos oxidativos ou osmóticos nas células. Embora existam comparações limitadas na literatura para MGL em ensaios anti-inflamatórios deste tipo, alguns resultados análogos ajudam a clarificar a interação da MGL com células sanguíneas. Um relatório recente sobre uma MGL de *Alcaligenes aquatilis* indicou que a enzima não causou hemólise de eritrócitos humanos mesmo em concentrações elevadas, sugerindo uma elevada probabilidade de biocompatibilidade da MGL com membranas celulares, sendo necessários mais estudos para confirmar esta característica (41).

Apesar das atividades *in vitro* promissoras observadas para a metionina  $\gamma$ -liase no presente estudo, devem também ser reconhecidas as limitações, uma vez que todas as avaliações biológicas foram conduzidas exclusivamente através de ensaios *in vitro*, os quais não reproduzem totalmente a complexidade das condições fisiológicas *in vivo*, incluindo a biodisponibilidade, estabilidade, imunogenicidade

including enzyme bioavailability, stability, immunogenicity, and systemic toxicity, underscore the necessity for subsequent *in vivo* validation.

## Conclusion

From the authors' viewpoint, the study demonstrated that methionine  $\gamma$ -lyase (MGL) produced by *Streptomyces maritimus* exhibits multifunctional biological activity under *in vitro* conditions. The enzyme induced a concentration-dependent reduction in Hep-2 cell viability, showed measurable  $\alpha$ -amylase inhibitory activity, and provided moderate erythrocyte membrane stabilization, collectively supporting its anticancer, antidiabetic, and anti-inflammatory potential. These findings indicate that microbial MGL retains biologically relevant activity following purification and may serve as a promising enzyme candidate for further biomedical investigation. However, as the present work is limited to *in vitro* assays, direct therapeutic translation cannot be inferred. Future research should prioritize *in vivo* efficacy and toxicity evaluation, assessment of enzyme pharmacokinetics and immunogenicity, optimization of stability and delivery strategies, and verification of selectivity toward cancerous versus normal cells.

## Data Availability Statement

The Materials and Methods section highlights the study's original contributions; readers may contact the corresponding author for further details or clarifications.

## Conflict of Interest Statement

During the study, the authors confirmed that there were no corporate or financial relations that may be believed to pose a potential conflict of interest. The editor involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process.

e toxicidade sistêmica da enzima. Estes aspetos reforçam a necessidade de validação subsequente em modelos *in vivo*.

## Conclusão

Do ponto de vista dos autores, o estudo demonstrou que a metionina  $\gamma$ -liase (MGL) produzida por *Streptomyces maritimus* apresenta atividade biológica multifuncional em condições *in vitro*. A enzima induziu uma redução dependente da concentração na viabilidade das células Hep-2, exibiu atividade inibitória mensurável sobre a  $\alpha$ -amilase e proporcionou uma estabilização moderada da membrana eritrocitária, sustentando coletivamente o seu potencial anticancerígeno, antidiabético e anti-inflamatório. Estes resultados indicam que a MGL microbiana mantém atividade biologicamente relevante após purificação e poderá constituir uma candidata enzimática promissora para investigação biomédica futura. No entanto, uma vez que o presente trabalho se limita a ensaios *in vitro*, não é possível inferir uma tradução terapêutica direta. Estudos futuros deverão priorizar a avaliação da eficácia e toxicidade *in vivo*, a caracterização da farmacocinética e imunogenicidade da enzima, a otimização de estratégias de estabilidade e administração, bem como a verificação da seletividade para células cancerígenas em comparação com células normais.

## Declaração de Disponibilidade de Dados

A secção de Materiais e Métodos descreve as contribuições originais do estudo; para informações adicionais ou esclarecimentos, os interessados poderão contactar o autor correspondente.

## Declaração de Conflito de Interesses

Durante a realização do estudo, os autores confirmaram que não existiram relações comerciais ou financeiras que possam ser consideradas como um potencial conflito de interesses. A editora envolvida na autoria deste manuscrito não participou no processo de revisão ou decisão.

### **Author Contributions**

Conceptualization: N.Z.M, E.M.S and M.F.L.; formal analysis M.F.L; investigation: M.F.L, and E.M.S.; methodology: E.M.S, and M.F.L; project administration: and resources: N.Z.M, A.M.A, and S.S.A.S.; supervision: E.M.S. and M.F.L.; validation: M.F.L.; visualization: E.M.S.; writing—original draft: M.F.L, and E.M.S; writing—review edition: A.H., E.M.S., R.A and P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Contribuição dos Autores**

Conceptualização: N.Z.M, E.M.S, e M.F.L; análise formal M.F.L; investigação: M.F.L, e E.M.S.; metodologia: E.M.S, e M.F.L; administração do projeto e recursos: N.Z.M, A.M.A, e S.S.A.S. ; supervisão: E.M.S e M.F.L.; validação: M.F.L.; visualização: E.M.S.; redação - versão original: M.F.L. e E.M.S; redação - revisão e edição: A.H., E.M.S., R.A e P.R. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

## References / Referências

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, *127*(16), 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
- International Diabetes Federation. (2023). *IDF Diabetes Atlas* (10th ed.). Brussels, Belgium: IDF. <https://diabetesatlas.org>.
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, *51*(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Tsalamandris, S., Antonopoulos, A. S., Oikonomou, E., Papamikroulis, G. A., Vogiatzi, G., Papaioannou, S., Devereux, S., & Tousoulis, D. (2019). The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *European cardiology*, *14*(1), 50–59. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
- Ma, C., Xu, A., Zuo, L., Li, Q., Fan, F., Hu, Y., & Sun, C. (2025). Methionine Dependency and Restriction in Cancer: Exploring the Pathogenic Function and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *18*(5), 640. <https://doi.org/10.3390/ph18050640>
- Huang, S. (2020) mTOR Signaling in Metabolism and Cancer. *Cells*. *9*(10), 2278. doi: 10.3390/cells9102278.
- Wanders, D., Hobson, K., & Ji, X. (2020). Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients*, *12*(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nu12030684>
- Kaiser P. (2020). Methionine Dependence of Cancer. *Biomolecules*, *10*(4), 568. <https://doi.org/10.3390/biom10040568>
- Li, Y., Yu, Z., Li, T., & Li, C. (2023). Methionine Restriction Increases Insulin Sensitivity in Type-2 Diabetes via miRNA Activation. *SHS Web of Conferences*, *174*, 03012. <https://doi.org/10.1051/shsconf/202317403012>.
- Zhang, Y., Jelleschitz, J., Grune, T., Chen, W., Zhao, Y., Jia, M., Wang, Y., Liu, Z., & Höhn, A. (2022). Methionine restriction - Association with redox homeostasis and implications on aging and diseases. *Redox biology*, *57*, 102464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102464>
- Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research*, *167*(10), 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>
- Abdelmohsen, U. R., Bayer, K., & Hentschel, U. (2014). Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Natural product reports*, *31*(3), 381–399. <https://doi.org/10.1039/c3np70111e>
- Thakur, C. S., Jha, B. K., Dong, B., Das Gupta, J., Silverman, K. M., Mao, H., Sawai, H., Nakamura, A. O., Banerjee, A. K., Gudkov, A., & Silverman, R. H. (2007). Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(23), 9585–9590. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700590104>
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., et al. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *183*, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109119>
- Tanaka, H., Esaki, N., Yamamoto, T., & Soda, K. (1976). Purification and properties of methioninase from *Pseudomonas ovalis*. *FEBS Letters*, *66*(2), 307–311. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80528-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80528-5)
- Manukhov, I. V., Mamaeva, D. V., Morozova, E. A., Rastorguev, S. M., Faleev, N. G., Demidkina, T. V., et al. (2006). L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Citrobacter freundii*: Cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme. *Biochemistry (Moscow)*, *71*(4), 361–369. <https://doi.org/10.1134/S0006297906040030>
- Leksawasdi, N. (2018). Kinetics and modelling of enzymatic process for R-phenylacetylcarbinol (PAC) production. [Doctoral dissertation, University of Newcastle]. <https://doi.org/10.26190/unsworks/21955>
- Rosche, B., Leksawasdi, N., Sandford, V., Breuer, M., Hauer, B., & Rogers, P. (2002). Enzymatic (R)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(1–2), 94–100. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1020-7>
- Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V., et al. (2011). Alkaliphilic bacteria: Applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*(7), 769–790. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0891-5>
- Gunasekaran, B., Baskaran, G., Syed, M. A., Salvamani, S., Sinniah, S., Pattiram, P. D., et al. (2014). Purification of protease from *Coriandrum sativum* using ion-exchange chromatography and gel filtration method. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *2*, 1–5. <https://doi.org/10.1290/BBM-2014-0003>.
- Srivastava, Y. ., Tripathi, K. ., & Kumar, N. . (2025). SDS-PAGE Analysis of proteins: Principles, methodology, and applications in proteomics. In K. Tripathi, Y. Srivastava, & N. Kumar (Eds.), *Biotechnology Lab Techniques: Culture Media, Microscopy, and Microbial Analysis* (pp. 143-150). Deep Science Publishing. [https://doi.org/10.70593/978-93-49307-52-0\\_29](https://doi.org/10.70593/978-93-49307-52-0_29)
- Production and purification of methionine gamma-lyase from Iranian soil mulds: investigation of physicochemical properties and anticancer effects.
- Dayanand, K., Nadumane, V.K. (2023) Effect of physicochemical parameters on the L-methioninase activity of *Methylobacterium* sp. and its in vitro anticancer activity in combination with tamoxifen citrate. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* *9*, 94. <https://doi.org/10.1186/s43094-023-00545-6>
- Alka, K., Kaushal, L., Arti, Arya, E., Kuma, P. & Chand, D. (2024) Impact of Metal Ions on Catalytic Kinetics, Stability, and Reactivation of Purified Tannase from *Aspergillus niger*. *Catalysis Letters*, *154*, 4981–4992. <https://doi.org/10.1007/s10562-024-04664-4>.
- Hassan, A., Al-Salmi, F. A., Abuamara, T. M., Matar, E. R., Amer, M. E., Fayed, E. M., ... & Abd El Maksoud, A. I. (2022). Ultrastructural analysis of zinc oxide nanospheres enhances anti-tumor efficacy against Hepatoma. *Frontiers in Oncology*, *12*, 933750. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.933750>
- de Freitas, M. V., Netto, R. de C. M., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M. T., Costa, J. O., Firmino, C. B., et al. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, *22*(1), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.017>
- Wickramaratne, M. N., PUNCHIHewa, J. C., & Wickramaratne, D. B. M. (2016). In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenantha pavonina*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1156-2>

29. Hassan, A., Mohsen, R., Rezk, A., Bangay, G., Rijo, P., Soliman, M. F. M., G A Hablas, M., Swidan, K. A. K., Mohammed, T. S., Zoair, M. A., Mohamed, A. A. K., Abdalrhman, T. I., Abdel-Aleem Desoky, A. M., Mohamed, D. D., Mohamed, D. D., Abd El Maksoud, A. I., & Mohamed, A. F. (2024). Enhancement of Vitamin C's Protective Effect against Thimerosal-Induced Neurotoxicity in the Cerebral Cortex of Wistar Albino Rats: An *In Vivo* and Computational Study. *ACS omega*, 9(8), 8973–8984. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07239>
30. Rijo, P., Abuamara, T. M. M., Ali Lashin, L. S., Kamar, S. A., Isca, V. M. S., Mohammed, T. S., Abdrabo, M. S. M., Amin, M. A., Abd El Maksoud, A. I., & Hassan, A. (2024). Glycyrrhizic Acid Nanoparticles Subside the Activity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Suppressing PBP2a. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 17(5), 589. <https://doi.org/10.3390/ph17050589>
31. Farouk, F., Zarka, M. A., Al-Sawahli, M. M., Hassan, A., Mohamed, A. F., Ibrahim, I. M., ... Shebl, R. I. (2023). Rosmarinic Acid Inhibits Rift Valley Fever Virus: *In Vitro*, Computational and Analytical Studies. *Future Virology*, 18(15), 1001–1019. <https://doi.org/10.2217/fvl-2023-0119>
32. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
33. Wagle, N. S., Nogueira, L., Devasia, T. P., Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Islami, F., Jemal, A., Alteri, R., Ganz, P. A., & Siegel, R. L. (2025). Cancer treatment and survivorship statistics, 2025. *CA: a cancer journal for clinicians*, 75(4), 308–340. <https://doi.org/10.3322/caac.70011>. Correction to "Cancer treatment and survivorship statistics, 2025". (2025). *CA: a cancer journal for clinicians*, 75(6), 683. <https://doi.org/10.3322/caac.70036>
34. Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K., & Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(5), 485–492. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.485>
35. Abdulkadir, M., & Waliyu, S. (2012). Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 4(5), 211–215. <https://doi.org/10.13187/ejas.2012.4.211>
36. Bundale, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2015). Optimization of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil. *Advances in Microbiology*, 5(6), 441–451. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56047>
37. Selim, M. H., Elshikh, H. H., Saad, M. M., Mostafa, E. E., & Mahmoud, M. A. (2016). Purification and characterization of a novel thermostable L-methioninase from *Streptomyces* sp. DMMM4 and its evaluation for anticancer activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(7), 53–60. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60709>
38. Hendy, M. H., Hashem, A. H., Suleiman, W. B., Sultan, M. H., & Abdelraof, M. (2023). Purification, Characterization and anticancer activity of L-methionine  $\gamma$ -lyase from thermo-tolerant *Aspergillus fumigatus*. *Microbial cell factories*, 22(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02019-z>
39. Salim, N., Santhiagu, A. & Joji, K. (2020) Purification, characterization and anticancer evaluation of l-methioninase from *Trichoderma harzianum*. *3 Biotech* 10, 501. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02494-w>.
40. Tashiro, Y., Han, Q., Tan, Y., Sugisawa, N., Yamamoto, J., Nishino, H., Inubushi, S., Sun, Y. U., Zhu, G., Lim, H., Aoki, T., Murakami, M., Bouvet, M., & Hoffman, R. M. (2020). Oral Recombinant Methioninase Inhibits Diabetes Onset in Mice on a High-fat Diet. *In vivo (Athens, Greece)*, 34(3), 973–978. <https://doi.org/10.21873/invivo.11865>
41. Javia, B., Gadhvi, M., Vyas, S., Dudhagara, P., Shyu, D. J. H., Chen, Y.-Y., & Dudhagara, D. (2023). Bioprospecting of a Thermostable L-Methioninase from *Alcaligenes aquatilis* BJ-1 in Agro-Industrial Waste. *Microbiology Research*, 14(3), 959-976. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030066>.