

**PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS DE LA LISOZIMA
DE LA ALMEJA *Tivela stultorum***

**BIOCHEMICAL AND BACTERIOLOGICAL PROPERTIES OF THE
LYSOZYME OF THE CLAM *Tivela stultorum***

Ruth Elena Montenegro-Ortega¹

María Teresa Viana^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Marinas

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453

Ensenada, CP 22860, Baja California, México

* E-mail: viana@faro.ens.uabc.mx

Recibido en marzo de 1999; aceptado en noviembre de 1999

RESUMEN

Una enzima tipo lisozima proveniente del estilete cristalino de la almeja *Tivela stultorum* fue purificada por cromatografía de intercambio catiónico en carboximetil celulosa. El producto tuvo una actividad específica de 25,407 unidades por miligramo de proteína, representando una purificación de 100 veces. La actividad específica observada por esta enzima fue casi seis veces mayor que la actividad observada en la lisozima de clara de huevo de gallina bajo las mismas condiciones. Mediante la técnica de isoelectroenfoque se observó un componente indicando un punto isoeléctrico de 7.7 (IEF-PAGE, Phast Gel). Por medio de electroforesis de una dimensión (SDS-PAGE), se sugiere un peso molecular aparente de 17,000 daltons. La enzima fue óptimamente activa a pH de 5.6 a 5.8, en amortiguador citrato fosfato 0.1 M, con actividad máxima a una temperatura de 40°C, y con una fuerza iónica de 0.1043. A 4°C la lisozima presentó 26.7% de actividad remanente, además de mostrar ser altamente estable a temperaturas elevadas (90°C) y pHs extremos con actividades por arriba del 75%, en un rango de pHs de 2.8 a 11.8. Dicha enzima mostró tener propiedades antimicrobianas en presencia y ausencia de EDTA sobre la lisis de tres bacterias (*Streptococcus alfa*, *Micrococcus lisodeikticus* y *Escherichia coli*), mientras que la lisozima de huevo de gallina sólo mostró lisis en presencia de EDTA sobre *S. alfa* y *E. coli*. Los resultados también fueron comparados contra una lisozima de la almeja ártica *Chlamys islandica*.

Palabras clave: enzimas marinas, lisozima, bacteriológicas, caracterización.

ABSTRACT

A lysozyme-like enzyme from the crystalline style of the clam *Tivela stultorum* was purified by chromatography of cationic exchange in carboxymethyl cellulose. The product had a specific activity of 25,407 units per milligram of protein, which represents a purification of 100 times. The specific activity observed with this enzyme was almost six times greater than the activity observed in the hen egg-white

lysozyme under the same conditions. Using the isoelectric focusing technique, a component was observed that indicates an isoelectric point of 7.7 (IEF-PAGE, Phast Gel). A one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE) revealed an apparent molecular weight of 17,000 daltons. The enzyme was optimally active at pH 5.6–5.8, in 0.1 M phosphate-citrate buffer, with maximum activity at a temperature of 40°C, and an ionic strength of 0.1043. At 4°C, the lysozyme presented 26.7% of remnant activity, and was highly stable at elevated temperatures (90°C) and extreme pHs, from 2.8 to 11.8, with activities above 75%. This enzyme proved to have antimicrobial properties with or without EDTA in the lysis of three bacteria (*Streptococcus alfa*, *Micrococcus lisodeikticus* and *Escherichia coli*), whereas hen egg lysozyme showed lysis in the presence of EDTA on *S. alfa* and *E. coli*. The results were also compared against the lysozyme of the scallop *Chlamys islandica*.

Key words: marine enzymes, lysozyme, bacteriological, characterization.

INTRODUCCIÓN

Uno de los intereses de la enzimología es la búsqueda de enzimas con actividades conocidas pero con óptimos de actividad diferentes (e.g., temperatura, fuerza iónica, etc.). Dentro de esto cabe mencionar a las enzimas extremófilas, las cuales actúan bajo condiciones diferentes o extremas a las ya ampliamente conocidas. Esto es importante ya que nos permite entender los mecanismos envueltos en las propiedades químicas estructurales de las proteínas, así como encontrar enzimas con utilidades versátiles. En el presente trabajo se presenta a una lisozima (EC 3.2.1.17), la cual es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Jollès *et al.*, 1965) y posee la capacidad de degradar la pared bacteriana por medio de la ruptura de los enlaces glucosídicos en el peptidoglucano bacteriano (Jollès y Jollès, 1984). La lisozima ha sido considerada como parte importante de un mecanismo primitivo de defensa en una gran variedad de organismos, los cuales carecen de un sistema inmunológico bien desarrollado (McDade y Tripp, 1967; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979), mientras que en organismos superiores la lisozima aparece en secreciones y tejidos mucosos con la función de protección bacteriana.

INTRODUCTION

One of the areas of enzymology is the search for enzymes with known activities but with different optima of activity (e.g., temperature, ionic strength, etc.). The extremophile enzymes, for example, act under conditions that are extreme or different than those widely known. This is important since it permits us to understand the mechanisms involved in the chemical structure of proteins, as well as to find enzymes with versatile uses. This study presents a lysozyme (EC 3.2.1.17), which is an enzyme widely distributed in the natural environment (Jollès *et al.*, 1965) and is capable of degrading the bacterial wall by breaking the glucosidic linkage in the bacterial peptidoglycan (Jollès and Jollès, 1984). Lysozymes are an important part of the primitive defense mechanisms in a wide variety of organisms that lack a well-developed immune system (McDade and Tripp, 1967; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979), whereas in higher organisms, lysozymes occur in secretions and mucous tissues that protect against bacteria.

More research is being conducted on marine lysozymes, especially those of bivalve mollusks, since their activity is associated with digestion. A high concentration of lysozyme is present in the digestive gland and crystalline

El estudio de lisozimas de origen marino, sobre todo aquellas de moluscos bivalvos, ha aumentado debido a que su actividad se encuentra asociada con la digestión. Una alta concentración de lisozima se encuentra presente en la glándula digestiva y el estilete cristalino (McHenery *et al.*, 1979), donde su principal papel es la degradación de las bacterias para su nutrición (Jollès *et al.*, 1965; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979), además de encontrarse en la hemolinfa y secreciones participando en el mecanismo de defensa.

Las lisozimas marinas caracterizadas a la fecha (Fletcher y White, 1976; McHenery y Birkbeck, 1982; Jollès y Jollès, 1984; Viana y Raa, 1992) poseen una actividad específica fuera del rango de actividad encontrada en la lisozima de huevo de gallina y en otras lisozimas terrestres, ya que las primeras presentan actividad bajo parámetros ambientales más extremos, como pH y temperatura, entre otros. Debido a que la lisozima, como toda proteína en evolución, debe presentar estrategias especiales para adaptarse a diferentes medios ambientes, ha adquirido características o habilidades diversas (Jollès *et al.*, 1965). Tan solo si tomamos en cuenta que en el medio marino el 90% del volumen total del agua es inferior a los 5°C (Gounot, 1991) y que existen organismos marinos que viven en condiciones extremas de salinidad, pH o temperatura, podríamos pensar en una gran diversidad de ambientes en este medio y, por ende, organismos adaptados a éstos.

La almeja *Tivela stultorum* es un molusco bivalvo endémico de las costas arenosas de Baja California, México. Durante años ha sido explotado para consumo humano, donde el callo es lo único aprovechable, desechando las vísceras donde se encuentra la lisozima.

El presente trabajo describe el aislamiento y las propiedades de una enzima que se encuentra en las vísceras de la almeja *T. stultorum* proveniente de las costas de Baja California.

style (McHenery *et al.*, 1979), where its principal role is the degradation of bacteria for nutrition (Jollès *et al.*, 1965; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979). It is also found in the haemolymph and secretions that form part of the defense mechanism.

The marine lysozymes characterized to date (Fletcher and White, 1976; McHenery and Birkbeck, 1982; Jollès and Jollès, 1984; Viana and Raa, 1992) have a specific activity outside the range of activity found in hen egg lysozyme and other terrestrial lysozymes, since the former present activity under more extreme environmental parameters, such as pH and temperature, among others. Since lysozymes, like all evolving proteins, present special strategies to adapt to different environments, they have acquired diverse characteristics or abilities (Jollès *et al.*, 1965). If we consider that 90% of the total volume of water in the marine environment is below 5°C (Gounot, 1991) and that there are marine organisms that live in extreme conditions of salinity, pH or temperature, we can assume a wide variety of environments and, therefore, organisms that have adapted to them.

The clam *Tivela stultorum* is a bivalve mollusk endemic to the sandy beaches of Baja California, Mexico. For years it has been caught for human consumption. Only the adductor muscle is used; the viscera, where the lysozyme is found, is discarded.

This study describes the isolation and properties of an enzyme that is found in the viscera of the clam *T. stultorum* from the coasts of Baja California.

MATERIALS AND METHODS

Clams

Specimens of *T. stultorum* were obtained from Bahía San Ignacio, Baja California Sur, Mexico, and transported live to the Instituto de

MATERIALES Y MÉTODOS

Almejas

Los ejemplares de *T. stultorum* obtenidos de Bahía San Ignacio, Baja California Sur, México, fueron transportados vivos al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC) en donde se disectaron. Los estiletes cristalinos, después de su extracción, se mantuvieron en hielo para su inmediata utilización en el laboratorio.

Purificación de la lisozima

Un grupo de 120 estiletes (37.16 g) fue homogeneizado 1:3 (v/v) en una solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08M (amortiguador de extracción) con un pH de 5.8, en un homogeneizador de tejidos (Eberbach 7265). Al extracto se le adicionó 10% de NaCl antes de ser centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos. El precipitado fue retirado y el sobrenadante se dializó contra la misma solución amortiguadora durante cinco horas a 4°C, con recambios continuos de amortiguador. La muestra fue aplicada a una columna de 70 cm de largo por 2.5 cm de ancho, que contenía resina de intercambio catiónico (carboximetil celulosa, Sigma Chemicals Co.) tratada con NaOH 0.5 N y HCl 0.5 N previo a su equilibrio con un amortiguador de citrato fosfato 0.04M, pH 5.8. La resina se lavó con la misma solución amortiguadora hasta que ningún rastro de proteína se detectó mediante el espectrofotómetro a una absorción de 280 nm. El material absorbido fue eluido con NaCl 1M adicionado al amortiguador de citrato fosfato, formando un gradiente lineal (0–1M). Se recolectaron fracciones de 3 mL durante la aplicación de la muestra, el lavado y la elución a una razón de 0.23 mL/min ó 13.9 mL/h en un colector de fracciones automático (Pharmacia LKB Fracc

Investigaciones Oceanológicas of the Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC) for dissection. The crystalline styles were extracted and kept on ice for their immediate use in the laboratory.

Lysozyme purification

A group of 120 crystalline styles (37.16 g) was homogenized in 1:3 (v/v) phosphate-citrate buffer solution, 0.08 M (extraction buffer), pH 5.8, in a tissue homogenizer (Eberbach 7265). Ten percent NaCl was added to the extract before being centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. The precipitate was removed and the supernatant was dialyzed against the same buffer solution for five hours at 4°C with continuous buffer exchanges. The sample was applied to a column 70 cm long by 2.5 cm wide that contained cation exchange resin (carboxymethyl cellulose, Sigma Chemicals Co.), treated with NaOH 0.5 N and HCl 0.5 N prior to its equilibrium with a phosphate-citrate buffer 0.04 M, pH 5.8. The resin was washed with the same buffer solution until no trace of protein was detected with the spectrophotometer at 280 nm absorbance. The absorbed matter was eluted with NaCl 1 M added to the phosphate-citrate buffer, forming a linear gradient (0–1M). Fractions of 3 mL were collected during the application of the sample. They were washed and eluted at a rate of 0.23 mL/min or 13.9 mL/h in an automatic fraction collector (Pharmacia LKB Fracc 100). The fractions that contained peak lysozyme activity were pooled and dialyzed for a second chromatography of ionic exchange under the same conditions. Chromatographs of molecular exclusion were also made in conventional columns with G-50 resin and in pre-packaged Bio-Spin (Bio-Rad) minicolumns. The protein content of the groups of fractions with activity was estimated spectrophotometrically with the modified method of Lowry (Stoscheck, 1990),

100). Las fracciones que contenían el máximo de actividad de lisozima fueron agrupadas y dializadas para una segunda cromatografía de intercambio iónico bajo las mismas condiciones. También se efectuaron cromatografías de exclusión molecular en columnas convencionales con resina G-50 y en minicolumnas Bio-Spin preempacadas (Bio-Rad). El contenido de proteína de los grupos de fracciones con actividad fue estimado espectrofotométricamente por el método de Lowry modificado (Stoscheck, 1990), utilizando albúmina de suero de bovino (ASB) como referencia, en donde la proteína es reportada como proteína equivalente a ASB/g de estilete.

Análisis enzimático

La actividad enzimática de la lisozima se determinó mediante el método descrito por Bratlid (1977), empleando lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) como referencia (McHenery *et al.*, 1979). Dicho método está basado en una medida espectrofotométrica de la clareación (transparencia) de una suspensión turbia de *Micrococcus lysodeikticus* y consiste en adicionar 25 μ L de la solución problema a tubos que contienen 75 μ L de agua y 3 mL de una suspensión de células liofilizadas muertas. Dicho sustrato es preparado mediante la suspensión de 0.2 mg/mL de células liofilizadas en una solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08M, pH 5.8. Después de mezclar dicha suspensión con la solución problema, las muestras son incubadas a 37°C durante 30 minutos antes de leer la transmisión en un espectrofotómetro a 570 nm.

La actividad específica de la lisozima de *T. stultorum* y de clara de huevo de gallina se calculó mezclando la solución problema con la suspensión de *M. lysodeikticus*, estimando el cambio en transmisión cada 30 segundos durante los primeros tres minutos de reacción. Bratlid (1977) establece como unidad

using bovine serum albumin (BSA) as reference, where protein is reported as the protein equivalent to BSA/g of crystalline style.

Enzymatic analysis

The enzymatic activity of the lysozyme was determined with the method described by Bratlid (1977), using hen egg-white lysozyme (Sigma) as standard (McHenery *et al.*, 1979). This method is based on a spectrophotometric measurement of the clearing (transparency) of a turbid suspension of *Micrococcus lysodeikticus*. It consists of adding 25 μ L of the test solution to tubes containing 75 μ L of water and 3 mL of killed, lyophilized cells. This substrate is prepared with the suspension of 0.2mg/mL of lyophilized cells in a phosphate-citrate buffer solution, 0.08 M, pH 5.8. After mixing this suspension with the test solution, the samples are incubated at 37°C for 30minutes before reading the transmission in a spectrophotometer at 570 nm.

The specific activity of the lysozyme of *T. stultorum* and of the hen egg-white was calculated by mixing the test solution with the suspension of *M. lysodeikticus* and estimating the change in transmission every 30 seconds during the first three minutes of reaction. Bratlid (1977) establishes an enzymatic unit as the quantity that produces a fall of 0.001 units per minute at a transmission of 570 nm under the conditions described above.

Molecular weight and isoelectric point

A one-dimensional electrophoresis was conducted on the samples that contained the greatest specific activity in dry minipolyacrylamide gels with SDS-PAGE to determine the molecular weight and isoelectric focusing (IEF-PAGE) in order to estimate the isoelectric point (pI), with Phast System (Pharmacia LKB Biotechnology). The pI was determined in

enzimática a la cantidad que produce la caída de 0.001 unidades por minuto a una transmisión de 570 nm bajo las condiciones descritas anteriormente.

Peso molecular y punto isoeléctrico

A las muestras que contenían la mayor actividad específica se les realizaron electroforesis de una dimensión en minigeles de poliacrilamida en seco, con SDS-PAGE para determinar el peso molecular (pM) e isoelectroenfoque IEF-PAGE para estimar el punto isoeléctrico (pI), mediante Phast System (Pharmacia LKB Biotechnology). El pI fue determinado en geles homogéneos de poliacrilamida (5%T, 3%C) con anfolitos acarreadores para generar gradientes de pH lineales, usando un Kit IEF-MI, de proteínas estándares. El gradiente utilizado fue de 5–9. Las pruebas electroforéticas para la determinación del peso molecular se llevaron a cabo en geles homogéneos de 12.5% y 20%, usando el kit MW-SDS-70L de proteínas estándares, con un rango de 14,000 a 70,000 daltons. Las tinciones para ambas determinaciones (pI y pM) fueron con azul de Coomassie.

Caracterización

pH óptimo

Se prepararon 10 soluciones amortiguadoras con el amortiguador de extracción, con pHs diferentes en un intervalo de 3.0 a 12.0 con incrementos unitarios. Las células de *M. lisodeikticus* fueron agregadas a cada una de las soluciones amortiguadoras con tres réplicas conteniendo un volumen de 3 mL, para obtener una concentración de 0.2 mg/mL. Se adicionaron 25 μ L de la solución problema y después de 30 minutos de incubación a 37°C los tubos fueron enfriados en hielo y se registró la transmisión a 570 nm en el espectrofotómetro. La actividad se relacionó con su respectivo

homogenous gels of polyacrilamide (5%T, 3%C) with carrier ampholytes to generate linear pH gradients, using a IEF-MI kit of standard proteins. The gradient used was 5–9. Molecular weight was determined electrophoretically in homogenous gels of 12.5% and 20%, using the MW-SDS-70L kit of standard proteins, with a range of 14,000 to 70,000 daltons. Coomassie brilliant blue was used to stain both pI and molecular weight.

Characterization

Optimum pH

Ten buffer solutions were made with the extraction buffer with different pHs ranging from 3.0 to 12.0 in unitary increments. Cells of *M. lisodeikticus* were added to each of the buffer solutions, with three replicates containing a volume of 3 mL, in order to obtain a concentration of 0.2 mg/mL; 25 μ L of the test solution were added, and after 30 minutes of incubation at 37°C the tubes were cooled on ice and the transmission at 570 nm in the spectrophotometer was recorded. Each activity was related to their respective maximum, which was taken to represent 100% activity.

Optimum temperature

The enzymatic solution of *T. stultorum* (25 μ L) was added to 3-mL suspensions containing the extraction buffer and cells of *M. lisodeikticus* (0.2 mg/mL). The tubes, in triplicate, were incubated at 17 different temperatures, ranging from 4°C to 85°C. The change in transmission at 570 nm was recorded after one hour of incubation, taking the maximum reading observed as 100% activity and relating the rest to their respective maximum. A suspension of the buffer with cells of *M. lisodeikticus* but without the enzymatic solution was used as blank.

máximo, el cual fue tomado como 100% de actividad.

Temperatura óptima

La solución enzimática de *T. stultorum* (25µL) fue adicionada a 3 mL de la suspensión que contenía el amortiguador de extracción y las células de *M. lisodeikticus* (0.2 mg/mL). Los tubos, por triplicado, fueron incubados a 17 diferentes temperaturas en un intervalo de 4°C a 85°C. Se registró el cambio de transmisión a 570 nm después de una hora de incubación, tomando como el 100% de actividad a la lectura máxima observada y el resto fue relacionado con respecto a su máximo. Una suspensión del amortiguador con las células de *M. lisodeikticus* sin la presencia de la solución enzimática fue utilizada como blanco.

Efecto de NaCl sobre la actividad enzimática

Diferentes concentraciones de NaCl fueron adicionadas a células liofilizadas (0.2 mg/mL) suspendidas en la solución amortiguadora de extracción, para obtener siete soluciones en un intervalo de 0.02 a 0.26 de concentración molar o de 0.1243 a 0.3646 de fuerza iónica. La actividad se estimó como se indicó anteriormente.

Molaridad óptima

Se prepararon 10 soluciones amortiguadoras de citrato fosfato, pH 5.8, en un intervalo de concentraciones molares de 0.02 a 0.26, a las cuales se le adicionaron 0.02 mg/mL de células liofilizadas. La actividad se realizó como se indicó anteriormente.

Estabilidad térmica

Alícuotas de 200 µL de la solución enzimática fueron suministradas a microtubos Eppendorf, los cuales fueron calentados

Effect of NaCl on enzymatic activity

Different concentrations of NaCl were added to the lyophilized cells (0.2 mg/mL) suspended in the extraction buffer solution in order to obtain seven solutions in an interval of 0.2 to 0.26 molar concentration or 0.1243 to 0.3646 ionic strength. Activity was estimated as indicated above.

Optimum molarity

Ten phosphate-citrate buffer solutions, pH5.8, were prepared in an interval of molar concentration of 0.02 to 0.26, to which 0.02mg/mL of lyophilized cells were added. Activity was estimated as indicated above.

Thermal stability

Aliquots of 200 µL of the enzymatic solution were placed in Eppendorf microtubes, which were heated for 10 and 30 minutes at 37°C, 45°C, 60°C and 90°C in a water bath. After the stability assay, the microtubes were cooled on ice and the enzymatic activity was determined in optimum conditions of pH and temperature, using the standard procedure (Bratlid, 1977). The remnant enzymatic activity obtained was related to the enzymatic activity of a sample kept on ice during the incubation period of the other samples in the water bath, which was taken to represent 100% activity. The determinations were made in triplicate.

Stability at different pHs

In Eppendorf microtubes, 250 µL of the enzymatic solution and 250 µL of the extraction buffer solution were added in an interval of 3 to 11. The microtubes were incubated at 4°C for 30 minutes and one hour. Activity was estimated as indicated above.

durante 10 y 30 minutos a 37°C, 45°C, 60°C y 90°C en un baño de agua. Al término del ensayo de estabilidad, los microtubos se enfriaron en hielo y se determinó la actividad enzimática en condiciones óptimas de pH y temperatura, por medio del procedimiento estándar (Bratlid, 1977). La actividad enzimática residual obtenida se relacionó con la actividad enzimática de una muestra mantenida en hielo durante el tiempo de incubación en baño de agua de las demás muestras, la cual fue tomada como el 100% de actividad. Las determinaciones fueron por triplicado.

Estabilidad a diferentes pHs

En microtubos Eppendorf se añadieron por triplicado 250 µL de solución enzimática y 250 µL de solución amortiguadora de extracción en un intervalo de 3 a 11. Los microtubos fueron incubados a 4°C durante 30 minutos y una hora. La actividad se realizó según se indicó anteriormente.

Pruebas bacterianas

Se determinó el efecto antibacteriano de la lisozima de huevo de gallina (LH), de la lisozima de la almeja *T. stultorum* (LT) y de la lisozima de la almeja ártica *Chlamys islandica* (LC) (Viana y Raa, 1992) sobre bacterias gram positivas y gram negativas, involucradas en la descomposición de comida y enfermedades en organismos marinos, por medio de mediciones de actividad mediante una modificación de la técnica de agar en plato (lisoplato) descrita por Lie *et al.* (1986).

Ensayo

Cada cepa bacteriana fue adicionada a una solución esterilizada de gel agarosa al 1% en un amortiguador de citrato fosfato 0.08M, pH 5.6, a una temperatura de 40°C a 50°C. La solución

Bacterial tests

The antibacterial effect was determined for the hen egg lysozyme (Sigma) (LH), lysozyme of the clam *T. stultorum* (LT) and lysozyme of the scallop *Chlamys islandica* (LC) (Viana and Raa, 1992) over gram-positive and gram-negative bacteria involved in the decomposition of food and disease in marine organisms, using the activity measurements with the modified lisoplate technique described by Lie *et al.* (1986).

Assay

Each bacterial strain was added to a sterile solution of 1% agarose gel in a phosphate-citrate buffer, 0.08 M, pH 5.6, at a temperature of 40–50°C. The solution was mixed and 20mL were added on top of each petri dish, which were left to gel for 30 minutes at room temperature. In each petri dish, six wells of 3mm diameter were bored and 35 µL of the test solution were added. The plates were incubated at 37°C in a humidity chamber for 24hours, after which time the clear zone was measured with a vernier and related to the inhibition.

Preparation of the bacterial strains

The bacterial species tested were *M. lisodeikticus* and *Streptococcus alfa* for the gram-positive bacteria, and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putrefaciens* and *Vibrio parahaemolyticus* for the gram-negative bacteria, all of which were provided by IIO-UABC and cultivated in rich medium until reaching the late exponential phase.

The enzymatic test solutions were:

- Hen egg-white lysozyme (Sigma), with and without EDTA (LH).

fue mezclada y 20 mL se adicionaron a cada caja de petri, las cuales se dejaron gelificar durante 30 minutos a temperatura ambiente. En cada caja de petri se realizaron seis pozos de 3 mm de diámetro, mediante un cardador conectado a una bomba de vacío manual. En cada pozo se agregaron 35 µL de solución de prueba; las placas fueron incubadas a 37°C en una cámara húmeda durante 24 horas, después de los cuales fueron medidos los halos de inhibición con un vernier.

Preparación de las cepas bacterianas

Las especies bacterianas probadas fueron *Micrococcus lisodeikticus* y *Streptococcus alfa* para el grupo de las bacterias gram positivas, y *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putrefaciens* y *Vibrio parahaemolyticus* para el grupo de bacterias gram negativas, todas ellas proporcionadas por el IIO-UABC y cultivadas en medio enriquecedor, hasta alcanzar la fase exponencial tardía.

Las soluciones enzimáticas de prueba fueron:

- Lisozima pura de clara de huevo de gallina (Sigma) con y sin EDTA (LH).
- Extracto crudo de estiletes cristalinos de la almeja *T. stultorum* con y sin EDTA (LT).
- Extracto crudo de estiletes cristalinos de la almeja *C. islandica* con y sin EDTA (LC).

Las soluciones de prueba utilizadas fueron ajustadas a 147 U/mL con referencia a la actividad específica mostrada hacia *M. lisodeikticus*, con una concentración de 0.0382, 12.41 y 1.33mg/mL para LH, LT y LC, respectivamente. Cada solución de prueba se estabilizó con el 1% de albúmina de suero de bovino (ASB) disuelta en el amortiguador óptimo según la enzima: para LH se utilizó amortiguador de fosfatos 0.07M, pH 6.2; para LT se

- Crude extract of crystalline styles of the clam *T. stultorum*, with and without EDTA (LT).
- Crude extract of the crystalline styles of the scallop *C. islandica*, with and without EDTA (LC).

The test solutions used were adjusted to 147 U/mL with reference to the specific activity shown towards *M. lisodeikticus*, with a concentration of 0.0382, 12.41 and 1.33mg/mL for LH, LT and LC, respectively. Each test solution was stabilized with 1% bovine serum albumin (BSA) dissolved in the optimum buffer according to the enzyme: a phosphate buffer, 0.07 M, pH 6.2, was used for LH; a phosphate-citrate buffer, 0.08 M, pH 5.8, for LT; and a phosphate buffer, 0.1 M, pH 5.20, for LC. The test concentration of EDTA was 5mM.

Statistical analysis

In order to determine the differences among treatments during an incubation period, the data obtained from the tests of thermal stability and stability with respect to pH were subjected to a one-way analysis of variance. Student's *t*-test was used to determine possible significant differences among incubation periods. A one-way analysis of variance was carried out on the bacterial tests for the treatments without EDTA, as well as for the treatments with EDTA. Student's *t*-test was also used to detect differences among each lysozyme and their respective mixing with EDTA.

Student-Newman-Keuls multiple comparison tests were conducted among treatments. The nonparametric tests used were the Kruskal-Wallis ranked one-way analyses of variance, and Student's *t* with the Mann-Whitney ranked sums test.

utilizó amortiguador de citrato fosfato 0.08M, pH 5.8; y para LC se utilizó amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 5.20. La concentración de prueba del EDTA fue de 5 mM.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas de estabilidad térmica y estabilidad con respecto al pH fueron sometidos a una prueba de análisis de varianza de una vía para observar diferencias entre tratamientos a un tiempo de incubación. Una prueba *t* de Student se realizó para determinar posibles diferencias significativas entre los tiempos de incubación. En las pruebas bacterianas se realizaron análisis de varianza de una vía para los tratamientos con ausencia de EDTA, así como para los tratamientos con presencia de EDTA. Una prueba *t* de Student se utilizó para detectar diferencias entre cada lisozima y su respectiva mezcla con EDTA.

Posteriormente, entre los tratamientos, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples mediante el método de Student-Newman-Keuls. Las pruebas no paramétricas utilizadas fueron análisis de varianza de una vía en rangos mediante el método de Kruskal-Wallis y la prueba *t* de Student no paramétrica mediante la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney.

RESULTADOS

El perfil de elución obtenido de la purificación mediante intercambio iónico se muestra en las figuras 1 y 2. En la primera cromatografía se obtuvo un componente con actividad enzimática, el cual fue dividido en dos grupos: uno denominado Ia que contenía las fracciones 257–270, las cuales formaban parte de un pico con alta concentración de proteína; y otro denominado Ib formado por las fracciones 271–308, con un pico de menor concentración de proteína. El grupo Ia presentó una actividad específica de 4192.63 U/mg y el grupo Ib, de

RESULTS

The elution profile obtained for the purification with ionic exchange is shown in figures 1 and 2. A component with enzymatic activity was obtained in the first chromatography, which was divided into two groups: one labeled Ia that had the fractions 257–270, which formed part of a peak of high protein concentration; and the other labeled Ib, formed by fractions 271–308, with a peak of low protein concentration. The Ia group had a specific activity of 4192.63 U/mg and the Ib group, of 5805.45 U/mg (table 1). Both groups were dialyzed and rechromatographed. The resulting chromatographs of the Ia group did not show an increase in the degree of purification, since a series of bands of close molecular weights were shown with electrophoretic tests (results not reported). The rechromatography of the Ib group resulted in two components with an absorption of 280 nm and similar protein concentrations. The maximum activity observed was found in six fractions (111–116) of the zone of lowest protein concentration, between components one and two, slightly covering the first, while the second component did not present enzymatic activity. The group of fractions with activity was labeled IIa (fig. 2). The fractionation sequence of the purification is shown in table 1.

With this procedure, 0.0202 mg of protein with high enzymatic activity was obtained per gram of style, with a total yield of 2.7% (table 1). The specific activity of the extract with greatest purity was 25,407.9 units per milligram of protein (U/mg), corresponding to a purification of 100 times compared with the crude extract.

LT was purified according to the results of the isoelectric focusing, which showed a principal protein band with an isoelectric point of 7.7 (table 2). The electrophoresis of SDS-PAGE showed a principal protein band

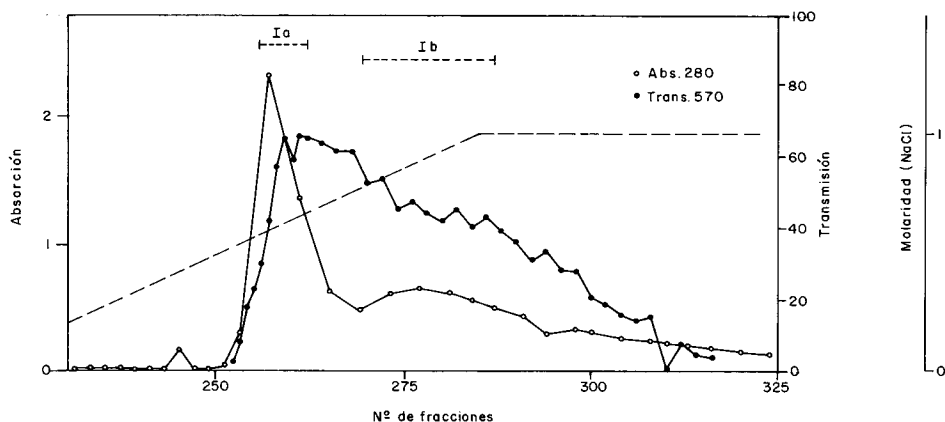


Figura 1. Cromatografía No. 1 de intercambio iónico (CM-celulosa), con un gradiente de elución de 0 a 1M de NaCl. El contenido de proteína fue medido por absorción a 280 nm. La actividad de la lisozima se determinó con *Micrococcus lisodeikticus* (transmisión a 570 nm). El grupo Ib representa las fracciones con mayor actividad relativa por miligramo de proteína.

Figure 1. Chromatography No. 1 of ionic exchange (CM-cellulose), with an elution gradient of 0 to 1 M of NaCl. Protein content was measured by absorption at 280 nm. Lysozyme activity was determined with *Micrococcus lisodeikticus* (transmission at 570 nm). Group Ib represents the fractions with greater relative activity per milligram of protein.

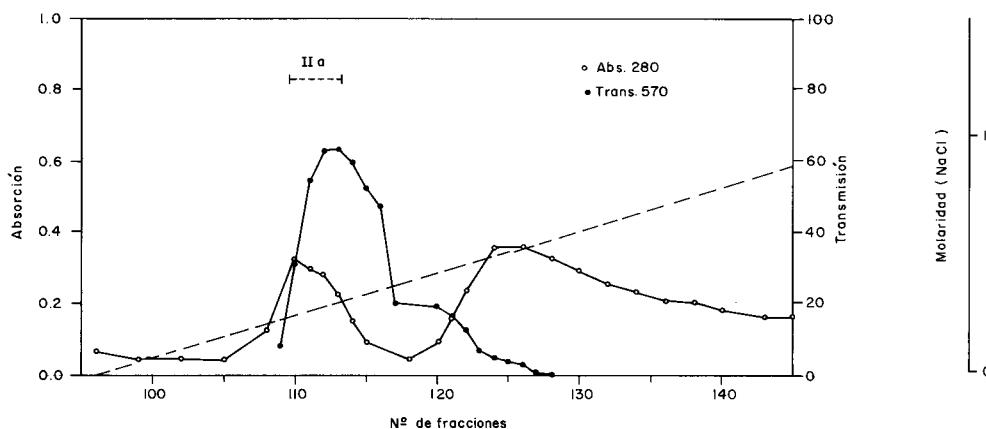


Figura 2. Cromatografía No. 2 de intercambio iónico (CM-celulosa) obtenida a partir del grupo Ib (cromatografía No. 1), con un gradiente de elución de 0 a 1 M de NaCl. El contenido de proteína fue medido por absorción a 280 nm. La actividad de la lisozima se determinó con *Micrococcus lisodeikticus* (transmisión a 570 nm). El grupo IIa fue separado para futuros análisis.

Figure 2. Chromatography No. 2 of ionic exchange (CM-cellulose) obtained from group Ib (chromatography No. 1), with an elution gradient of 0 to 1 M of NaCl. Protein content was measured by absorption at 280 nm. Lysozyme activity was determined with *Micrococcus lisodeikticus* (transmission at 570 nm). Group IIa was separated for future analyses.

Tabla 1. Secuencia de fraccionación para la purificación de la lisozima de la almeja *Tivela stultorum*.
Table 1. Fractionation sequence for the purification of the lysozyme of the clam *Tivela stultorum*.

	Volumen total (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Prot. total (mg)	Activ. esp. (U/mg)	Lisozima (mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	181.0	15.7	2839.5	253.8	216.90	“1.00”	“100.0”
Ia	29.5	1.8	52.2	4,192.6	0.073	16.5	30.4
Ib	118.0	0.3	30.7	5,805.5	0.0247	22.9	24.7
IIa	3.3	0.6	0.8	25,407.9	0.000016	100.1	2.7

5805.45 U/mg (tabla 1). Ambos grupos fueron dializados y recromatografiados, y los resultados cromatográficos del grupo Ia no mostraron un aumento en el grado de purificación, ya que mediante pruebas electroforéticas se presentaron una serie de bandas de pesos moleculares cercanos (resultados no mostrados). La recromatografía del grupo Ib resultó en dos componentes con absorción a 280 nm, de similar concentración de proteínas. La actividad máxima observada se encontró en seis fracciones (111–116) de la zona de menor concentración proteica, entre el componente uno y dos, cubriendo ligeramente parte del primero, mientras que el segundo componente no presentó actividad enzimática. Al grupo de fracciones con actividad se le denominó IIa (fig. 2). La secuencia de fraccionación de la purificación es mostrada en la tabla 1.

Con dicho procedimiento se obtuvieron 0.0202 mg de proteína con alta actividad enzimática por gramo de estilete, con un rendimiento total del 2.7% (tabla 1). La actividad específica del extracto con mayor pureza fue de 25,407.9 unidades por miligramo de proteína (U/mg), correspondiendo a una purificación de 100 veces comparada con el extracto crudo.

La LT fue purificada según los resultados del isoelectroenfoque, que mostraron una

followed by three bands of greater molecular weight (results not shown). The approximate molecular weight of the principal band was 17.0 kDa (table 2) and 21.5, 25.1 and 31.6 kDa for the other bands.

Optimum conditions of activity and stability of the lysozyme of *T. stultorum*

LT presented maximum activity in the phosphate-citrate buffer, 0.08 M, pH 5.5–5.8, with an almost complete loss of activity at pH 7.7, whereas at pH 2.8, it presented 24.3% activity (table 2, fig. 3).

Its stability was significantly greater at acidic pHs at 30 minutes (K-W, $H = 27.3$, d.f. = 9, $P = 0.0012$), as well as at 60 minutes ($F = 532.4$, d.f. = 9, $P < 0.0001$), with percentages of activity greater than 90% for pHs ranging from 3.8 to 7.8 at 30 minutes of incubation, and for pHs ranging from 3.8–6.8 at 60 minutes. The enzyme showed 63% activity at pH 12, and showed between 87% and 89% remnant activity after 30 and 60 minutes of incubation, respectively, at pH 2.8. With the exception of pH 8.8, no significant differences were observed for incubations between 30 and 60 minutes (Student's *t*-test); however, this should be taken with caution since the tests for

banda proteica principal, con un punto isoeléctrico de 7.7 (tabla 2). Las electroforesis de SDS-PAGE mostraron una banda proteica principal seguida de tres bandas de pesos moleculares mayores (resultados no mostrados). El peso molecular aproximado de la banda principal fue de 17.0 kDa (tabla 2) y de las otras bandas, de 21.5, 25.1 y 31.6 kDa.

Condiciones óptimas de actividad y estabilidad de la lisozima de *T. stultorum*

La LT presentó su máxima actividad en un amortiguador de citrato fosfato 0.08M, a un pH de 5.5 a 5.8, con una pérdida casi completa de actividad a pH de 7.7, mientras que a pH de 2.8 permaneció con un 24.3% de actividad (tabla 2, fig. 3).

Su estabilidad fue significativamente mayor a pHs ácidos a los 30 minutos (K-W, $H = 27.3$, g.l. = -9, $P = 0.0012$), así como a los 60 minutos ($F = 532.4$, g.l. = 9, $P < 0.0001$), con porcentajes de actividad mayores que 90% para pHs en el intervalo de 3.8 a 7.8 a los 30 minutos de incubación, y para pHs en el intervalo de 3.8 a 6.8 a los 60 minutos de incubación. La enzima conservó un 63% de actividad con un pH de 12, después de 60 minutos, y presentó entre el 87% y 89% de actividad residual después de haberse incubado durante 30 y 60 minutos, respectivamente, a pH de 2.8. A excepción del pH 8.8, no se observaron diferencias significativas para incubaciones entre 30 y 60 minutos (prueba t de Student); sin embargo, este resultado debe tomarse con reserva ya que las pruebas para los pHs 2.8, 4.8, 5.8 y 6.8 mostraron valores de potencia menores que 0.8 (fig. 4).

La concentración molar óptima del amortiguador fue de 0.1M, mostrada en la figura 5, dando un porcentaje creciente de actividad entre 70% y 100%, con una molaridad de 0.03 a 0.1, mientras se observa una caída de 20% a una concentración de 0.12M.

pH 2.8, 4.8, 5.8 and 6.8 showed power values lower than 0.8 (fig. 4).

The optimum molar concentration of the buffer was 0.1 M, shown in figure 5, indicating an increase in activity between 70% and 100%, with a molarity of 0.03 to 0.1, but there is a 20% drop at a concentration of 0.12 M.

The maximum activity obtained (100%) occurred in the absence of NaCl at an ionic strength of 0.1043, corresponding to 0.08 M in the reaction buffer (table 2). The enzyme showed a decrease in activity as ionic strength increased with the addition of greater molar concentrations of NaCl (fig. 6). An activity of 3.6% was observed at an ionic strength of 0.3643 in the reaction buffer.

Figure 7 shows the activity of the lysozyme incubated at different temperatures with 100% activity at 40°C, a minimum of 10.9% at 85°C and 26.7% at 4°C. LT proved more stable at temperatures ranging from 37°C to 60°C for both incubation times, with a percentage of activity of 95% to 97%. No significant differences were observed at 10 minutes of incubation between 37°C and 90°C, with activity from 94% to 96%, but they were between 45–90°C and 60–90°C ($F = 8.52$, d.f. = 3, $P = 0.0139$). At 30 minutes of incubation, no significant differences were observed between 37–60°C and 45–60°C, but they were at 90°C ($F = 34.7$, d.f. = 3, $P = 0.0009$), with a remnant activity of 86%. Student's t -test showed significant differences between the 10- and 30-minute incubations, except for 37°C and 60°C; however, this test showed a power lower than 0.8 (fig. 8).

Bacterial tests

LT and LC with and without 5 mM of EDTA proved effective in the lysis of three (*S. alfa*, *M. lisodeikticus* and *E. coli*) of the six species of bacteria examined. LH only showed lysis with 5 mM of EDTA for *S. alfa* and *E. coli* (tables 3, 4).

Tabla 2. Características de la lisozima de la almeja *Tivela stultorum*.

Table 2. Characteristics of the lysozyme of the clam *Tivela stultorum*.

Peso molecular	17.0 kDa
Punto isoeléctrico	7.7
pH óptimo	5.5–5.8
Temperatura óptima	40°C
Molaridad óptima del amortiguador citrato fosfato	0.1 M
Fuerza iónica de máxima actividad	0.1043*
Actividad a 4°C	26.7%
Actividad a 85°C	10.4%
Actividad a pH de 2.8	24.3%
Rango de estabilidad a diferentes pHs a 4°C	2.8–7.8
Actividad específica en relación con la lisozima de huevo de gallina	6 veces mayor

* Cantidad equivalente a 0.08 M amortiguador citrato fosfato.

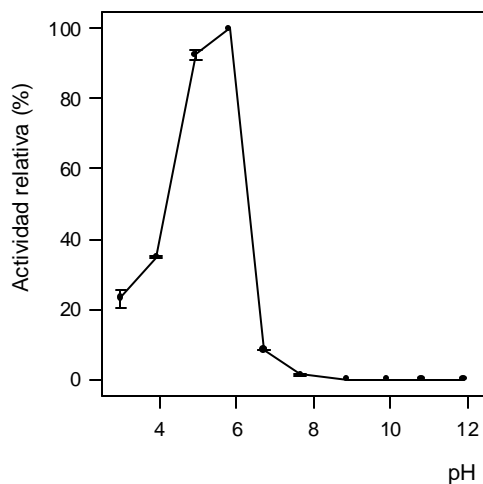


Figura 3. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función del pH. El 100% de actividad se consideró la actividad máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio (temperatura = 37°C, molaridad = 0.08).

Figure 3. Relative remnant activity of the lysozyme of *Tivela stultorum* in terms of pH. The maximum activity observed was taken as 100% activity. The standard error is indicated for each of the mean values (temperature = 37°C, molarity = 0.08).

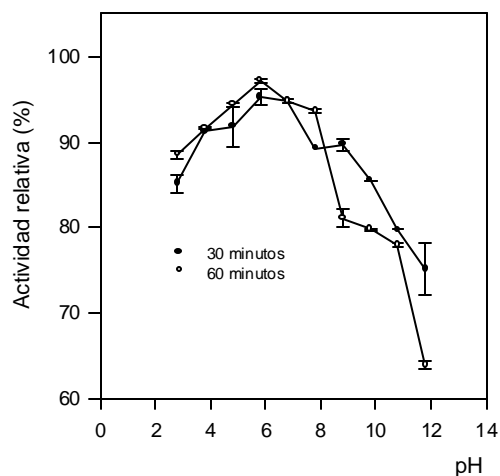


Figura 4. Estabilidad de la lisozima de *Tivela stultorum* en función del pH, después de haber sido incubada durante 30 y 60 minutos a 4°C. El 100% de actividad se tomó como la actividad máxima observada bajo condiciones óptimas. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.
Figure 4. Stability of the lysozyme of *Tivela stultorum* in terms of pH after incubation for 30 and 60 minutes at 4°C. The maximum activity observed under optimum conditions was taken as 100%. The standard error is indicated for each of the mean values.

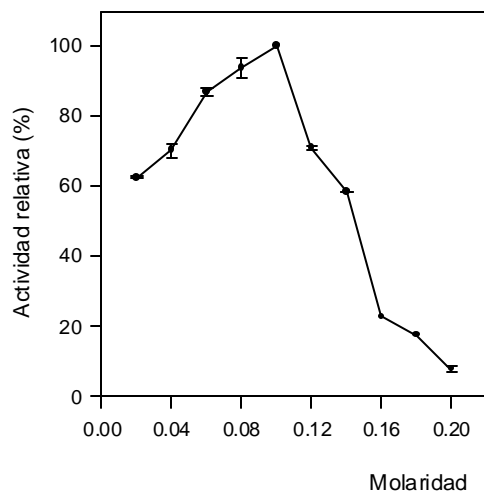


Figura 5. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la concentración molar; el 100% de actividad se refiere a la máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio (temperatura = 37°C, pH = 5.8).
Figure 5. Relative remnant activity of the lysozyme of *Tivela stultorum* in terms of molar concentration. The maximum activity observed was taken as 100%. The standard error is indicated for each of the mean values (temperature = 37°C, pH = 5.8).

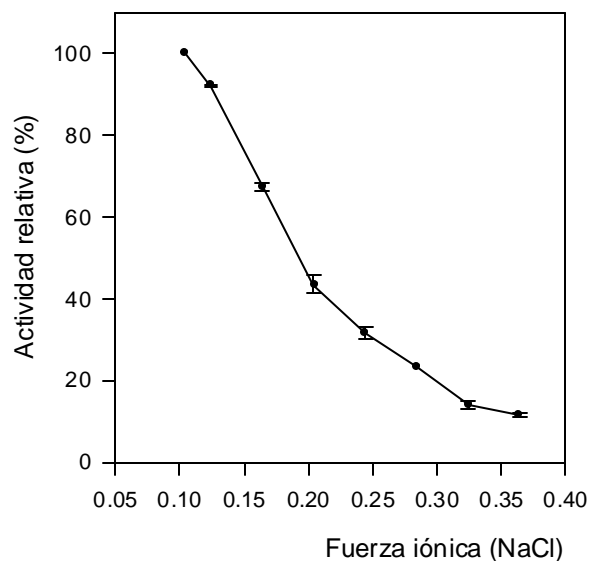


Figura 6. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la fuerza iónica, tomando como 100% de actividad a la máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio (temperatura = 37°C, molaridad = 0.08, pH = 5.8).

Figure 6. Relative remnant activity of the lysozyme of *Tivela stultorum* in terms of ionic strength. The maximum activity observed was taken as 100% activity. The standard error is indicated for each of the mean values (temperature = 37°C, molarity = 0.08, pH = 5.8).

La actividad máxima obtenida (100%) se presentó en ausencia de NaCl a una fuerza iónica de 0.1043, correspondiente a 0.08M en el amortiguador de reacción (tabla 2). La enzima presentó una disminución de actividad conforme el incremento de fuerza iónica al adicionar concentraciones molares mayores de NaCl (fig. 6). Un 3.6% de actividad se observó a una fuerza iónica de 0.3643 en el amortiguador de reacción.

La figura 7 muestra la actividad de la lisozima incubada a diferentes temperaturas con un 100% de actividad a 40°C, un mínimo de 10.9% a 85°C y 26.7% a 4°C. La LT mostró ser más estable a temperaturas en un rango de 37°C a 60°C para ambos tiempos de incubación, con un porcentaje de actividad del 95% al 97%; a los 10 minutos de incubación no se

In the lysis of cells of *S. alfa*, the treatments of the lysozymes with 5 mM of EDTA (table 5) were significantly different ($F = 420.1$, d.f. = 2, $P < 0.0001$). The highest value corresponded to the mixture of LT with EDTA, with a mean of 24.5, followed by the mixture of LH with EDTA, with a value of 15.5, and the mixture of LC with EDTA, with 13.2. The lysozyme treatments without EDTA were also significantly different (K-W, $H = 26.8$, d.f. = 2, $P < 0.0001$). The highest value was for LT, with a mean of 23.3, followed by LC, with 11.2, and LH, with 0, because it did not show a clear zone.

The effect of the lysozymes towards the lysis of *E. coli* was significantly different with and without EDTA (table 5) (M-W, $T = 55$, $P = 0.00$; $t = 4.65$, d.f. = 18, $P = 0.0002$; $t = -2.79$, d.f. = 18, $P = 0.0122$), with higher mean values

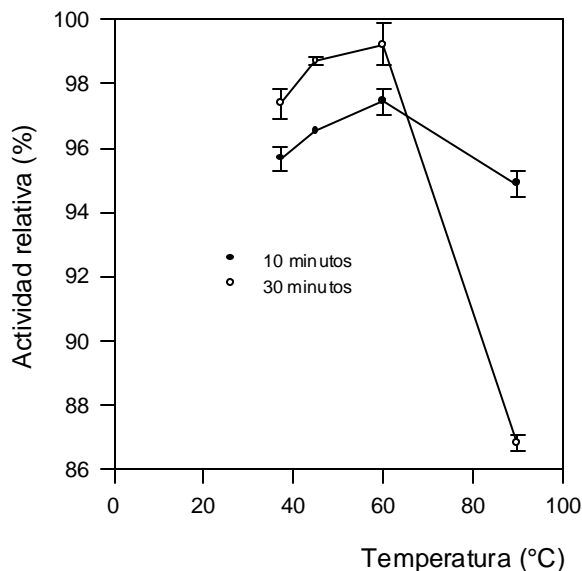


Figura 7. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la temperatura, tomando como 100% a la actividad máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio (pH = 5.8, molaridad = 0.08).

Figure 7. Relative remnant activity of the lysozyme of *Tivela stultorum* in terms of temperature. The maximum activity observed was taken as 100%. The standard error is indicated for each of the mean values (pH = 5.8, molarity = 0.08).

observaron diferencias significativas entre 37°C y 90°C, con actividades de 94% a 96%, pero sí entre 45–90°C y 60–90°C ($F = 8.52$, g.l. = 3, $P = 0.0139$). En las incubaciones de 30 minutos no se observaron diferencias significativas entre 37–60°C y 45–60°C, pero sí a 90°C ($F = 34.7$, g.l. = 3, $P = 0.0009$), con una actividad residual de 86%. La prueba t de Student mostró diferencias significativas entre las incubaciones de 10 y 30 minutos, excepto para los 37°C y 60°C; sin embargo, esta prueba mostró una potencia menor que 0.8 (fig. 8).

Pruebas bacterianas

LT y LC, en presencia y ausencia de 5 mM de EDTA, mostraron ser efectivas en la lisis de

for the lysozymes with EDTA. The treatments of LT, LC and LH showed significant differences (K-W, $H = 2.68$, d.f. = 2, $P < 0.0001$) in the lysis of *E. coli* cells, where the treatment of LT showed a mean of 16.3, which was greater than that for the treatment of LC, of 13.0. The treatments with EDTA also showed significant differences ($F = 122.8$, d.f. = 2, $P < 0.0001$). The highest value obtained was for the treatment of LT, with 21.4, while there were no significant differences between the LC and LH treatments, with mean values of 12.9 and 13.7, respectively.

The results from mixing lysozymes with EDTA for the LT and LH treatments were significantly different from the effect shown for the lysozyme alone against *E. coli* bacteria,

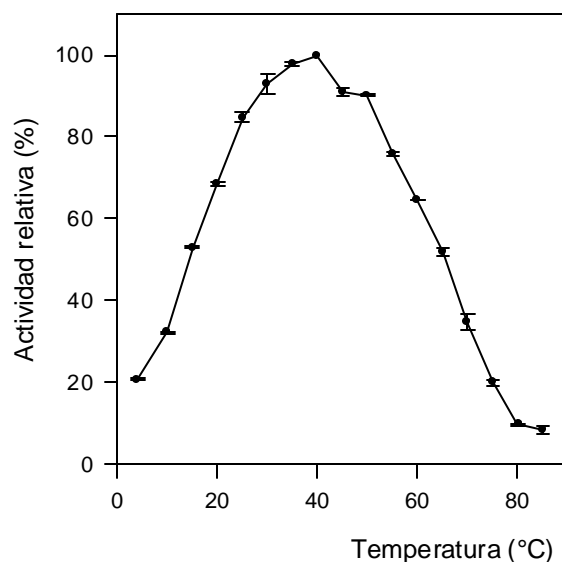


Figura 8. Estabilidad de la lisozima de *Tivela stultorum* durante 10 y 30 minutos, tomando como 100% de actividad la máxima observada bajo condiciones óptimas. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.

Figure 8. Stability of the lysozyme of *Tivela stultorum* during 10 and 30 minutes, taking the maximum activity observed under optimum conditions as 100%. The standard error is indicated for each of the mean values.

tres (*S. alfa*, *M. lisodeikticus* y *E. coli*) de las seis especies de bacterias examinadas. La LH solamente mostró lisis en presencia de 5 mM de EDTA para *S. alfa* y *E. coli* (tablas 3, 4).

En la lisis de células de *S. alfa*, los tratamientos de las lisozimas en presencia de 5 mM de EDTA (tabla 5) fueron significativamente diferentes ($F = 420.1$, g.l. = 2, $P < 0.0001$); el valor más alto correspondió a la mezcla de LT con EDTA con una media de 24.5, seguida por la mezcla de LH con EDTA con un valor de 15.5 y de 13.2 para la mezcla de LC con EDTA. Los tratamientos de lisozima en ausencia de EDTA también fueron significativamente diferentes (K-W, $H = 26.8$, g.l. = 2, $P < 0.0001$); el valor más alto fue para la LT con 23.3 de media, seguido por la LC con 11.2

whereas there were no significant differences between LC alone and its mixture with EDTA (Student's *t* M-W, $T = 55$, $P = 0.00$, $T = 55$, $P = 0.00$, $t = -1.60$, d.f. = 18, $P = 0.1280$); however, the latter should be taken with caution since it presents a power of 0.2055.

DISCUSSION

The differences that characterize the lysozyme-like enzymes have lead to the use of various methods of extraction (McHenry and Birkbeck, 1979; Grinde *et al.*, 1988; Viana and Raa, 1992). The method used here provided a purification 100 times greater with respect to the crude extract, obtaining 20.2 μg of protein with high enzymatic activity per gram of style.

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza de una vía (no paramétrico y paramétrico) realizado por el efecto de lisis entre las lisozimas de *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* y huevo de gallina (LT, LC y LH, respectivamente) en presencia y ausencia de EDTA hacia las bacterias *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli*. *F* es la prueba estadística que se indica para el análisis paramétrico y *H* es la prueba estadística que se indica para el análisis no paramétrico.

Table 3. Results of the one-way analysis of variance (nonparametric and parametric) on the effect of lysis among lysozymes of *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* and hen egg (LT, LC and LH, respectively) with and without EDTA towards the bacteria *Streptococcus alfa* and *Escherichia coli*. *F* is the statistical test indicating the parametric analysis and *H*, the statistical test indicating the nonparametric analysis.

Fuente de variación	g.l.	<i>F</i>	<i>H</i>	<i>P</i>
Lisozimas sin EDTA				
<i>S. alfa</i>	2	–	26.8	<0.0001
<i>E. coli</i>	2	–	26.8	<0.0001
Lisozimas con EDTA				
<i>S. alfa</i>	2	420.1	–	<0.0001
<i>E. coli</i>	2	122.8	–	<0.0001
Pruebas a posteriori de comparaciones múltiples				
	LT	LC	LH	Conclusión
Actividad sin EDTA				
<i>S. alfa</i>	23.3	11.23	0	LT ≠ LC ≠ LH
<i>E. coli</i>	16.3	12.96	0	LT ≠ LC ≠ LH
Actividad con EDTA				
<i>S. alfa</i>	24.5	13.4	15.7	LT ≠ LC ≠ LH
<i>E. coli</i>	21.8	13.3	13.5	LT ≠ LC = LH

y, finalmente, la LH con valor de cero, ya que no mostró halo inhibitorio.

El efecto de las lisozimas hacia la lisis de *E. coli* fue significativamente diferente en presencia y ausencia de EDTA (tabla 5) (M-W, $T = 55$, $P = 0.00$; $t = 4.65$, g.l. = 18, $P = 0.0002$; $t = -2.79$, g.l. = 18, $P = 0.0122$), con valores de medianas más altos para las lisozimas en presencia de EDTA. Los tratamientos de LT, LC y LH mostraron diferencias significativas (K-W, $H = 2.68$, g.l. = 2, $P < 0.0001$) en la lisis a

This amount is not high considering that the style is a rich source of lysozyme (McHenery and Birkbeck, 1979), but the amount can vary depending on the nutritional state of the clams at the time of dissection. However, if we take into account that the specific activity for the pure fraction was 25,408,000 U/mg and 253.8U/mg for the original homogenate, then we could expect 762.37 µg of pure lysozyme in one gram of style. Based on this, it can be said that the yield obtained in this study was low,

Tabla 4. Comparación entre medianas para detectar el efecto lítico de las lisozimas de *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* y huevo de gallina (LT, LC y LH, respectivamente) en presencia o ausencia de EDTA, para cada bacteria, *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli*. Análisis de dos muestras (Mann-Whitney).

Table 4. Comparison of means to determine the lytic effect of lysozymes of *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* and hen egg (LT, LC and LH, respectively) with and without EDTA for *Streptococcus alfa* and *Escherichia coli*. Analysis of two samples (Mann-Whitney).

Tratamientos	Sin EDTA vs EDTA	T	P
<i>S. alfa</i>			
LT	23.3 vs 24.5	72	0.0156
LC	11.2 vs 13.2	59	<0.0001
LH	0.0 vs 15.5	55	<0.0001
<i>E. coli</i>			
LT	16.3 vs 21.4	55	<0.0001
LC	13.0 vs 12.9	92	0.345
LH	0.0 vs 13.7	55	<0.0001

Tabla 5. Comparación entre medianas para detectar el efecto lítico de las lisozimas de *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* y huevo de gallina (LT, LC y LH, respectivamente) entre las bacterias *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli* en presencia y ausencia de EDTA. Análisis entre dos muestras (Mann-Whitney).

Table 5. Comparison of means to determine the lytic effect of lysozymes of *Tivela stultorum*, *Chlamys islandica* and hen egg (LT, LC and LH, respectively) between *Streptococcus alfa* and *Escherichia coli* with and without EDTA. Analysis of two samples (Mann-Whitney).

Tratamientos	<i>S. alfa</i> vs <i>E. coli</i>	T	P
Sin EDTA			
LT	23.3 vs 16.3	155	<0.0001
LC	11.2 vs 13.0	73	0.0173
LH*	–	–	–
Con EDTA			
LT	24.5 vs 21.4	150	<0.0001
LC	13.2 vs 12.9	109	0.791
LH	15.5 vs 13.7	149	0.001

* No presentó actividad.

células de *E. coli*, en donde el tratamiento de la LT presentó una mediana de 16.3, mayor que la mostrada por el tratamiento de LC, con 13.0. Los tratamientos en presencia de EDTA también mostraron diferencias significativas ($F = 122.8$, g.l. = 2, $P < 0.0001$); el valor más alto obtenido fue para el tratamiento de LT, con 21.4, mientras que no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de LC y LH, con valores de mediana de 12.9 y 13.7, respectivamente.

Las mezclas de lisozimas con EDTA para los tratamientos de LT y LH fueron significativamente diferentes al efecto mostrado por la lisozima sola en contra de bacterias de *E. coli*, mientras que no se observaron diferencias significativas entre la LC sola y su mezcla con EDTA (t de Student M-W, $T = 55$, $P = 0.00$, $T = 55$, $P = 0.00$, $t = -1.60$, g.l. = 18, $P = 0.1280$); sin embargo, esta última afirmación debe tomarse con cautela ya que presenta una potencia de prueba de 0.2055.

DISCUSIÓN

Las diferencias que caracterizan a las enzimas tipo lisozima han llevado al uso de diversos métodos de extracción (McHenery y Birkbeck, 1979; Grinde *et al.*, 1988; Viana y Raa, 1992). El método utilizado en el presente trabajo proporcionó una purificación 100 veces más con respecto al extracto crudo, obteniéndose 20.2 μg de proteína con una alta actividad enzimática por cada gramo de estilete. La cantidad obtenida no es alta considerando que el estilete es una fuente rica de lisozima (McHenery y Birkbeck, 1979), cantidad que varía de acuerdo con el estado alimenticio de las almejas al momento de la disección. Sin embargo, si tomamos en cuenta que la actividad específica para la fracción pura fue de 25,408,000 U/mg y de 253.8 U/mg para el homogenado original, entonces podríamos esperar 762.37 μg de lisozima pura en un

and that a large part of the decrease was due to the elimination of the Ia group, which was not possible to improve with ionic exchange rechromatography and molecular exclusion (results not shown). The discarded group (Ia) contained 4192.63 U/mg of style, which represented almost 50% of the lysozyme activity. However, in this study it was chosen to sacrifice yield in order to achieve the highest purification possible.

The ionic exchange chromatography used in this study has proved successful in the purification of basic, stable and low molecular weight enzymes, such as the lysozyme (Fletcher and White, 1976; McHenery and Birkbeck, 1979). Under the same chromatographic conditions, the Ib group presented two components at 280 nm; the peak of enzymatic activity occurred between the two protein components, with a bias towards the first, and there was a principal band with isoelectric focusing.

The purification procedures generally use different chromatographic methods; however, rechromatography under the same conditions has provided satisfactory results (Ito *et al.*, 1990). In this study, the use of other chromatographic methods did not provide the same results, as was observed with electrophoresis; however, the rechromatography provided a higher degree of purity, with an increase in selectivity and efficiency of the components in the chromatograph, resulting in only one peak with activity of 25,407.9 U/mg of protein equivalent to BSA, which was 5.4 times higher than that obtained with LH of 4684 U/mg of protein equivalent to BSA. There are several works that show that different lysozyme-like enzymes have greater specific activity than the hen egg lysozyme, such as the human milk lysozyme and that of the scallop *C. islandica* (Koivisto *et al.*, 1973; Viana and Raa, 1992).

As with other lysozyme-like marine enzymes, LT had maximum activities at acidic

gramo de estilete. De acuerdo con esto, se puede decir que el rendimiento obtenido en el presente trabajo fue bajo, en donde gran parte de la disminución se debió a la eliminación del grupo Ia, que no fue posible mejorar mediante recromatografía con intercambio iónico y exclusión molecular (resultados no mostrados). El grupo descartado (Ia) contenía 4192.63 U/mg de estilete, lo cual representaba cerca del 50% de la actividad de la lisozima. Sin embargo, en este trabajo se optó por lograr la máxima purificación posible, sacrificando el rendimiento.

La cromatografía de intercambio iónico utilizada en el presente trabajo ha probado ser un método exitoso en la purificación de enzimas básicas, estables y de bajo peso molecular como la lisozima (Fletcher y White, 1976; McHenery y Birkbeck, 1979). Bajo las mismas condiciones cromatográficas, el grupo Ib resultó en dos componentes a 280 nm; el pico con actividad enzimática se presentó entre los dos componentes de proteína, sesgado hacia el primero, y se observó una banda principal mediante isoelectroenfoque.

Los procedimientos de purificación generalmente utilizan métodos cromatográficos diferentes; no obstante, la recromatografía bajo las mismas condiciones ha dado resultados satisfactorios (Ito *et al.*, 1990). En este trabajo, la utilización de otros métodos cromatográficos no dio resultado como se observó mediante la electroforesis; sin embargo, la recromatografía dio un mayor grado de pureza, con un aumento de la selectividad y eficiencia de los componentes en el cromatograma, resultando en un solo pico con una actividad de 25,407.9 U/mg de proteína equivalente a ASB, que fue 5.4 veces mayor que la obtenida con LH, de 4,684 U/mg de proteína equivalente a ASB. Existen varios trabajos que demuestran que diversas enzimas tipo lisozima presentan mayor actividad específica que la lisozima de huevo de gallina, como el caso de la lisozima

pHs, with an optimum pH value between 5.6 and 5.8, which is lower than that reported for the mussel *Mytilus edulis*, of 6.4, and greater than that of LC, of 4.8–5.0 (McHenery *et al.*, 1979; Viana and Raa, 1992). In contrast, LH showed its maximum activity at pH 6.2.

The activity of the lysozymes of mollusks at acidic pHs can be explained by the function and location of the lysozyme-like enzyme in these organisms. Since they mainly have digestive functions, these enzymes have ranges of activity at acidic pHs around 5 (Wilbur and Yonge, 1966), and is probably a response to adaptation (Jollès and Jollès, 1984). LT, like LC (Viana and Raa, 1992), shows a behavior opposite that of LH with respect to the addition of salts, since the latter requires ionic strengths higher than 0.005 to show activity (Davies *et al.*, 1969), whereas the activity of LT is inversely proportional to the increase in ionic strength until reaching the degree of its inhibition. There are some theories that explain the increase in activity of LH when 1% of salt is added, which are based on optimum conditions of the enzyme with the substrate to present activity (Davies *et al.*, 1969). In any case, it is important to note that the lysozyme present in hen egg-white, with mainly defense functions, is found in biological liquid with an ionic strength of around 0.15, whereas the enzymatic activity in mollusks that occurs in the digestive system shows a decrease at concentrations of sodium chloride of 0.55 M and of magnesium chloride of 0.05 M, such as that found in sea water (McHenery *et al.*, 1979).

As with most enzymes, LT had optimum activity at a temperature of 40°C. However, remnant activity of 26.7% was observed at 4°C. This characteristic seems to be particular of marine enzymes of temperate and/or cold waters as has been reported (Viana and Raa, 1992). Because enzymes show great stability with respect to pH and temperature, and the fact that they present activity at low

de leche humana y de la almeja *C. islandica* (Koivisto *et al.*, 1973; Viana y Raa, 1992).

Al igual que otras enzimas marinas tipo lisozima, la LT presentó actividades máximas a pHs ácidos, con un pH óptimo entre 5.6 y 5.8, cuyo valor es menor que el reportado para el mejillón *Mytilus edulis*, de 6.4, y mayor que el de la LC, de 4.8 a 5.0 (McHenery *et al.*, 1979; Viana y Raa, 1992). En contraste, la LH tiene su máxima actividad a pH de 6.2.

La actividad de las lisozimas de los moluscos a pHs ácidos podría explicarse al tomar en cuenta la función y ubicación de las enzimas tipo lisozima en tales organismos, con funciones principalmente digestivas, de tal manera que enzimas con funciones digestivas tienen rangos de actividad a pHs ácidos alrededor de 5 (Wilbur y Yonge, 1966), como probable respuesta a una adaptación (Jollès y Jollès, 1984). La LT así como la LC (Viana y Raa, 1992) muestran un comportamiento contrario al de la LH con respecto a la adición de sales, ya que esta última requiere de fuerzas iónicas mayores que 0.005 para mostrar actividad (Davies *et al.*, 1969), mientras que la actividad de LT es inversamente proporcional al incremento de la fuerza iónica, hasta llegar al grado de su inhibición. Existen algunas teorías para explicar el aumento de la actividad de LH al adicionarle el 1% de sal, las cuales tienen su fundamento en condiciones óptimas de la enzima con el sustrato para presentar actividad (Davies *et al.*, 1969). En todo caso, es importante tomar en cuenta que la lisozima presente en la clara de huevo de gallina con funciones principalmente de defensa, se encuentra en un fluido biológico con una fuerza iónica alrededor de 0.15, mientras que la actividad enzimática en moluscos que se encuentran en el sistema digestivo presenta una disminución a concentraciones de cloruro de sodio de 0.55M y de cloruro de magnesio a 0.05M, como se encuentran en el agua de mar (McHenery *et al.*, 1979).

temperatures makes them industrially important, since they are able to counteract bacteria at refrigeration temperatures.

With respect to the ability of the lysozyme to produce bacterial cellular lysis, it is shown that LT and LC are more effective to lyse cells of *S. alfa* and *E. coli* than LH, and in the absence of EDTA, LH presents no effect. Because of the sensitivity of LH towards gram-positive bacteria, it is also expected to present activity towards *S. alfa*, a gram-positive bacteria. The fact that LH does not act without EDTA in both *S. alfa* and *E. coli* cannot be attributed to the low concentration of the enzyme used. Hughey and Johnson (1987) report lytic effects towards *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus thermosaccharolyticum* with concentrations of 0.01 mg/mL of LH without EDTA, whereas in this study a concentration of 0.0383mg/mL was used.

All the lysozymes presented activity in the presence of EDTA; it was comparatively higher for LT than that observed for LH and LC. It should be mentioned that the amount of enzyme used in the tests for bacterial degradation was chosen standardizing the specific activity at 4°C. At this temperature, LC presented the most activity (67% of remnant activity at this temperature, according to Viana and Raa, 1992), followed by LT (26.7%) and LH (4%, according to Viana and Raa, 1992). This seems to favor the enzyme LH, followed by LT, since more enzyme had to be used to equalize the specific activity of LC. In the tests conducted at 37°C, LH, followed by LT, had more enzyme (mg of protein per μ L) than LC, making it extremely difficult to numerically compare activity among the lysozymes. However, it is important to analyze the differences found in the behavior of activity towards the two bacteria. The one-way analysis of variance of the three lysozymes showed that the effect of

Al igual que la mayoría de las enzimas, la LT presentó una actividad óptima a una temperatura de 40°C. Sin embargo, se observó una actividad residual de 26.7% a 4°C. Esta característica parece ser particular de enzimas marinas procedentes de aguas templadas y/o frías, como se ha reportado antes (Viana y Raa, 1992). Además de mostrar una gran estabilidad con respecto al pH y la temperatura, la propiedad de presentar actividad a bajas temperaturas le confiere a las enzimas una gran cualidad en cuanto a una aplicación industrial, ya que a temperaturas de refrigeración actuarán contra bacterias.

En cuanto a la habilidad de la lisozima para producir lisis celular bacteriana, se muestra que LT y LC presentan una mayor efectividad para lisar células de *S. alfa* y *E. coli* que LH, además de que en ausencia de EDTA, el efecto mostrado por la LH es totalmente nulo. Era de esperarse que la LH presentara actividad hacia *S. alfa* por tratarse de una bacteria gram positiva, por su sensibilidad hacia las gram positivas. El hecho de que LH no actúe en ausencia de EDTA tanto en *S. alfa* como *E. coli*, no podría ser atribuido a que se utilizó una concentración baja de la enzima. Hughey y Johnson (1987) reportan efectos líticos hacia *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus thermosaccharolyticum* con concentraciones de 0.01 mg/mL de LH sin EDTA, mientras que en este trabajo se utilizó una concentración de 0.0383 mg/mL.

En presencia de EDTA todas las lisozimas presentaron actividad, siendo comparativamente mayor en LT que lo observado en LH y LC. Cabe aclarar que la cantidad de enzima suministrada en las pruebas para degradación de bacterias se eligió estandarizando la actividad específica a 4°C. A dicha temperatura, LC presentó la mayor actividad (67% de actividad residual a esta temperatura, según Viana y Raa, 1992), seguida por LT (26.7%) y por último LH (4%, según Viana y Raa, 1992). Esto, al

lysis on *S. alfa* (gram positive) in the presence of EDTA was significantly different ($P < 0.001$), LT showed the greatest activity, followed by LH and LC (table 3). On the other hand, for *E. coli*, which is gram negative, only LT was significantly different from LC and LH ($P < 0.001$), with no differences between the last two (table 3). This could indicate that LH is comparatively less sensitive than LC to *S. alfa*.

On the other hand, comparing the results obtained in the paired tests of the bacteria with and without EDTA for each of the lysozymes (table 4), we see that all the lysozymes were significantly more sensitive with EDTA for *S. alfa*. However, for *E. coli*, no significant difference was observed for LC, but a synergic effect of EDTA was observed for LT and LH. Table 5 shows the comparison of the effect of both bacteria with and without EDTA, and LC is the only group that does not present significant differences with EDTA, but without EDTA it presented significantly greater activity towards *E. coli*. LT and LH presented significantly lower activity towards *E. coli* than towards *S. alfa* with or without EDTA. This means that LC is more sensitive to gram-negative bacteria than LT and LH. As expected, both marine lysozymes (LT and LC) acted similarly, since they are enzymes from marine filter organisms that use this enzyme to degrade bacteria during digestion. However, for LT, the activity between both bacteria with EDTA was substantially lower for *E. coli* (23.3 vs 16.30), as shown in table 5, but upon adding EDTA this difference was reduced (24.5 vs 21.4). The dissimilar behaviors between LT and LC are probably due to their adaptation to the environment: *T. stultorum* comes from a temperate environment (18°C), while *C. islandica* lives in temperatures below 5°C and depths greater than 50 m (Viana and Raa, 1992). Therefore, LC acts as an extremophile enzyme with different characteristics than terrestrial ones (Hochachka and Somero, 1984). It cannot be

parecer, favorece a la enzima de LH, seguida por LT, pues mayor cantidad de enzima tuvo que suministrarse para igualar la actividad específica de LC. Por tanto, al realizarse las pruebas a 37°C, la LH seguida por la LT tenían mayor cantidad de enzima (mg de proteína por μL) que la LC, por lo que resulta sumamente difícil comparar la actividad de manera numérica entre las lisozimas. No obstante, es importante analizar las diferencias encontradas en el comportamiento de actividad hacia las dos bacterias. De esta manera, mediante un análisis de varianza de una vía entre las tres lisozimas, se encontró que en presencia de EDTA, el efecto de lisis sobre *S. alfa* (gram positiva) fue significativamente diferente ($P < 0.001$), siendo mayor la actividad para LT, seguida por LH y LC (tabla 3). En cambio, para *E. coli*, que es gram negativa, solamente LT fue significativamente diferente a LC y LH ($P < 0.001$), no existiendo diferencias entre estas dos últimas (tabla 3). Esto podría indicar que comparativamente LH es menos sensible que LC al *S. alfa*.

Por otro lado, comparando los resultados obtenidos en las pruebas pareadas para las bacterias con y sin EDTA para cada una de las lisozimas (tabla 4), observamos que para *S. alfa* todas las lisozimas fueron significativamente más sensibles en presencia de EDTA. Sin embargo, con *E. coli*, no se observó diferencia significativa para LC, mientras que para LT y LH sí se observó nuevamente un efecto sinérgico del EDTA. Al referir la tabla 5, donde se compara el efecto de ambas bacterias con EDTA y sin EDTA, se observa que el único grupo que no presenta diferencias significativas es el LC con EDTA, mientras que sin EDTA la LC fue la única que presentó una mayor actividad significativa hacia *E. coli*, mientras que LT y LH presentaron una actividad significativamente menor hacia *E. coli* que hacia *S. alfa* en presencia o ausencia de EDTA. Lo anterior significa que LC presenta una mayor sensibilidad a las gram negativas que LT y LH. Era de

ignored that LT presents characteristics of an enzyme different to that shown by the terrestrial ones. As mentioned above, LT has greater activity at temperatures below those observed for LH; furthermore, LT did present activity without EDTA, which was not observed for LH. The greater ability of LC towards *E. coli* may be due to the fact that the environment where *T. stultorum* develops is richer in food than where *C. islandica* develops, which enables *T. stultorum* to be less selective for a special type of food.

EDTA is known to sensitize bacteria, and increase the action of lysozymes (Repaske, 1958; Chander and Lewis, 1980; Samuelson *et al.*, 1985). This is because EDTA is a cationic chelator that joins with the positive charges of the bacterial wall, neutralizes them and allows lysozyme action, which for LH is a positive charge because of its pI of 11 (Worthington, 1979), deterring rejection by charges. This could explain why marine lysozymes with a pI lower than LH (McHenery and Birkbeck, 1979; Grinde *et al.*, 1988) do not depend as much on the presence of EDTA, even though significant differences were observed in some of the above-mentioned cases. The fact that EDTA is not needed to lyse bacteria has the advantage that it can be used as a biological antibacterial compound, since it is restricted in the food industry (Belitz and Grosch, 1987). Unpublished results indicate an apparent pI in LC of 6, which would explain why EDTA does not act with the same synergism in LC like with the other enzymes, such as in LT that has a pI of 7.7 (table 2).

It can be summarized that LT is an enzyme capable of degrading bacteria such as *S. alfa* and *E. coli* without EDTA, but it does present a synergic effect when EDTA is present to degrade both bacteria, with the greatest effect with *E. coli*. On the other hand, LC, unlike LT, is more sensitive to gram-negative bacteria, with EDTA presenting a synergic effect for *S.*

esperarse que ambas lisozimas marinas (LT y LC) se comportaran de manera similar, ya que son enzimas procedentes de organismos marinos filtradores que utilizan dicha enzima para degradar bacterias como parte de su digestión. Sin embargo, en LT la actividad entre ambas bacterias sin EDTA fue substancialmente menor para *E. coli* (23.3 vs 16.30), como se muestra en la tabla 5, mientras que al agregar EDTA dicha diferencia se redujo (24.5 vs 21.4). El hecho de que LT no actúa de manera similar a LC probablemente se debe a la adaptación a su medio ambiente: *T. stultorum* proviene de un medio ambiente templado (18°C), mientras que *C. islandica* vive en temperaturas inferiores a los 5°C y profundidades mayores que 50 m (Viana y Raa, 1992). De esta manera, LC se comporta como una enzima extremófila con características diferentes a las terrestres (Hochachka y Somero, 1984). No se puede descartar, de cualquier manera, el hecho de que LT presente características de una enzima diferente a las terrestres. Como se comentó anteriormente, LT presenta mayor actividad a temperaturas inferiores que la observada para LH; además, LT sí presentó actividad en ausencia de EDTA, lo que no se observó con LH. Esta mayor habilidad aparente de LC hacia *E. coli* pudiera entonces deberse a que el medio donde se desarrolla *T. stultorum* sea más rico en alimento que donde se desarrolla *C. islandica*, no existiendo la necesidad de ser aún más selectiva a un tipo de alimento especial.

El EDTA se conoce como un sensibilizador para bacterias, incrementando la acción de la lisozima (Repaske, 1958; Chander y Lewis, 1980; Samuelson *et al.*, 1985). Dicha propiedad se debe a que el EDTA como quelante catiónico se une a las cargas positivas de la pared bacteriana, neutralizándolas y así permitiendo la acción de la lisozima, que en el caso de LH se encuentra cargada positivamente por su pI de 11 (Worthington, 1979), impidiendo el

alfa. LH presented the most differences; EDTA is necessary and its activity was lower towards *E. coli*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by UABC and formed part of the master's program of the first author.

English translation by Jennifer Davis.

rechazo por cargas. Esto podría explicar el hecho de que las lisozimas marinas al presentar un pI más bajo que la LH (McHenry y Birkbeck, 1979; Grinde *et al.*, 1988) no dependen tanto de la presencia del EDTA, aunque sí se observaron diferencias significativas en algunos casos antes mencionados. El hecho de que no sea necesario el uso de EDTA para lisar bacterias tiene como ventaja el que pueda utilizarse como un compuesto antibacteriano biológico sin requerir el agregar EDTA, el cual se encuentra restringido en la industria alimenticia (Belitz y Grosch, 1987). Resultados no publicados muestran un pI aparente en LC de 6, que explicaría el porqué en LC el EDTA no actúa con el mismo sinergismo que con las otras enzimas, mientras que LT presenta un pI de 7.7 (tabla 2).

Con esto, puede resumirse que LT es una enzima capaz de degradar bacterias como *S. alfa* y *E. coli* en ausencia de EDTA, aunque sí presenta un efecto sinérgico cuando EDTA se encuentra presente para degradar ambas bacterias, siendo mayor dicho efecto con *E. coli*. En cambio, al contrario de LT, la LC es más sensible a las gram negativas, presentando el EDTA un efecto sinérgico para *S. alfa*. LH fue la enzima con características más diferentes, donde la presencia de EDTA es necesaria y su actividad fue menor hacia *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la UABC y formó parte del programa de maestría del primer autor.

REFERENCIAS

- Belitz, H.D. and Grosch, W. (1987). Food Chemistry. Springer-Verlag, Berlin, 774 pp.
- Bratlid, D. (1977). A simple procedure for determination of bacteriolytic activity in biological fluids. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C., 85: 17–20.
- Chander, R. and Lewis, N.F. (1980). Effect of lysozyme and sodium EDTA on shrimp microflora. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10: 253–258.
- Davies, R.C., Neuberger, A. and Wilson, B.M. (1969). The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. Biochem. Biophys. Acta, 178: 294–503.
- Fletcher, T.C. and White, A. (1976). The lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa* L. Biochem. Physiol., 55B: 207–210.
- Grinde, B., Jollès, J. and Jollès, P. (1988). Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Biochem., 173: 269–273.
- Gounot, A.M. (1991). A review. Bacterial life at low temperature: Physiological aspects and biotechnological implications. J. Appl. Bacteriol., 71: 386–397.
- Hardy, S.W., Fletcher, T.C. and Gerrie, L.M. (1976). Factors in haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* L., of possible significance as defense mechanism. Biochem. Soc. Trans., 4: 473–475.
- Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (1984). Biochemical Adaptation. Princeton Univ. Press, Oxford, 537 pp.
- Hughey, V.L. and Johnson, E. (1987). Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. Appl. Environ. Microbiol., 53(9): 2195–2170.
- Ito, Y., Ysamada, H., Nakamura, S. and Imoto, T. (1990). Purification, amino acid sequence, and some properties of rabbit kidney lysozyme. J. Biochem., 107: 236–241.
- Jollès, P. and Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system today as yesterday. Mol. Cell. Biochem., 63: 165–189.
- Jollès, P., Charlemagne, D., Petit, J.F., Maire, A.C. and Jollès, J. (1965). Biochimie Comparee des lysozymes. Bull. Soc. Chem. Biol., 47(12): 2241–2259.
- Koivisto, M., Hackert, O. and Raunio, V. (1973). Lysozymimjolk och dess betydelse for infektionss Kydd. Semper Nutrition Symp., Stockholm, 9: 67–80.
- Lie, O., Syed, M. and Solbu, H. (1986). Improved agar plate assays of bovine lysozyme and haemolytic complement activity. Acta vet Scand., 27: 23–32.
- McDade, J.E. and Tripp, M.R. (1967). Lysozyme in the haemolymph of the oyster *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol., 9: 531–535.
- McHenery, J.G. and Birkbeck, T.H. (1979). Lysozyme of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). Mar. Biol. Lett., 1: 111–119.
- McHenery, J.G., and Birkbeck, T.H. (1982). Characterization of the lysozyme of *Mytilus edulis* (L.). Comp. Biochem. Physiol., 71B(4): 583–589.
- McHenery, J.G., Birkbeck, T.H. and Allen, J.A. (1979). The occurrence of lysozyme in marinebivalves. Comp. Biochem. Physiol., 63B: 25–28.
- Repaske, R. (1958). Lysis of the gram negative organisms and the role of the versene. Biochem. Biophys. Acta, 30: 225–232.
- Samuelson, K.T., Rupnow, J.H. and Froning, G.W. (1985). The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on salmonella on broiler parts. Poultry Sci., 64: 1488–1490.
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantification of protein. In: M.P. Deutscher (ed.), Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification. Academic Press, San Diego, 182: 57–68.
- Viana, M.T. and Raa, J. (1992). Lysozyme-like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. Ciencias Marinas, 18(1): 93–107.
- Wilbur, K.M. and Yonge, C.M. (1966). Physiology of Mollusks. Vol II. Academic Press, London, 65pp.
- Worthington, T.M. (1979). Enzymes and Related Biochemicals. Millipore Corp., Bedford, Ma., USA, 210 pp.