

LYSOZYME-LIKE ENZYME FROM THE SCALLOP *Chlamys islandica*

ENZIMA TIPO LISOZIMA DE LA ALMEJA ARTICA *Chlamys islandica*

María Teresa Viana*
Jan Raa

Department of Marine Biochemistry
The Norwegian College of Fishery Science
University of Tromsø
P.O. Box 3083
9001-Tromsø, Norway

Recibido en marzo de 1991; aceptado en mayo de 1991

ABSTRACT

A lysozyme-like enzyme isolated from the crystalline style of the scallop *Chlamys islandica*, was purified by cation exchange chromatography on carboxymethyl cellulose and Mono S columns. The enzyme was optimally active at pH 4.8, similar to that observed for the lysozyme of *Mytilus edulis*. The present enzyme has an unusual 67% remainder activity at 4°C when cell walls of *Micrococcus lysodeikticus* were used as substrate. The enzyme had a specific activity of 486,090 U/mg, corresponding to ten times higher than that of hen egg white lysozyme.

RESUMEN

Una enzima tipo-lisozima proveniente del estilete de la almeja ártica *Chlamys islandica*, fue purificada a través de cromatografía por intercambio iónico utilizando una columna de carboximetil celulosa y otra de Mono S. La enzima fue ópticamente activa a pH 4.8, similar al observado en la lisozima de *Mytilus edulis*. La presente enzima posee una actividad poco usual de 67% con respecto al máximo al ser incubada a 4°C, utilizando células de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La enzima tuvo una actividad específica de 486,090 U/mg, lo cual corresponde a una actividad diez veces mayor a la actividad observada en la lisozima de clara de huevo.

INTRODUCTION

Lysozyme (EC 3.2.1.17) is an enzyme present in all types of living organisms. According to its function, lysozymes are defined as 1,4- β -N-acetylmuramidases cleaving the glycosidic bond between the C-1 of N-acetylmuramic acid (Mur N Ac) and the C-4 of N-acetylglucosamine (Glc N Ac) in the bacterial peptidoglycan (Jollès and Jollès, 1984). However, some of the lysozymes also display more or less pronounced chitinase or esterase activity, and it has been shown that in nature they vary considerably in molecular

INTRODUCCION

La lisozima (EC 3.2.1.17) es una enzima presente en todos los organismos vivos. De acuerdo a su función, la lisozima es definida como una enzima 1,4- β -N-acetilmuramidasa, la cual rompe los enlaces glicosídicos entre el C-1 del ácido N-acetilmurámico (Mur N Ac) y el C-4 de la N-acetilglucosamina (Glc N Ac) del peptidoglicano bacteriano (Jollès y Jollès, 1984). No obstante, algunas de las lisozimas también presentan alguna actividad esterasa o quitinasa más o menos pronunciada; además, se ha demostrado que en la naturaleza las

*Present address: Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado Postal 453, Ensenada, Baja California, México.

weight and in their specificity of action (Osserman *et al.*, 1974). Lysozymes are primarily involved in a defense mechanism. However, it has been found that the lysozyme in the mussel *Mytilus edulis* is primarily associated with the digestive system which suggests that its principal function is in degradation of bacteria for nourishment of the animal (Jollès, 1967; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979). The lysozyme from *Mytilus edulis* has already been characterized (McHenery and Birkbeck, 1982) and some differences in specificity with respect to that described for hen egg white lysozyme are reported, even when it has been proved that lysozyme from *Mytilus edulis* is a true lysozyme (McHenery and Birkbeck, 1982). Such differences can be explained by the different environments to which they are exposed. Thus, the activity of other lysozyme-like enzymes from other bivalves could also be different if exposed to an extreme environment. The scallop *Chlamys islandica* is exposed to an extreme environment. They live in the Arctic Sea at a depth of more than 30 m, where the temperature can reach levels below 0°C. Therefore, if the enzyme activity is affected by the environment, it can be assumed that the lysozyme activity of *Ch. islandica* might show some differences as well.

The present paper describes the purification procedure of the lysozyme from the style of *Ch. islandica*, and some of its biochemical properties are described.

MATERIAL AND METHODS

Scallops

Specimens of *Ch. islandica* provided by the Marine Biological Station at the University of Tromsø, Norway, were collected from the Balsfjord area. The scallops were maintained in running sea water prior to dissecting. The styles were extracted and kept on ice for further work in the laboratory.

Purification of lysozyme

Batches of up to 100 crystalline styles were homogenized in 1:10 (v/v) 0.1 M phosphate-EDTA buffer (containing 5 mM EDTA) at pH 5.0 in a tissue homogenizer (Waring 003573 with a microcontainer). Ten percent NaCl was added to the extract before being

lizozimas varían considerablemente en peso molecular y actividad específica (Osserman *et al.*, 1974). Las lizozimas se encuentran primariamente asociadas a un mecanismo de defensa. Sin embargo, se ha encontrado que la lizozima del mejillón común *Mytilus edulis* está asociada primariamente con el sistema digestivo, donde su principal función es la degradación de bacterias para su nutrición (Jollès, 1967; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979). La lizozima de *M. edulis* ya ha sido caracterizada (McHenery y Birkbeck, 1982) y algunas diferencias en actividad específica con respecto a la lizozima del huevo de gallina han sido reportadas, aun cuando se ha demostrado que la lizozima de *Mytilus edulis* es una lizozima verdadera (McHenery y Birkbeck, 1982). Dichas diferencias pueden ser explicadas con base en los diferentes medios ambientes a los cuales se encuentran expuestas. Entonces, la actividad de otras enzimas tipo-lizozima provenientes de otros bivalvos también podría ser diferente si estuvieran expuestas a un medio ambiente extremo. La almeja *Ch. islandica* está expuesta a un medio ambiente extremo. Ellas viven en el mar Artico a profundidades mayores a los 30 m, donde la temperatura alcanza niveles inferiores a 0°C. Es por esto que si la actividad enzimática es afectada por el medio ambiente, se puede suponer que la actividad de *Ch. islandica* deba presentar diferencias.

El presente artículo describe el procedimiento de purificación de la lizozima del estilete de *Ch. islandica*, y se presentan algunas de sus propiedades bioquímicas.

MATERIAL Y METODOS

Almejas árticas

Los ejemplares de *Ch. islandica* fueron proporcionados por la Estación de Biología Marina de la Universidad de Tromsø, Noruega, y colectados en el área de Balsfjord. Las almejas árticas fueron mantenidas en agua corriente de mar antes de su disección. Los estiletes fueron extraídos y mantenidos en hielo para su posterior trabajo en el laboratorio.

Purificación de la lizozima

Varios grupos de hasta 100 estiletes fueron homogeneizados 1:10 (v/v) en una solución amortiguadora de fosfato-EDTA

centrifuged, and the precipitate removed. The supernatant was dialyzed against the buffer for 48 hours at 4°C. The sample was applied to a cation exchange column of carboxymethyl cellulose (Pharmacia Fine Chemicals). The column had previously been equilibrated with the same phosphate-EDTA buffer. The column was washed out with phosphate-EDTA buffer until no protein was detected by the spectrophotometer at 280 nm, and the adsorbed material eluted with 1,000 ml of a linear gradient of 0-1 M NaCl contained in the phosphate-EDTA buffer, pH 5.0. Fractions containing the peak of lysozyme activity were pooled and dialyzed overnight against 0.1 M phosphate buffer, pH 5.0. The dialyzed fraction was rechromatographed by means of Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), using a Mono S (cation exchange) column. The elution buffer was 0.1 M phosphate-EDTA pH 5.0, with NaCl in the elution gradient (0 to 1 M).

Enzyme assays

Lysozyme activity was estimated spectrophotometrically in a Hewlett-Packard 8450 A. Activity was determined by the method described by Bratlid (1977), consisting in adding 25 μ l test solution to tubes containing 3.0 ml *Micrococcus lysodeikticus* suspension, which was prepared by suspending 0.2 mg/ml *M. lysodeikticus* in phosphate-EDTA buffer 0.1 M, pH 5.0. After mixing, the samples were incubated at 37°C for 30 minutes. Absorbance at 570 nm was measured. For estimation of specific activity, the test solution was mixed with the suspension, and the absorbance change at 570 nm was measured for six minutes and the enzyme activity calculated. One enzyme unit was defined as the quantity which produces a decrease in A_{570} of 0.001 units per minute under these conditions. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard. Hen egg white lysozyme (HEWL) purchased from Sigma was used as control.

Optimum pH

Phosphate-EDTA buffer at constant molarity (0.1 M) was prepared over a range of 3.3-7.8 pH. The stock buffers were added to

0.1 M (EDTA 5 mM) a un pH de 5.0, en un homogeneizador de tejidos (Waring 003573 con microcontenedor). Se adicionó 10% de NaCl al extracto antes de ser centrifugado, y entonces, se removió el precipitado. El sobrenadante se dializó contra la misma solución amortiguadora durante 48 horas a 4°C. La muestra fue aplicada a una columna de intercambio iónico que contenía carboximetil celulosa (Pharmacia Fine Chemicals). La columna había sido previamente calibrada con la misma solución amortiguadora de fosfato-EDTA. Esta se lavó con el amortiguador de fosfato-EDTA hasta que ningún rastro de proteína fue detectado mediante el espectrofotómetro, a una absorbancia de 280 nm, y se eluyó el material adsorbido con 1,000 ml de una solución amortiguadora de fosfato-EDTA, que contenía NaCl, haciendo un gradiente lineal (0 a 1 M). Las fracciones que contenían el máximo de actividad de lisozima fueron agrupadas y dializadas durante la noche utilizando un amortiguador de fosfato al 0.1 M y pH 5.0. Se recromatografió la fracción dializada mediante "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) utilizando una columna Mono S (intercambio catiónico). El amortiguador para la elución fue de fosfato-EDTA al 0.1 M y pH 5.0, con NaCl en el gradiente de elución (0 a 1 M).

Análisis enzimático

La actividad enzimática de lisozima fue estimada espectrofotométricamente con un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8450 A. La actividad se determinó mediante el método descrito por Bratlid (1977), el cual consiste en adicionar 25 μ l de la solución problema a tubos que contenían 3.0 ml de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*. Dicho substrato fue preparado mediante la suspensión de 0.2 mg/ml de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* en la solución amortiguadora de fosfato-EDTA al 0.1 M y pH 5.0. Después de mezclar dicha suspensión con la solución problema, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos antes de leer la absorbancia a 570 nm. La actividad específica se calculó mezclando la solución problema con la suspensión, y estimando el cambio en absorbancia a 570 nm durante los primeros seis minutos de reacción. Se definió una unidad enzimática como la cantidad que produce la caída de

freeze-dried *M. lysodeikticus* to reach a concentration of 0.2 mg/ml. The cell suspensions were dispensed into tubes in triplicate of a volume of 3 ml and 25 μ l of test solution was added. After 30 minutes at 37°C, the tubes were cooled down in ice and A570 nm was measured in the spectrophotometer. The activity was related to the respective maximum, which was taken to represent 100% activity. Distilled water was used as blank for each pH solution used.

Optimum temperature

Lysozyme from *Ch. islandica* (25 μ l test solution) was added to 3 ml suspensions of freeze-dried *M. lysodeikticus* cells (0.2 mg/ml) in 0.1 M phosphate-EDTA buffer, pH 5.0. The tubes in triplicate were incubated at different temperatures over the range of 4-44°C. The change in absorbancy (A570 nm) was measured after 30 minutes. The activity of the enzyme, at each temperature, was related to the respective maximum, which was taken to represent 100% activity. Hen egg white lysozyme (HEWL) was used as reference and distilled water as blank for each incubation temperature.

Effect of NaCl on the enzyme activity

NaCl was added to suspensions of freeze-dried *M. lysodeikticus* cells (0.2 mg/ml) in 0.1 M phosphate-EDTA buffer, pH 5.0 and 6.2. Triplicate volumes of 3 ml of each buffered cell suspension were dispensed into tubes to which were added either 25 μ l test solution or 25 μ l distilled water. After 30 minutes at 37°C the change in absorbance at 570 nm was registered.

Heat stability of the enzyme

Aliquots of 250 μ l test solution were dispensed into 2 ml Eppendorf microtubes and heated at 37, 45, 59, 75 and 93°C for 10 and 30 minutes in water baths. Microtubes removed were kept on ice until lysozyme was assayed spectrophotometrically for enzyme activity by the standard procedure. Activity was related to the sample maintained at 0°C throughout the experiment. Distilled water was used as reference for each incubation temperature used.

0.001 unidades por minuto en A570 bajo las condiciones descritas anteriormente. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albúmina de suero de bovino como estándar. Como control, se empleó lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) (Sigma).

pH óptimo

Se preparó una solución amortiguadora de fosfato-EDTA, con una molaridad constante (0.1 M con 5 mM EDTA) con un intervalo de pH de 3.3-7.8. Las soluciones amortiguadoras fueron adicionadas a células de *M. lysodeikticus* liofilizadas, obteniendo una concentración de 0.2 mg/ml. Las células en suspensión se aplicaron a tubos de ensayo por triplicado en volúmenes de 3 ml, y se adicionaron 25 μ l de la solución problema. Después de 30 minutos a 37°C, los tubos fueron enfriados en hielo y la absorbencia a 570 nm se registró en el espectrofotómetro. La actividad se relacionó a su respectivo máximo, el cual fue tomado como 100% de actividad. Se utilizó agua destilada como blanco para cada solución pH empleada en la experimentación.

Temperatura óptima

Se adicionó una solución enzimática de *Ch. islandica* (25 μ l) a 3 ml de la suspensión de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (0.2 mg/ml) en amortiguador 0.1 M de fosfato-EDTA, pH 5.0. Los tubos por triplicado se incubaron a diferentes temperaturas en un intervalo de 4-44°C. El cambio en la absorbencia a 570 nm fue registrado después de 30 minutos. La actividad de la enzima de cada temperatura se relacionó con su respectivo máximo, el cual fue tomado como el 100% de actividad. Se utilizó lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) como referencia y agua destilada como blanco, para cada temperatura de incubación.

Efecto de NaCl sobre la actividad enzimática

Se adicionó NaCl a células liofilizadas de *M. lysodeikticus* suspendidas en una solución amortiguadora de fosfato-EDTA 0.1 M pH 5.0 (0.2 mg/ml). Se aplicaron volúmenes de 3 ml por triplicado a tubos de ensayo, seguidos por 25 μ l de la solución problema o 25 μ l de agua

RESULTS

Lysozyme was purified from a 0.1 M phosphate buffer extract of 100 crystalline styles by four main steps shown in Table 1. By the procedure shown here, 0.18 mg protein with high lysozyme activity were obtained from a fraction with a total protein concentration of 175.05 mg.

By cation exchange chromatography (carboxymethyl cellulose), one peak with lysozyme activity was separated using NaCl in an elution gradient (0 to 1 M). As shown in Figure 1, the fraction with lysozyme activity can have more than one component. The dialyzed pool of the fraction with lysozyme activity was rechromatographed by FPLC Mono S column, and two components could be observed (Fig. 2). The first peak with no lysozyme activity and the second peak with high lysozyme activity. The specific activity of lysozyme using *M. lysodeikticus* cells at pH 5.0 was 486,090 U/mg compared to 17,600 U/mg for HEWL at its optimum pH (6.2). The activity of HEWL represents 3.6% of the activity of lysozyme from the scallop at its optimum pH (6.2) under same temperature conditions (Fig. 3).

Figure 4 shows the activity curve of lysozyme from the scallop using *M. lysodeikticus* cells as the substrate at different pH values. Lysozyme had its maximum activity at pH 4.8-5.0. When NaCl was present in the incubation mixture, maximum activity was registered at the same pH, 4.7. With concentrations up to 0.2M NaCl in the incubation mixture, a 10% of maximal remainder activity was observed (Fig. 5).

Figure 6 shows the activity of lysozyme from the scallop as a function of temperature. Activity is represented as the percentage of maximal activity. The activity of lysozyme from the scallop was observed as maximum at 37°C, and 67% of remainder activity was observed at 4°C. When HEWL was used under the same conditions, almost no activity was registered at such low temperature. The activity was estimated with a protein concentration of 11 µg/ml and pH 5.0 for the lysozyme from the scallop and 14 µg/ml and pH 6.2 for HEWL. Figure 7 shows that lysozyme from the scallop can be heated for 30 minutes at 45°C without registering any change in activity. After 10 minutes at 93°C,

destilada. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se registró el cambio en la absorbencia a 570 nm.

Estabilidad térmica de la enzima

Se aplicaron alícuotas de 25 µl de la solución problema a microtubos Eppendorf para calentarlas a 37, 45, 59, 75 y 93°C durante 10 y 30 minutos en baño de agua. Los microtubos fueron enfriados en hielo hasta que el análisis de la actividad enzimática se llevara a cabo, utilizando el procedimiento estándar. La actividad se relacionó con una muestra mantenida en hielo durante todo el experimento. Se utilizó agua destilada como referencia para cada temperatura de incubación.

RESULTADOS

La lisozima fue purificada a partir de un extracto de 100 estiletas en solución amortiguadora de fosfato-EDTA 0.1 M, empleando cuatro pasos principales como se muestra en la Tabla 1. Mediante el procedimiento mostrado aquí se obtuvieron 0.18 mg de proteína con alta actividad enzimática a partir de 175.05 mg de proteína contenidos en el extracto crudo.

Mediante cromatografía de intercambio catiónico (carboximetil celulosa), se separó un solo pico con actividad de lisozima utilizando un gradiente de 0 a 1 M NaCl. Como se muestra en la Figura 1, la fracción con actividad de lisozima puede contener más de un componente. El grupo de fracciones con actividad se dializó y recromatografió a través de una columna Mono S mediante FPLC, donde se pudieron observar dos componentes (Fig. 2). Sólo el segundo pico presentó actividad, misma que fue muy alta utilizando células de *M. lysodeikticus* como sustrato. La actividad específica de la lisozima a pH 5.0 fue de 486,090 U/mg comparada con 17,600 U/mg obtenidas de la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) a su pH óptimo de 6.2. La actividad de la HEWL representó el 3.6% de la actividad de la lisozima de la almeja ártica, cada una a su pH óptimo, pero bajo las mismas condiciones de incubación (Fig. 3).

La Figura 4 muestra la curva de actividad de la lisozima de *Ch. islandica* a diferentes pH, utilizando células de *M. lysodeikticus* como sustrato. La lisozima tuvo su máxima

Table 1. Yield of lysozyme from the crystalline style of *Chlamys islandica*.
Tabla 1. Rendimiento de lisozima del estilete de la almeja ártica *Chlamys islandica*.

	Total volume (ml)	Prot. con. (mg/ml) fraction with activity	Tot. prot. (mg) fraction with activity
1. Crude extract	25.0	7.0	175.00
2. Extract after being precipitated by buffer containing 10% NaCl	17.0	7.0	119.00
3. Pool (II) with lysozyme activity after being eluted by CM-32 cellulose column	17.2	2.0	34.40
4. Pool (III) with lysozyme activity. Fast Protein Liquid Chromatography, Mono S column was used, eluted by NaCl gradient from 0 to 1 M	7.5	0.024	0.18

80% remainder activity was observed, and 64% after 30 minutes at 93°C.

DISCUSSION

Many procedures are reported to be effective for lysozyme purification (Jollès and Jollès, 1984) where often a chitin column is recommended (Fletcher and White, 1976; McHenry and Birkbeck, 1982). The purification procedure presented here seems to be effective and rather simple from the crystalline styles of *Ch. islandica* where 0.18 mg of protein with high lysozyme activity were obtained from 170 mg of protein from the crude preparation of styles. The crystalline styles are composed of fairly homogeneous material with high lysozyme concentration compared to extracts of the whole animal (McHenry and Birkbeck, 1979). However, the purification of large quantities of lysozyme is difficult without a rich source.

Lysozyme from the scallop was not purified to complete homogeneity by ion exchange chromatography using a carboxymethyl cellulose column. Therefore, it was necessary to rechromatograph the fraction by FPLC on a Mono S column, in order to reduce impurities as judged by the FPLC elution pattern.

The specific activity of lysozyme from *Ch. islandica* was substantially higher than

actividad a un pH de 4.8-5.0. Cuando se utilizó NaCl en un 1% en la mezcla de incubación, la máxima actividad registrada fue al mismo pH, siendo éste 4.7. Con una concentración hasta de 0.2 M de NaCl en la mezcla de incubación, tan solo un 10% de actividad residual con respecto al máximo pudo ser observada (Fig. 5).

La Figura 6 muestra la actividad de la lisozima de la almeja ártica en función a la temperatura, actividad que está representada en porcentaje con respecto a su máximo. La actividad de la lisozima tuvo su máxima actividad a 37°C, y el 67% de la actividad residual fue observada a 4°C. Cuando se utilizó HEWL bajo las mismas condiciones, en su pH óptimo casi no fue registrada actividad a tan baja temperatura. La actividad fue estimada a una concentración de proteína de 11 µg/ml a un pH de 5.0 para la lisozima de la almeja ártica, y 14 µg/ml a un pH de 6.2 para HEWL. La Figura 7 muestra que la lisozima de la almeja ártica puede ser calentada durante 30 minutos a 45°C sin registrar ningún cambio en la actividad. Después de 10 minutos a 93°C se observó un 80% de actividad residual, y 64% después de 30 minutos a 93°C.

DISCUSION

Muchos procedimientos reportados han mostrado ser efectivos para la purificación de

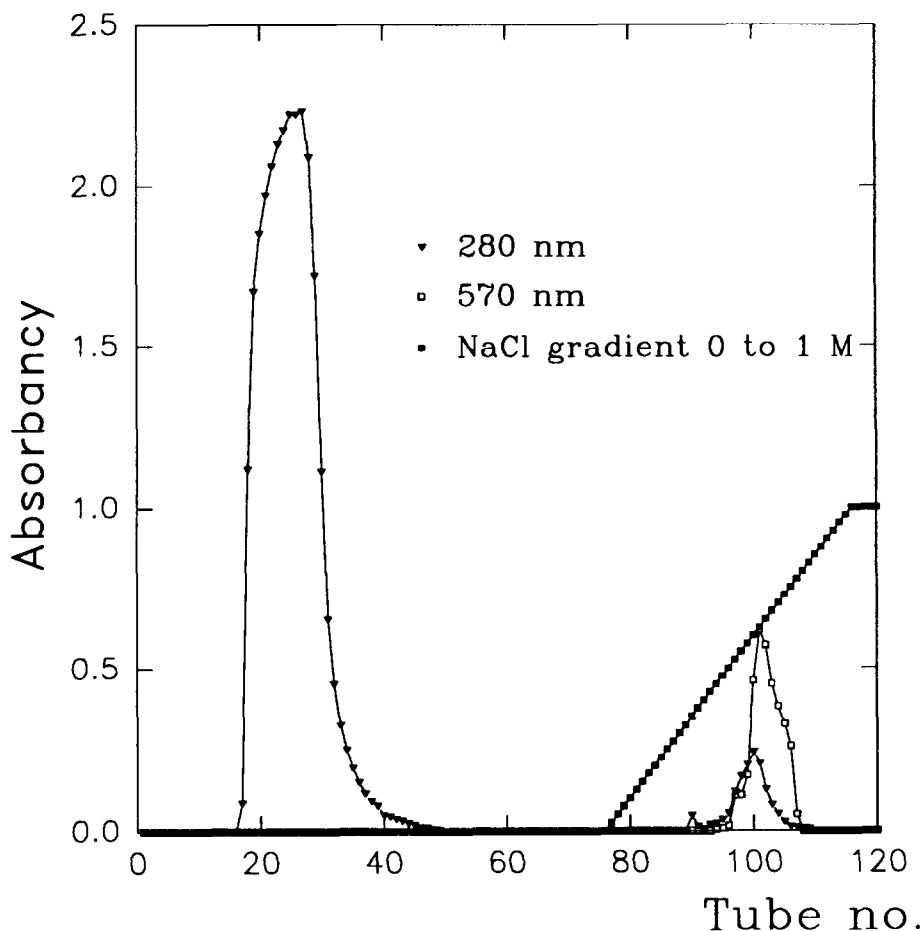


Figure 1. Ion exchange chromatography (CM-32 cellulose column) with NaCl elution gradient (0 to 1 M). Protein content was measured by absorbancy at 280 nm. Lysozyme activity using *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate is given by absorbancy at 570 nm.

Figura 1. Cromatografía por intercambio iónico (columna CM-32 de celulosa) con un lavado por gradiente de NaCl (0 a 1 M NaCl). El contenido proteico fue calculado por absorbancia a 280 nm. La actividad de la lisozima está dada por la absorbancia a 570 nm, usando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato.

that of hen egg white lysozyme (HEWL). The activity was calculated from the change in absorbance for the first six minutes of incubation, resulting in 486,090 U/mg for *Ch. islandica* lysozyme and 17,600 U/mg for HEWL. The enzyme activity for both enzymes was performed under the same incubation conditions at its corresponding pH optimum since HEWL does not show any activity at the corresponding pH optimum for the lysozyme from *Ch. islandica*. As can be observed

lisozima (Jollès y Jollès, 1984) donde generalmente se recomienda el empleo de quitina (Fletcher y White, 1976; McHenry y Birkbeck, 1982). El procedimiento de purificación presentado aquí parece ser efectivo para la lisozima de los estiletes de la almeja ártica *Ch. islandica*, donde se obtuvieron 0.18 mg de proteína con una alta actividad enzimática a partir de 170 mg de proteína contenida en la preparación cruda de los estiletes. Los estiletes están compuestos por un material bastante

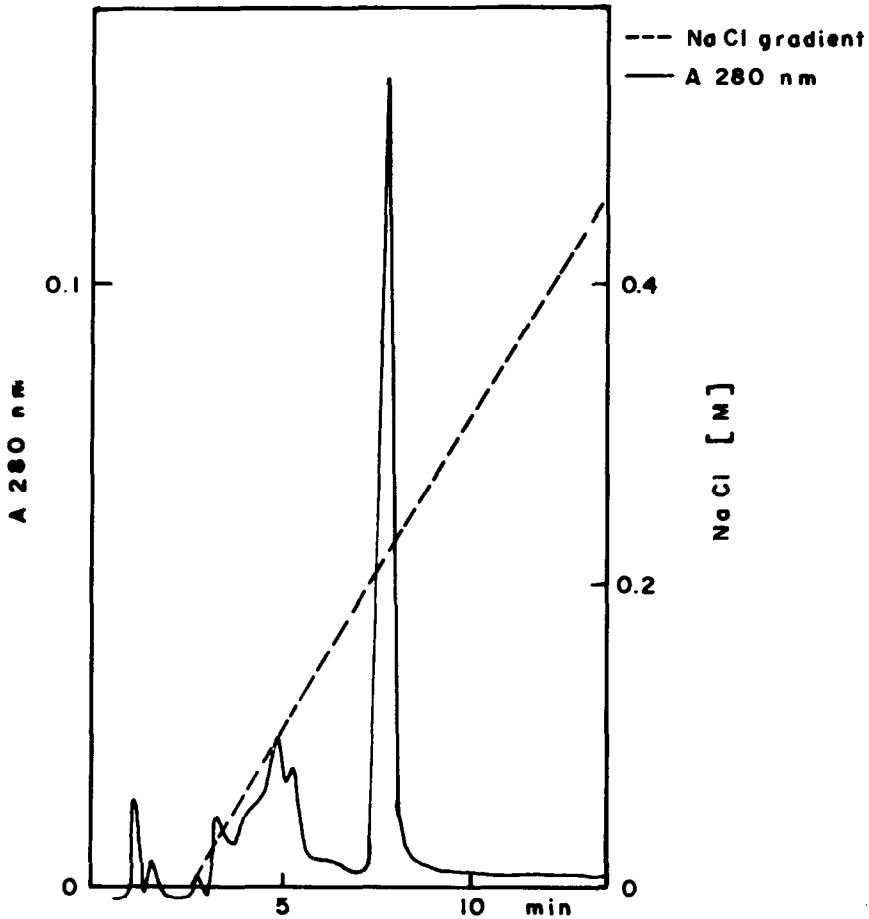


Figure 2. Ion exchange chromatography of lysozyme from the scallop *Chlamys islandica*. The Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system of Pharmacia was used with a Mono S cation exchange column. Protein solution, 250 μ l (11 μ g/ml), eluted with NaCl gradient (0 to 1 M) at 0.5 ml/min.

Figura 2. Cromatografía por intercambio iónico de *Ch. islandica*. El sistema de "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) de Pharmacia fue utilizado con una columna de intercambio catiónico Mono S. Se utilizó una solución proteica de 25 μ l (11 μ g/ml), lavada con un gradiente de NaCl (0 a 1 M) a 0.5 ml/min.

in Figure 3, the lysozyme from the crystalline style of *Ch. islandica* has a higher change in absorbance than HEWL, which is more pronounced during the first minute. If the change in absorbance from the first minute is not considered, the specific activity of the lysozyme from *Ch. islandica* drops to 326,610 U/mg, whereas the activity in HEWL does not show a substantial change. However, the difference in specific activity is still rather high. The specific activity of HEWL presented

homogeneous with a high concentration of lysozyme compared with the extracts of the whole animal (McHenry and Birkbeck, 1979). Es por esto que la purificación en grandes cantidades pueda ser difícil sin una fuente rica de material.

La lisozima de la almeja ártica no se purificó homogéneamente mediante la columna de carboximetil celulosa, siendo entonces necesario el recromatografiar la fracción a través de FPLC, utilizando una columna

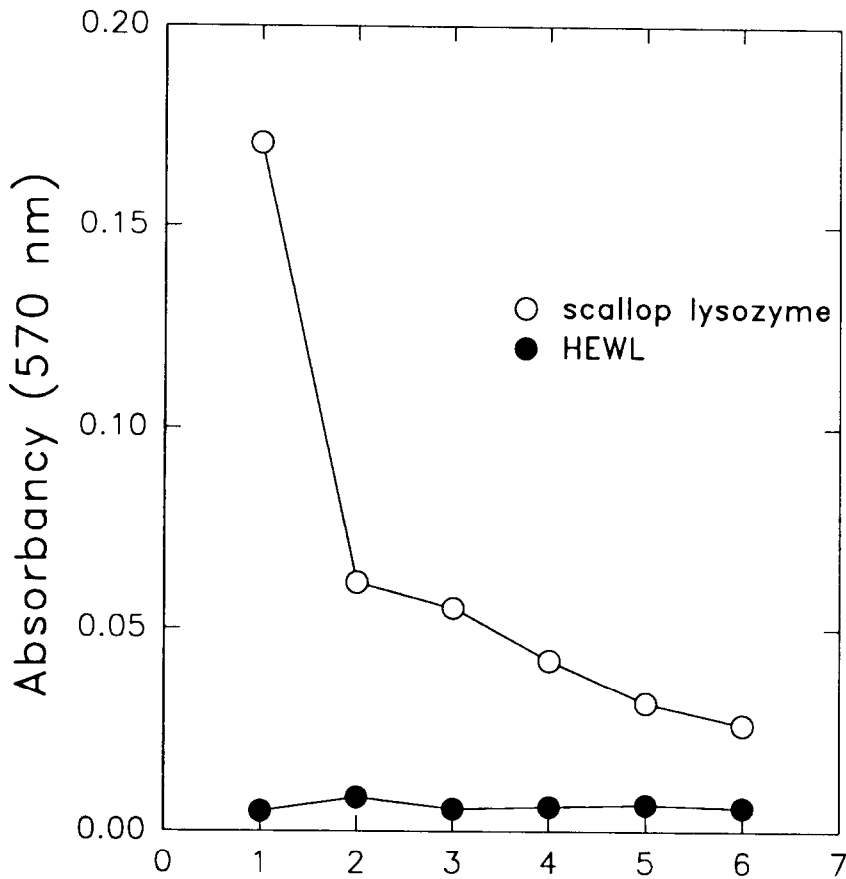


Figure 3. Specific activity of lysozyme from the scallop (*Chlamys islandica*) and the hen egg white lysozyme (HEWL). Activity is represented as the change in absorbancy per minute during the first six minutes using *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. Both at the same temperature and its respective optimum pH (5.0 and 6.2 respectively).

Figura 3. Actividad específica de *Ch. islandica* y de lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL). La actividad está representada como el cambio en absorbancia por minuto durante los primeros seis minutos utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. Ambos a la misma temperatura y a su respectivo pH óptimo (5.0 y 6.2 respectivamente).

here, seems to be lower than that reported by Sigma (50,000 U/mg) and higher than that described in the Worthington enzyme manual (8-12,000 U/mg). These differences may be due to methodology (Sigma, 1990; Worthington, 1979). However, the specific activity of HEWL represents 3.6% of that of lysozyme-like enzyme from *Ch. islandica* when the change in absorbance for the first six minutes is considered, and 5.3% when the first minute is not considered. Other lysozymes

Mono S (intercambio catiónico) para reducir impurezas, según puede juzgarse mediante el perfil del lavado por FPLC.

La actividad específica de la lisozima de *Ch. islandica* fue substancialmente más alta que la de HEWL. La actividad fue calculada a partir del cambio en absorbancia durante los primeros seis minutos de incubación, resultando en 486,090 U/mg para la lisozima de *Ch. islandica* y 17,600 U/mg para HEWL. La actividad enzimática para las dos enzimas fue

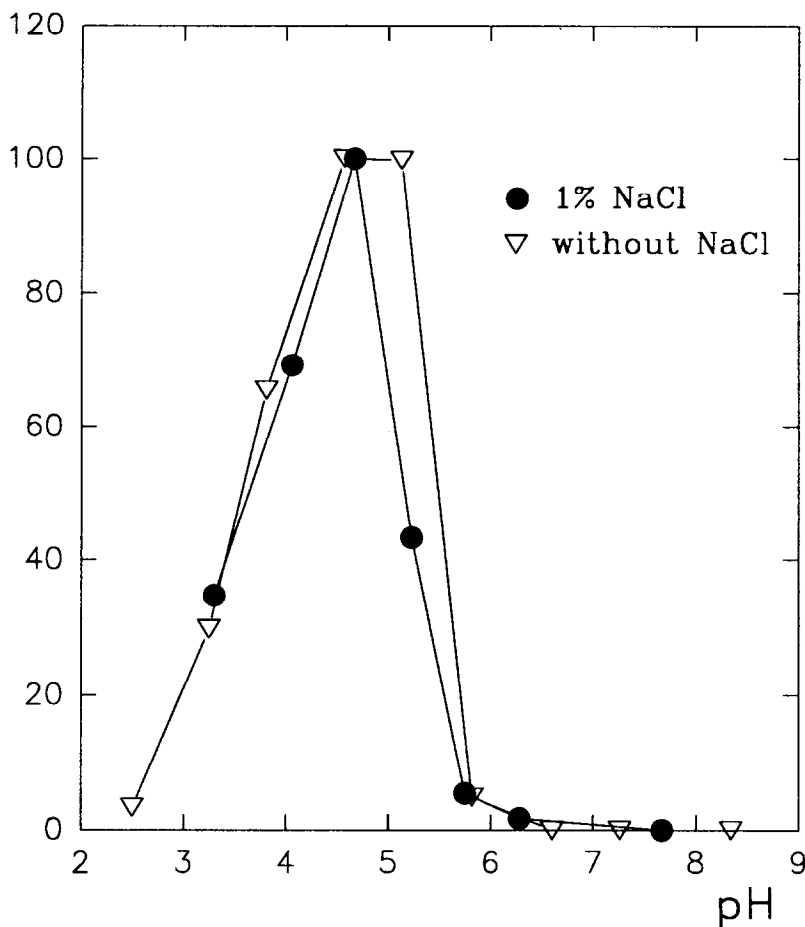


Figure 4. Lysozyme activity from *Chlamys islandica* as a function of pH. Activity was measured as the change in absorbancy at 570 nm using *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate. Activity was registered with and without 1% NaCl in the incubation mixture.

Figura 4. Actividad de la lisozima de *Ch. islandica* como función del pH. La actividad fue medida como el cambio en la absorbancia a 570 nm utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad fue registrada con y sin 1% de NaCl en la mezcla de incubación.

reported have shown big differences in specific activity. Mulvey *et al.* (1972) reported that lysozyme from the human milk has four times higher specific activity than the hen egg white lysozyme. However, the lysozyme activity from *Ch. islandica* style shows a very high specific activity.

Figure 4 shows the pH activity curve of lysozyme from *Ch. islandica*. Using *M. lysodeikticus* as the substrate, the lysozyme-like enzyme had its maximum activity at pH 4.8-5.0. McHenry and Birkbeck (1982) conclude that lysozyme from *Mytilus edulis* has

probada bajo las mismas condiciones de incubación, pero a su correspondiente pH óptimo; esto, para que ambas enzimas pudieran ser juzgadas respecto a su actividad máxima. Como puede ser observado en la Figura 3, la lisozima del estilete de la almeja *Ch. islandica* tiene un cambio en absorbancia más alto que en HEWL, diferencia que es mucho más pronunciada durante el primer minuto. Si el cambio en absorbancia del primer minuto no es considerado, la actividad específica de la lisozima de la almeja ártica cae hasta 326,610 U/mg, mientras que la actividad en

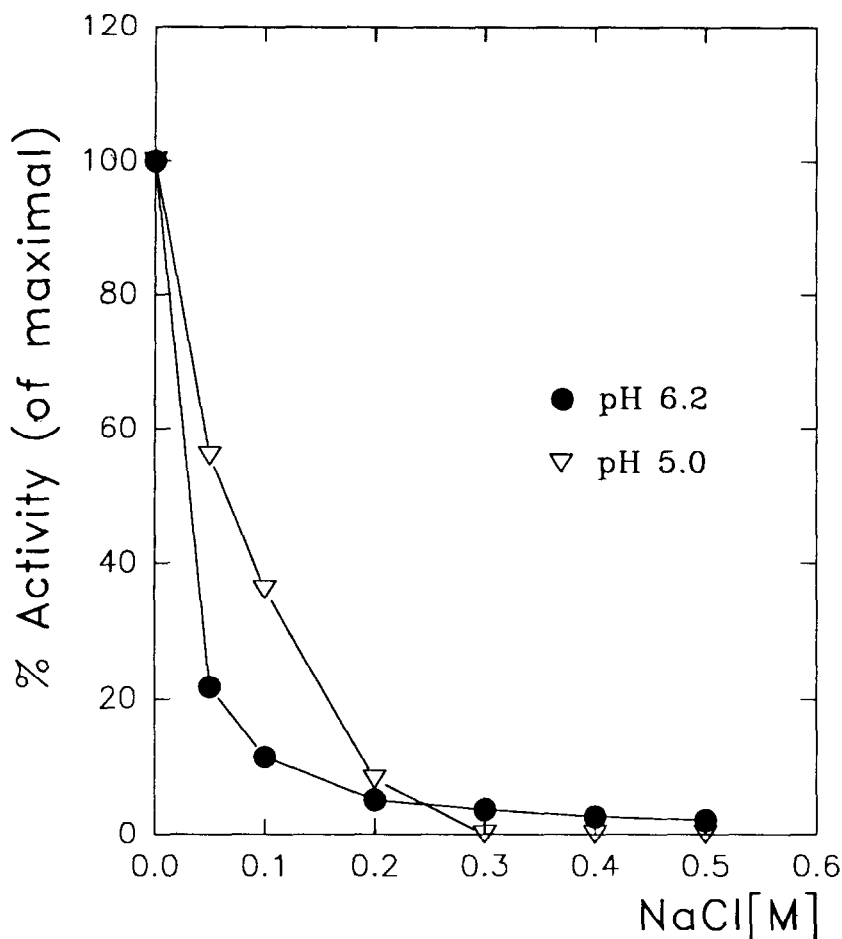


Figure 5. Lysozyme activity from *Chlamys islandica* as a function of NaCl concentration. Activity was measured as the change in absorbancy at 570 nm using *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate. Activity was registered at two different pH (5.0 and 6.2).

Figura 5. Actividad de la lisozima de *Ch. islandica* en función de la concentración de NaCl. La actividad fue medida como el cambio en absorbancia a 570 nm utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad fue registrada a dos diferentes pH (5.0 y 6.2).

two different pH optima depending on the ionic strength of the solution. In this work it is demonstrated that the addition of NaCl to the incubation mixture does not affect the pH optimum but the activity itself, as can be observed in Figure 5 where concentrations of up to 0.2 M NaCl in the incubation mixture render a 10% remainder activity of maximal.

The lysozyme activity is rather stable at high temperatures, similar to other types of bivalve lysozymes reported (McHenery and

HEWL no muestra ningún cambio substancial. De cualquier manera la diferencia en actividad específica permanece bastante alta. La actividad específica para HEWL presentada aquí parece ser más baja que la reportada por Sigma (50,000 U/mg) y más alta que la descrita en el manual de enzimas de Worthington (8-12,000 U/mg), diferencias que se deben probablemente a la metodología utilizada (Sigma, 1990; Worthington, 1979). De cualquier forma, la actividad específica de

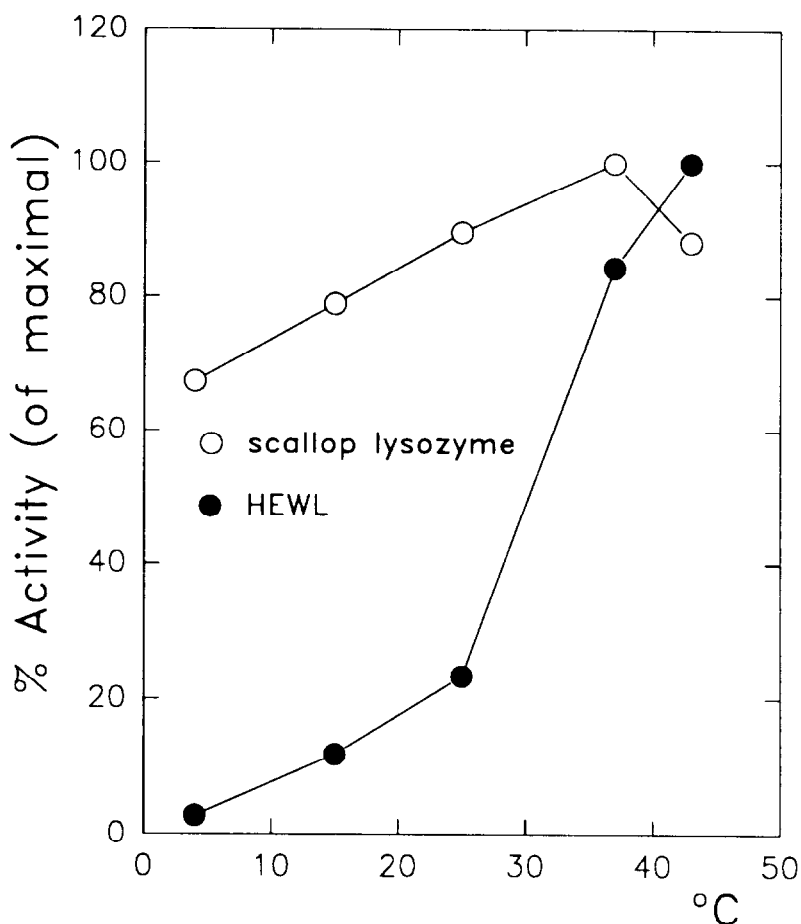


Figure 6. Lysozyme activity from *Chlamys islandica* and hen egg white lysozyme (HEWL) as a function of temperature. Activity was measured as the change in absorbancy at 570 nm using *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate. Activity was registered at its respective optimum pH (5.0 and 6.2).

Figura 6. Actividad de la lisozima de *Ch. islandica* y de la clara de huevo de gallina (HEWL) en función de la temperatura. La actividad fue medida como el cambio en absorbancia a 570 nm utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad fue registrada a su respectivo pH óptimo (5.0 y 6.2).

Birkbeck, 1979; Jollès, 1967). As can be observed in Figure 7, there is an increase in activity from 75°C to 93°C when the enzyme mixture was exposed for 10 and 30 minutes. This particular phenomenon is difficult to explain since protein molecules exposed to high temperatures have a tendency to denaturation due to disruption of tertiary structures. Reversion to the original conditions will sometimes, but not always, result in the protein refolding into the tertiary structure required

HEWL representa el 3.6% de actividad comparada a la actividad encontrada en la lisozima de la almeja ártica cuando se considera el cambio en absorbancia durante los primeros seis minutos, y 5.3% del segundo al sexto minuto. Otras lisozimas reportadas también han mostrado grandes diferencias en la actividad específica. Mulvey *et al.* (1972) reportaron que la lisozima de la leche humana tiene una actividad específica cuatro veces más alta que la de HEWL. De cualquier manera, la lisozimi-

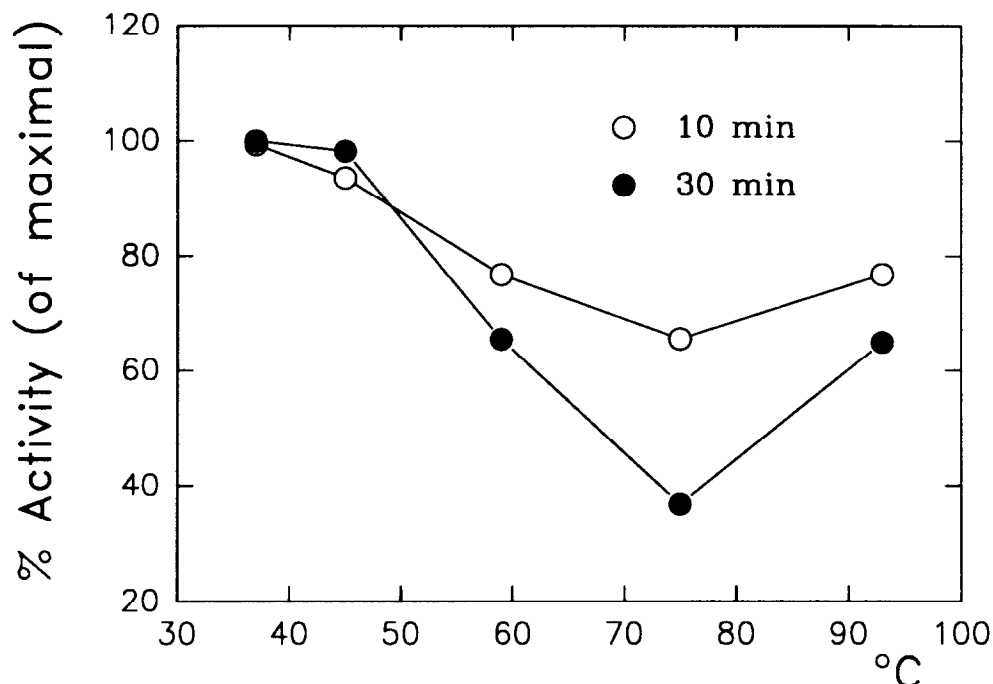


Figure 7. Stability of lysozyme from *Chlamys islandica* at different temperatures. Remaining lysozyme activity was measured as the change in absorbancy at 570 nm using *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. The samples were incubated at different temperatures for 10 and 30 minutes.

Figura 7. Estabilidad de la lisozima de *Ch. islandica* a diferentes temperaturas. La actividad residual fue medida como el cambio en la absorbancia a 570 nm utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. Las muestras fueron incubadas a las diferentes temperaturas durante 10 y 30 minutos.

for functional activity (Palmer, 1985). However, a temperature of 93°C is considered to be high enough to denature irreversibly any type of protein. Therefore, more investigation would be necessary in order to give any conclusion.

CONCLUSIONS

The lysozyme from the crystalline style of *Ch. islandica* was purified by a simple method requiring four steps. A Mono S column by FPLC proved to be effective in order to have one component judged by the elution pattern with very high specific activity, where 0.18 mg protein were obtained from 170 mg protein from the crude extract.

In accordance to some of the biochemical characteristics, it can be concluded that the lysozyme from *Ch. islandica* shows some

ma de *Ch. islandica* presenta alta actividad específica.

La Figura 4 muestra la curva de actividad de la lisozima de *Ch. islandica* a diferentes pH. Utilizando células de *M. lysodeikticus* como sustrato, la lisozima tuvo su máxima actividad a un pH de 4.8-5.0. McHenry y Birkbeck (1982) concluyeron que la lisozima de *Mytilus edulis* tiene dos pH óptimos diferentes dependiendo de la fuerza iónica en solución. En este trabajo se demuestra que la incorporación de 1% de NaCl en la mezcla de incubación no afecta el pH óptimo, aunque sí afecta su actividad, como puede ser observado en la Figura 5 donde una concentración de 0.2 M de NaCl en la mezcla de incubación es suficiente para obtener actividad residual del 10% con respecto a su máximo.

La actividad de la lisozima es bastante estable a altas temperaturas, similar a lo

differences to those reported for other lysozyme-like enzymes. Those differences could be due to the characteristics of the environment they belong to. We are referring to its high activity observed at low temperatures where a 67% remainder activity was observed at 4°C, whereas HEWL did not show any activity at all. The specific activity was extremely high compared to the activity observed for HEWL under the same incubation conditions, where the activity of HEWL represents only 3.6% of that of *Ch. islandica*. NaCl has an inhibitory effect on the activity and did not affect its pH optimum. The lysozyme from the scallop is stable at high temperatures similar to that reported for other lysozymes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Nordic Industrial Foundation for the financial support for this work, and also we want to thank the people from the Marine Biological Station at the University of Tromsø for the supply of scallops.

LITERATURE CITED

- Bratlid, D. (1977). A simple procedure for determination of bacteriolytic activity in biological fluids. *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C*, 85: 17-20.
- Fletcher, T.C. and White, A. (1976). The lysozyme of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Biochem. Physiol.*, 55B: 207-210.
- Hardy, S.W., Fletcher, T.C. and Gerrie, L.M. (1976). Factors in the haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* L., of possible significance as defence mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 473-475.
- Jollès, P. (1967). Relationship between chemical structure and biological activity of hen egg-white lysozyme and lysozymes of different species. *Proc. Roy. Soc. B*, 167: 350-364.
- Jollès, P. and Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63: 165-189.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

observado en lisozimas reportadas anteriormente (McHenery y Birkbeck, 1979; Jollès, 1967). Como puede observarse en la Figura 7, hay un incremento en actividad de los 75 a los 93°C cuando la enzima fue expuesta durante 10 y 30 minutos. Este fenómeno en particular es difícil de explicar, ya que moléculas proteicas expuestas a altas temperaturas tienen la tendencia a desnaturalizarse debido a la ruptura de la estructura terciaria. Cuando dichas proteínas son llevadas a las condiciones originales, algunas veces, pero no siempre, resultarán en el regreso a la estructura terciaria necesaria para tener actividad catalítica (Palmer, 1985). No obstante, una temperatura de 93°C se considera suficientemente alta como para desnaturalizar irreversiblemente cualquier tipo de proteína. Por esto, es necesaria más investigación para dar alguna conclusión al respecto.

CONCLUSIONES

La lisozima proveniente del estilete de *Ch. islandica* fue purificada mediante un proceso simple que consta de cuatro pasos. La columna Mono S de FPLC mostró ser efectiva para la purificación de un componente, juzgado por el perfil de lavado, con alta actividad específica, donde 0.18 mg de proteína fueron obtenidos a partir de un extracto crudo del estilete que contiene 175 mg de proteína.

De acuerdo a las características bioquímicas de la enzima, se concluye que la lisozima de la almeja ártica *Ch. islandica* presenta algunas diferencias con respecto a otras enzimas tipo lisozimas anteriormente reportadas. Diferencias que posiblemente se deban a las características del medio ambiente que habitan. Con esto, nos referimos a la alta actividad observada a bajas temperaturas, donde un 67% de actividad residual fue observada a 4°C, mientras que la HEWL no presentó actividad a dicha temperatura. La actividad específica fue extremadamente alta, comparada con la actividad observada en HEWL incubadas bajo las mismas condiciones, donde la actividad de HEWL representó tan solo el 3.6% de la actividad observada en *Ch. islandica*. El NaCl presentó un efecto inhibitorio en la actividad sin afectar su pH óptimo. Por último, la lisozima de la almeja ártica es estable a altas temperaturas, con resultado similar a lo reportado para otras lisozimas.

- McHenery, J.G. and Birkbeck, T.H. (1979). Lysozyme of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). Marine Biology Letters, 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 marine bivalves. Comp. Biochem. Physiol., 63B: 25-28.
- Mulvey, R.S., Gualtieri, R.J. and Beychok, S. (1972). Comparative studies of the solution behaviour of hen egg white and human lysozyme. In: E.F. Osserman, R.E. Canfield and S. Beychok (eds.), Lysozyme. Academic Press, pp. 31-54.
- Osserman, E.F., Canfield, R.E. and Beychok, S. (1974). Lysozyme. Academic Press, New York and London, 637 pp.
- Palmer, T. (1985). In: Understanding Enzymes. Ellis Horwood Ltd., John Wiley

AGRADECIMIENTOS

Queremos dar las gracias a la Fundación para la Industria Nórdica por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo. También queremos dar las gracias a la gente de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Tromsø, Noruega, por el suministro de las almejas.

Traducido al español por los autores.

-
- and Sons, Chichister, Great Britain, 411 pp.
- Sigma (1990). General Catalogue. Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA.
- Worthington (1979). Enzymes and Related Biochemicals. Millipore Corporation, Bedford, Ma. 01730, USA, 210 pp.