

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“EXTRACCION, CARACTERIZACION DE LA LISOZIMA DE LA
ALMEJA *Tivela stultorum* Y POSIBLES APLICACIONES COMO
AGENTE BACTERICIDA”

TESIS QUE PRESENTA

RUTH ELENA MONTENEGRO ORTEGA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

ENSENADA BAJA CALIFORNIA NOVIEMBRE DE 1995

“EXTRACCION, CARACTERIZACION DE LA LISOZIMA DE LA
ALMEJA *Tivela stultorum* Y POSIBLES APLICACIONES COMO
AGENTE BACTERICIDA”

T E S I S
QUE PRESENTA:

RUTH ELENA MONTENEGRO ORTEGA

Aprobada por:

Presidente del jurado

Dra: Maria Teresa Viana Castrillón

SINODAL

M.C.Félice Correa Díaz

SINODAL

M.C Denisse Re-Araujo

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 mg de proteína, representando una purificación de 100 veces. De esta manera la actividad específica observada fue casi seis veces mayor a la actividad de la lisozima de clara de huevo de gallina. Mediante electroforesis de punto isoelectrico (IEF-PAGE, Phast Gel) se observó un componente predominante indicando un pI de 7.7. Por medio de electroforesis de una dimensión (SDS-PAGE) se sugiere un peso molecular aproximado a 17 kDa. La enzima fue óptimamente activa a pH de 5.6-5.8, en amortiguador citrato fosfato 0.1M, con actividad máxima a una temperatura de 40°C, en ausencia de sal, y a una fuerza iónica de 0.1043. A 4°C la lisozima presentó un 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 intervalo de pHs de 2.8 a 11.8. Mediante las pruebas bacterianas utilizando *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli*, se observó que la lisozima de *T. stultorum* (LT) mostró ser efectiva en la lisis de ambas bacterias, aún sin la presencia de EDTA, al igual que la lisozima de *Chlamys islandica* (LC) y al contrario que la lisozima de huevo de gallina (LH), quien requirió de EDTA. En LT se observó un efecto sinérgico con el EDTA, siendo mayor cuando *E. coli* se probó en comparación de *S. alfa*, mientras que LC no presentó diferencias en presencia o ausencia de EDTA hacia *E. coli*. LT en ausencia de EDTA, tuvo mayor sensibilidad hacia *S. alfa* que *E. coli*, mientras que LC fue mayor en *E. coli*. En presencia de EDTA LC no presentó diferencias entre *S. alfa* y *E. coli*, mientras que LT y LH fueron más sensibles hacia *S. alfa* que *E. coli*.

“La esencia de la grandeza radica en la capacidad de optar por la realización personal en circunstancias que otros optan por la locura”

DEDICATORIA

A MI MADRE, por todo el apoyo y comprensión durante tooodos estos años, de lejanía. Gracias

A MI PADRE, por todos sus callados esfuerzos y comprensión que demuestran mucho. Gracias.

A MI HERMANA ELIA, por su nobleza, ayuda y por transmitir su espíritu de superación que es un estímulo para seguir adelante.

A MI HERMANA MARITZA, por su confianza, ayuda emocional, por aguantar tooooooo este tiempo al pie del cañón, simplemente por dar . Mil gracias.

A MI HERMANO EDMUNDO, por su ayuda, consejos y demostrar que si uno quiere, puede cambiar.

A MI ABUELITA ESTELA, en su memoria, por todos los recuerdos imborrables.

A Zaul, por convertir lo imposible en posible, por enseñarme a ver la vida con otro matiz, y por toda su comprensión, paciencia y ayuda incondicional y acertada en los momentos de desesperación. Mil gracias.

A Soledad, Maricarmen, Rocio, y Judith por su cariño comprensión y ayuda, por ser amigas en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en donde se realizó el presente trabajo que formó parte del proyecto "Biotecnología de productos pesqueros para ser aprovechados en la acuicultura."

A la directora de tesis la Dra: Maria Teresa Viana por las facilidades que me brindó durante el desarrollo de la tesis, así como su tiempo y buena disposición, igualmente agradezco a mis sinodales, el M.C. Felipe Correa Díaz por su ayuda incondicional para resolución de dudas y a la M.C. Denisse Re-Araujo, gracias a ambos por sus comentarios y sugerencias para mejorar en calidad y presentación el escrito.

También quiero agradecer al M.C. Juan Antonio Fernández Apango por su valiosa colaboración en el desarrollo del escrito y su ayuda incondicional.

A todas las personas que me ayudaron en un momento u otro para la realización de la tesis, entre ellos a mis compañeros de laboratorio por su compañía y ayuda, a la M.C. Victoria Orozco por las facilidades ofrecidas y sus comentarios de gran utilidad, al M.C. Ricardo Searcy por su colaboración en la parte estadística, al diseñador gráfico Raúl Gutierrez por su gran ayuda en la limpieza e impresión de las fotos y a José Manuel por su ayuda incondicional en la computadora. MUCHAS GRACIAS.

Quiero expresar mi especial gratitud por la Dra: Meredick y el Dr: Estefano quienes de manera incondicional me brindaron su ayuda durante el desarrollo de la tesis. Gracias por ser como son.

INDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	10
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos	
Obtención de organismos, disección y separación de estiletes cristalinos.....	14
Purificación de la lisozima	14
Análisis enzimático.....	15
Determinación de peso molecular y punto isoelectrico.....	16
Caracterización de la lisozima	
pH óptimo.....	17
Temperatura óptima.....	17
Efecto del NaCl sobre la actividad enzimática.....	18
Molaridad óptima.....	18
Estabilidad térmica.....	18
Estabilidad a diferentes pHs.....	19
Pruebas bacterianas	
Preparación de las cepas bacterianas.....	20
Ensayo.....	20
Tratamientos.....	21
Análisis estadístico.....	22
Resultados.....	23
Discusiones.....	45
Conclusiones.....	53
Bibliografía.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Secuencia de fraccionación para la purificación de la lisozima de la almeja <i>Tivela stultorum</i>	27
Tabla 2.- Características de la lisozima de la almeja <i>Tivela stultorum</i>	32
Tabla 3.- Resultados del análisis de varianza de una via (no paramétrico y paramétrico) realizado a el efecto de las lisozimas (LT,LC y LH) en presencia y ausencia de EDTA hacia bacterias <i>S. alfa</i> y <i>E. coli</i>	41
Tabla 4.- Comparación entre medianas para detectar el efecto lítico de cada lisozima (LT, LC, LH) en presencia o ausencia de EDTA, en <i>S. alfa</i> y <i>E. coli</i> . Análisis de dos muestras (Mann-Whitney).....	44
Tabla 5.- Comparación entre medianas para detectar el efecto lítico de las lisozimas (LT, LC, LH) hacia las bacterias <i>S. alfa</i> y <i>E. coli</i> en presencia y ausencia de EDTA. Análisis de dos muestras (Mann-Whitney).....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Cromatografía de intercambio iónico (CM-celulosa) del homogenado con un gradiente de elución de 0-1M de NaCl.....	25
Figura 2. Cromatografía de Intercambio iónico II (CM- celulosa) del grupo 1b (cromatografía 1), con un gradiente de elución de 0-1M de NaCl.....	26
Figura 3. Electroforesis de punto isoelectrico (pI) del componente IIa en gel homogéneo de poliacrilamida (IEF-PAGE), con un gradiente de 5-9, mediante -- Phast system.....	30
Figura 4. Electroforesis de peso molecular (pM) del componente IIa en gel homogéneo de poliacrilamida (20%) (SDS-PAGE), mediante Phast system.....	31
Figura 5.-Actividad relativa residual de la lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en función del pH.....	33
Figura 6.-Actividad relativa residual de la lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en función del pH, después de haber sido incubada durante 30 y 60 minutos a 4°C.....	34
Figura 7.- Actividad relativa residual de la lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en función de la concentración molar.....	36
Figura 8.- Actividad relativa residual de la lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en función de la fuerza iónica.....	37
Figura 9.-Actividad relativa residual de la lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en función de la temperatura.....	38
Figura 10.-Actividad relativa residual de la lisozima de <i>tivela stultorum</i> en función de la temperatura, después de haber sido incubada durante 10 y 30 minutos.....	39
Figura 11.- Ensayo de LT, LC, LH y sus respectivas mezclas con EDTA en gel de agarosa conteniendo (A) <i>S. alfa</i> y (B) <i>E. coli</i>	42

INTRODUCCION

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas cuya propiedad fundamental es aumentar la velocidad de una reacción, sin sufrir un cambio en sí mismas durante el proceso (Lehninger, 1985). Estas, generalmente operan a pHs medios (entre 4 y 8), temperaturas relativamente bajas (entre 10 y 80°C), y presiones atmosféricas normales. Las enzimas han resuelto en gran parte el interés de la industria por la utilización de productos a partir de fuentes naturales, que no contaminen, que sean biodegradables y tengan el potencial de ser reutilizados. Las enzimas destinadas a la industria provienen de extracción directa de su fuente original (ya sea en forma pura, parcialmente pura, o en crudo), o bien, por extracción indirecta mediante la clonación de bacterias a genes que impliquen la secreción de dichas proteínas en gran cantidad, mediante ingeniería genética (Branden y Tooze, 1991). Independientemente de cual sea el camino para la extracción y producción de enzimas a nivel comercial, la búsqueda de enzimas interesantes es una labor de gran importancia.

Las enzimas han sido clasificadas de acuerdo a su función en seis tipos distintos (Trevor, 1991). En el grupo de las hidrolasas se encuentran las lisozimas (EC 3.2.1.17), que están ampliamente distribuidas en la naturaleza, tejidos y secreciones tanto en vertebrados, invertebrados, así como también en bacterias y plantas (Jollés y Jollés, 1984). La lisozima es una enzima 1,4 B N-acetilmuramidasa, porque rompe los enlaces glucosídicos entre el C-1 del ácido N-acetilmurámico y el C-4 de la N-acetilglucosamina, en el peptidoglucano bacteriano (Jollés y Jollés, 1984), aunque algunas lisozimas

presentan actividad quitinasa (EC 3.2.1.14) (Skujins *et al.*, 1973) y en la lisozima de huevo de gallina se ha reportado una ligera actividad esterasa (Jollés y Jollés, 1984). Todas las lisozimas aisladas hasta ahora constituyen proteínas similares aunque no idénticas, ya que varían en peso molecular y actividad específica (Osserman *et al.*, 1974).

Por su actividad, las lisozimas se encuentran asociadas primariamente a un mecanismo de defensa, donde desarrollan un papel fundamental en los invertebrados, mientras que en organismos superiores juegan un papel secundario (Lindsay, 1986). El hecho de que las lisozimas estén presentes en la mayoría de los organismos vivos nos indica que es una enzima que ha venido desde épocas ancestrales. Como toda proteína en evolución, ha tenido que ir adaptándose a los diferentes medios ambientes, adquiriendo características o habilidades diversas en los diferentes grupos de organismos (Jollés y Jollés, 1984). Por este hecho, se ha incrementado el interés por el estudio de enzimas de origen marino durante los últimos 15 años (Olafsen, 1983), especialmente si provienen de organismos que habitan medios ambientes extremos de pH, salinidad y temperatura (Hochachka y Somero, 1984).

Las enzimas tipo lisozima, son nombradas de tal manera, porque presentan una función similar a la lisozima de huevo de gallina, la cual ha sido ampliamente estudiada, además de ser la primera en secuenciarse, detallando su mecanismo de acción (Jollés y Jollés, 1984). Su actividad es determinada comunmente mediante el método turbidimétrico en el cual se mide el decremento en absorbencia de una suspensión de células bacterianas (Gorin *et al.*, 1971). Se caracteriza por tener actividad máxima a una temperatura de 37-40°C, presentando un 20% de actividad a los 20°C y 4% a los 4°C, a

una fuerza iónica de 0.01M (Viana y Raa, 1992). Es una enzima básica, con un punto isoelectrico de 11 y un peso molecular de 14.4 kDa (Worthinton, 1979). Al utilizar *Micrococcus lisodeikticus* como sustrato (Bratlid, 1977) presenta una actividad máxima cuando se encuentra en presencia de 1% de NaCl a un pH de 7. De tal manera que a pH de 4 ó 5 presenta sólo rasgos de actividad (Iacono *et al.*, 1985).

La lisozima de huevo de gallina es ampliamente utilizada en forma comercial, se extrae a partir de la clara de huevo de gallina que es una rica fuente de ésta enzima (Jollés *et al.*, 1965). Ha sido utilizada con diversas aplicaciones, ya sea sola o asociada a otros componentes como antibióticos (tetraciclina, bacitracina), enzimas (alfa-amilasa, papaina), y vitaminas (Jollés y Jollés, 1984), probando ser eficiente en el tratamiento de enfermedades bacterianas o virales (herpes), colitis, dolores (Bianchi, 1983), alergias e inflamaciones (Jollés y Jollés, 1984) y hasta en el tratamiento de tumores de cáncer (Das *et al.*, 1992).

A las lisozimas se les ha atribuido el papel de la inmunoestimulación, por el incremento en la producción de anticuerpos ante un ataque bacteriano (Klockars y Roberts, 1976), además de estar relacionadas a la acción de los macrófagos (Biggar y Sturgess, 1977), en donde su presencia dependiendo de la calidad y localización de la enzima, ha sido utilizada en el diagnóstico de enfermedades (Porstmann *et al.*, 1989).

En la industria alimenticia la lisozima de huevo de gallina se agrega como un agente de conservación (Wasserfall y Teuber, 1979; Hughey y Johnson, 1987; Hughey *et al.*, 1989) evitando el desarrollo de bacterias agresivas, es decir, aquellas que presentan alta capacidad para desarrollarse en alimentos, causando problemas de descomposición

aún a bajas temperaturas. Otro uso es como sustitutos de leche materna para reemplazar los anticuerpos (Dubois-Prevost, 1970; Koivisto *et al.*, 1973; Haneberg y Finne, 1974; Fox, 1982).

La utilización de la lisozima de huevo de gallina como conservador, ha resultado ser muy atractiva, porque cada vez es mayor la tendencia de la industria alimenticia a eliminar compuestos químicos. Su uso en la preservación de productos marinos (Igarashi y Zama, 1972), trae muchas ventajas, por ser alimentos altamente sensibles a la descomposición, debido al acelerado desarrollo microbiano de bacterias agresivas, al ser un medio rico de nutrientes para su crecimiento (Alegre - Salazar, 1979). Sin embargo a pesar de su utilidad en la industria alimenticia, la lisozima tiene aplicaciones limitadas, específicamente en la conservación de productos marinos, porque presentan en su mayoría bacterias gram (-) (Huss, 1988), las cuales no son normalmente degradadas por la lisozima y requieren de la sensibilización por medio de EDTA (Repaske, 1958), el cual resulta tóxico cuando se ingiere a concentraciones mayores a 1.25 mg/kg/día (Chander y Lewis, 1980).

El hecho de que el EDTA funcione como un sensibilizador, para favorecer la acción de la lisozima, ha sido interpretado como una posible quelación de iones metálicos en la pared celular. Las bacterias gram (+) y (-) poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos, pero en las gram (-) además está presente una pared rígida (mucopéptidica) formada de lipopolisacáridos y lipoproteínas la cual está ausente en las bacterias gram (+), sin embargo éstas últimas tienen una pared que no es uniforme para

todas las bacterias de su tipo, ya que presenta variaciones en los aminoácidos que se entrelazan a los peptidoglucanos (Cota-Robles y Ringo, 1982).

En la mayoría de los casos estudiados, la combinación de lisozima de huevo de gallina con EDTA ha dado una mejor lisis, inhibición o retardo en el crecimiento de bacterias, que el efecto mostrado por la lisozima de manera individual (Hugey *et al.*, 1989; Samuelson *et al.*, 1985; Chander y Lewis, 1980). Por otro lado el uso de concentraciones elevadas de EDTA (0.5%) ha mostrado una inhibición completa en la multiplicación de las células, aún en ausencia de lisozima, en donde tal concentración rebasa el límite considerado como tóxico, en cambio concentraciones de 0.01 y 0.05% no muestran acción alguna (Chander y Lewis, 1980).

La mayor afinidad de la lisozima de huevo de gallina hacia bacterias gram (+), en algunos casos no ha sido cumplida. Shahani y Kilara (1974) han reportado la existencia de bacterias gram (+) que no han sido lisadas por la lisozima de huevo de gallina, tal es el caso de *Clostridium perfringes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Esto implica que la efectividad de la lisozima de huevo de gallina no depende exclusivamente del tipo de pared bacteriana, resultando importante tomar en cuenta la composición de la misma. Como se mencionó anteriormente la composición química de la pared de las bacterias varía aún dentro del mismo tipo de bacteria, siendo importante para su agresividad a desarrollarse e impedir su bloqueo. Aunado a esto se encuentra la capacidad de algunas bacterias para generar enfermedades mediante la producción de antígenos usualmente conocidos como toxinas. Las bacterias patógenas pueden producir dos tipos de toxinas, las exotoxinas y las endotoxinas, las exotoxinas son secreciones proteicas producidas por

microorganismos gram (+) y gram (-), que anulan la síntesis de proteínas o bloquean transmisiones del sistema nervioso central (por ejemplo las producidas por *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* provocadoras de botulismo e infecciones piogénicas respectivamente) (Van Heyningen, 1982). Las endotoxinas, están constituidas por un complejo formado de polisacárido, proteína y lípido que forma parte de los componentes estructurales de la pared celular, presente en las bacterias gram (-), el lipopolisacárido está compuesto de tres regiones (lípido, polisacárido y antígeno O), en donde cada una de ellas tiene una composición única que varía entre las especies de bacterias (Braude, 1982). Si bien, la patogenicidad y/o agresividad de las bacterias a desarrollarse no depende exclusivamente de la presencia de pared celular rígida, una gran cantidad de bacterias patógenas o agresivas en su desarrollo son del tipo gram (-) (Huss, 1988), que al mismo tiempo son las más difíciles de degradar por la lisozima de huevo de gallina en ausencia de EDTA.

Purificación

La necesidad de un conocimiento más completo de las enzimas ha dado la pauta para el desarrollo de técnicas especializadas para su extracción. De esta manera las enzimas de diversos organismos han sido purificadas y caracterizadas, incrementando el conocimiento de la estructura secundaria y terciaria, así como la determinación de la composición y secuencia de aminoácidos. Con esto, ha sido posible el determinar las actividades particulares de cada proteína, estableciendo su especificidad de acción y posible uso.

El aislamiento y purificación de una enzima a partir de una fuente natural, involucra la selección de la enzima, concentrándola, mientras que se descartan todos los demás compuestos (Minch, 1989).

La mayoría de las enzimas han sido purificadas mediante procedimientos clásicos dependiendo de la fuente de extracción y de un conocimiento amplio de las características de las proteínas, permitiendo de ésta manera llegar a conocerlas.

Entre los pasos iniciales para la fase de extracción de una enzima es el escoger una fuente natural que tenga concentraciones elevadas de la enzima a extraer y que se encuentre disponible en cantidades suficientes para la obtención de datos reproducibles. La técnica a utilizar para la extracción de la enzima dependerá del tipo de tejido en el que se encuentre, ya sean técnicas suaves, moderadas o vigorosas, como homogeneizador de mano, trituración con abrasivos y ultrasonificación respectivamente (Scopes, 1988). El manejo de la enzima deberá ser siempre en frío para evitar la desnaturalización, así como el evitar congelar y descongelar repetidas veces, ya que esto puede afectar membranas y cambiar el pH del medio.

El uso del amortiguador adecuado, así como su concentración y pH es importante para evitar interacciones indeseables entre enzima y amortiguador que puedan disminuir la actividad. El conocimiento previo de los efectos de compuestos utilizados en la purificación ya sean detergentes, quelantes, inhibidores, o agentes reductores, es muy importante para evitar errores durante la purificación.

Los procedimientos tradicionales incluyen un paso de prepurificación que generalmente consiste de el uso de alguna técnica de rompimiento celular, solubilización

de la proteína con NaCl o acidificación para la remoción de material particulado. En este paso se incluyen técnicas de separación en grueso, como la precipitación por sales, por solventes orgánicos, o separaciones usando el punto isoelectrico y desnaturalización selectiva. La separación entre soluto y solvente se realiza por medio de centrifugación, mientras que la separación de solutos de bajo peso molecular es mediante diálisis.

El segundo paso de purificación consta de formas más especializadas de separación como los métodos cromatográficos que proporcionan un mayor incremento en la pureza de la proteína (Scopes, 1988). Dentro de éstos métodos están la cromatografía de exclusión molecular, afinidad, hidrofóbica, de fase reversa, y la cromatografía de intercambio iónico. Esta última tiene como característica principal la atracción entre partículas de carga opuesta. Muchos materiales biológicos tienen grupos ionizables y el hecho de que puedan portar una carga neta positiva o negativa se utiliza para la separación de mezclas de éstos compuestos. La carga neta exhibida por dichos compuestos depende del pH de la solución y del punto isoelectrico (pI) del producto, cuando el pI es mayor al pH de la solución la carga neta es positiva, y cuando el pI es menor a el pH de la solución la carga neta es negativa (Williams y Wilson, 1981).

En la purificación de la lisozima se han utilizado cromatografía de intercambio iónico basada en la carga iónica de la proteína, usando diferentes resinas catiónicas como CM-Sepharosa GL-6B para la purificación de la lisozima de la trucha arcoiris (Grinde *et al.*, 1988), CM-celulosa para la purificación de lisozima del pez *Pleuronectes platessa* (Fletcher y White ,1976); así como del mejillón *Mytilus edulis* (McHenery y Birkbeck, 1979) y de la almeja *Chlamys islandica* (Viana y Raa, 1992) entre otros. También han

sido utilizados métodos cromatográficos como el de exclusión molecular basado en la separación por peso molecular, con resinas G-25 y G-75 cuyo pequeño tamaño de poro es útil en la separación de la proteína. Recientemente se ha usado cromatografía de afinidad para aumentar el grado de purificación, así como también se utiliza el alto punto isoelectrico de la lisozima para su separación de otras proteínas (Jollés y Jollés, 1984).

ANTECEDENTES

La lisozima se ha descrito en diferentes fluidos y tejidos de un gran número de especies de bivalvos marinos (McDade y Tripp, 1967; McHenery *et al.*, 1979; Birkbeck y McHenery 1982; Viana y Raa, 1992), que aparte de contener grandes concentraciones de ella en la hemolinfa y secreciones externas, lo cual ha sido descrito como un mecanismo de defensa (McDade y Tripp, 1967; Hardy *et al.*, 1976; McHenery *et al.*, 1979), se encuentra también en tejidos y estructuras que están particularmente asociadas con el proceso digestivo, como la glándula digestiva y el estilete cristalino. Esto ha sido confirmado en *Chlamys opercularis*, *Tellina tenuis*, *Mytilus edulis* y *Modiolus modiolus* (McHenery *et al.*, 1979) entre otras, y se sugiere que las bacterias forman parte de la alimentación de estos organismos debido a que son filtradores, y pueden obtener una ganancia del 12.4% en peso, al ser alimentados con una dieta de bacterias (Zobell y Feltham, 1938).

Las lisozimas marinas caracterizadas han demostrado tener especificidades de acción diferentes a las encontradas por la lisozima de huevo de gallina, observando que en general trabajan a pHs más ácidos, entre 4 y 6 (McHenery y Birkbeck, 1982) y algunas como en la almeja ártica *C. islandica* (Viana y Raa, 1992) y el langostín *Astacus astacus* (Fenouil y Roch, 1991) presentan actividades altas a temperaturas bajas.

El uso de lisozimas capaces de funcionar a temperaturas bajas, es por lo tanto una alternativa para complementar el efecto de bajas temperaturas a los que son sometidos los alimentos para mantenerlos adecuadamente, ya que aún bajo condiciones extremas de temperatura, existen microorganismos encontrados de manera natural y adaptados a ellas

(Gounot, 1991), capaces de crecer a temperaturas de refrigeración (0-2 y 5-7°C), en donde *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Streptococcus* son los más frecuentes en comidas.

La diferencia principal de tales lisozimas marinas radica en su mayor sensibilidad a las bacterias gram (-), sin la adición de EDTA. Tomando en cuenta que la actividad microbiológica principal en productos marinos pertenece a bacterias gram (-) (Huss, 1988), las lisozimas marinas que difieren en sus características de acción, presentan un potencial de empleo para el retardamiento en la descomposición de productos marinos.

En la elaboración de productos alimenticios, uno de los aspectos que requieren de gran atención es el control de *Escherichia coli* y especies de *Streptococcus*, organismos que han sido utilizados como índice de calidad sanitaria, cuya presencia está relacionada con contaminación fecal. Su control es importante ya que son especies agresivas por crecer en un amplio intervalo de temperaturas y pHs (3-50°C y 4.4-9). Así mismo, los estreptococos son organismos que poseen en su pared celular (no rígida), compuestos antigénicos que presentan una extrema resistencia a degradación por la lisozima de huevo de gallina, ya que bloquean la interacción del peptidoglucano con la lisozima. Por su parte *E. coli* como cualquier bacteria gram (-), posee una pared externa rígida que contiene lipopolisacáridos responsables de algunas propiedades tóxicas y biológicas (Orskov y Orskov, 1982).

El estudio de las enzimas a partir de organismos marinos, es una propuesta interesante, que podría aportar grandes beneficios en la industria, pues además de maximizar recursos resuelve el problemas de contaminación por descarga de subproductos pesqueros. Se ha observado que en moluscos las vísceras constituyen aproximadamente

un 20 % del organismo (Bernal - Castro, 1993), y como cualquier sistema digestivo está formado por una gran cantidad de enzimas, la mayoría de ellas no estudiadas.

En México, existe una gran abundancia y diversidad de almejas a lo largo las costas, la mayoría de las especies son explotadas a través de pesca local. En el presente, solo una especie es explotada comercialmente en el Golfo de México, una en el Caribe y nueve en la Costa Pacífica y Golfo de California. En la costa Pacífica de Baja California la almeja pismo *Tivela stultorum*, es la especie prevaleciente, la cual es capturada para consumirse fresca o congelada, y es la única almeja que es enlatada para exportar a los Estados Unidos y Japón (Baqueiro, 1989),

El presente trabajo describe la extracción y caracterización de la lisozima que se encuentra en las vísceras de la almeja pismo *Tivela stultorum* además de determinar sus propiedades antibacterianas hacia *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli* en presencia y ausencia de EDTA.

OBJETIVOS

Objetivo General

Purificar y caracterizar la lisozima presente en el estilete cristalino de la almeja *Tivela stultorum*, y determinar sus propiedades antibacterianas hacia *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli* en presencia y ausencia de EDTA.

Objetivos particulares

- 1.- Obtener la máxima purificación posible, aun sin la obtención de un buen rendimiento.
- 2.- Conocer sus características propias de peso molecular y punto isoelectrico
- 3.- Establecer su comportamiento óptimo de acción en función del pH, molaridad, salinidad y temperatura, así como su estabilidad con respecto al pH y la temperatura.
- 4.- Determinar el efecto lítico hacia *Streptococcus alfa* (gram +) y *Escherichia coli* (gram -), en presencia y ausencia de EDTA, en comparación con la lisozima de huevo de gallina y la lisozima de la almeja ártica *Chlamys islandica*..

MATERIALES Y METODOS

Almejas

Los ejemplares de *Tivela stultorum* obtenidos de Bahía San Ignacio, BCS México, fueron transportados vivos al Instituto de Investigaciones Oceanológicas en donde se realizó su disección. Los estiletes cristalinos fueron extraídos y mantenidos en hielo para su posterior utilización en el laboratorio.

Purificación de la lisozima de *T. stultorum* (LT)

Un grupo de 120 estiletes (37.155 g) fueron homogeneizados 1:3 (v/v) en una solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08M con un pH de 5.8 en un homogeneizador de tejidos (Eberbach 7265). Al extracto se le adicionó NaCl hasta obtener una concentración final del 10%, antes de ser centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado fue retirado y el sobrenadante se dializó contra la misma solución amortiguadora durante 5 horas a 4°C con recambios continuos de amortiguador. La muestra fue aplicada a una columna con resina de intercambio catiónico (carboxymetil celulosa, Sigma Chemicals Co.) tratada con NaOH 0.5N y HCl 0.5N previo a su equilibrio con amortiguador citrato fosfato 0.04M, pH 5.8. La resina fue lavada con la misma solución amortiguadora, hasta que ningún rastro de proteína se detecto mediante el espectrofotómetro a una absorbencia de 280 nm. El material absorbido fue eluido con NaCl 1M adicionado al amortiguador citrato fosfato, formando un gradiente lineal (0-1M). Se colectaron fracciones de 3ml a una razón de 13.9 ml/hr en un colector de

fracciones automático (Pharmacia LKB Fracc 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 mini columnas Bio-Spin pre empacadas (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 (BSA) como referencia, en donde la proteína es reportada como proteína equivalente a BSA/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 como referencia. Dicho método está basado en una medida espectrofotométrica de la clareación (transparencia) de una suspensión turbia de *M. lisodeikticus* 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 incorporación 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 absorbencia en un espectrofotómetro a 570 nm.

Actividad específica:

La actividad específica de LT se comparó con la actividad de la lisozima de huevo de gallina (LH) siguiendo el procedimiento mostrado por Gorin *et al.* (1971), mediante el cálculo del cambio en absorbencia cada 30 segundos durante los primeros tres minutos de reacción utilizando la suspensión de *M. lisodeikticus*, como sustrato. Una unidad enzimática se definió según lo propuesto por Shugar (1952), como la cantidad que produce la caída de 0.001 unidades por minuto a una absorbencia de 570 nm bajo las condiciones descritas anteriormente.

Peso molecular y Punto isoelectrico

A las muestras que contenían la mayor actividad específica se les realizaron electroforesis de una dimensión en mini geles de poliacrilamida en seco, con (SDS-PAGE) para determinar el peso molecular y (IEF-PAGE) para estimar el pI, mediante Phast system (Pharmacia CKB Biotechnology). El punto isoelectrico fue determinado en geles homogéneos de poliacrilamida (5%T 3%C) con anfólitos acarreadores para generar gradientes de pH lineales, usando un Kit IEF-MI de proteínas estándares, con un gradiente de 5-9. Las pruebas electroforéticas para determinación de peso molecular se llevaron al cabo en geles homogéneos de 12.5 y 20%, usando el kit MW-SDS-70L de proteínas estándares, con un intervalo de 14 a 70 kDa. Las tinciones para ambas determinaciones (pI y pM) fueron con azul de coomassie.

Caracterización

pH Optimo:

Se prepararon 10 soluciones amortiguadoras de citrato fosfato 0.08M con pHs diferentes en un intervalo de pH de 3.0 a 12.0 con incrementos unitarios. Las células de *M. lisodeikticus* fueron agregadas a cada una de las soluciones amortiguadora 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 60 minutos de incubación a 37°C los tubos fueron enfriados en hielo y se les registró la absorbencia a 570 nm en el espectrofotómetro. La actividad se relacionó con su respectivo máximo, el cual fue tomado como 100% de actividad.

Temperatura óptima:

La solución enzimática de *T. stultorum* (25 μ l) fue adicionada a 3 ml de la suspensión que contenía el amortiguador de citrato fosfato 0.08M, pH 5.8 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 a 85°C. Se registró el cambio de absorbencia 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 éste. 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 una solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08M pH 5.8, para obtener 7 soluciones en un intervalo de 0.02-0.26 de concentración molar ó 0.1243-0.3646 de fuerza iónica. Volúmenes de 3 ml fueron añadidos por triplicado a tubos de ensaye, seguidos por 25 μ l de la solución de prueba. Después de una hora de incubación a 37°C, se registró el cambio en la absorbencia a 570 nm. La actividad se relacionó a su máximo respectivo, el cual fue tomado como el 100% de actividad.

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. A cada tubo con 3 ml de dicha suspensión, 25 μ l de la muestra problema fueron añadidos. Se registró la absorbencia a 570 nm después de haberse incubado por 1 hora a 37°C. La actividad de cada concentración molar fue relacionada a la máxima encontrada, la cual fue tomada como el 100% de actividad.

Estabilidad térmica:

Alicuotas de 200 μ l de la solución enzimática fueron suministradas a microtubos eppendorf, los cuales fueron calentados durante 10 y 30 minutos a 37, 45, 60 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 se efectuaron por triplicado.

Estabilidad a diferentes pHs:

En microtubos eppendorf se añadieron por triplicado 250 μ l de solución enzimática y 250 μ l de solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08M con pHs en un intervalo de 3 a 11. Los microtubos fueron incubados a 4°C durante 30 minutos y 1 hora. Al término de la incubación se tomaron a 25 μ l de cada solución para determinar la actividad enzimática residual por el método de Bratlid (1977) en condiciones normales de pH (5.8) y temperatura (37°C). La actividad de la enzima a cada pH fue relacionada a su máximo respectivo, la cual fue tomada como el 100% de actividad.

Pruebas bacterianas

Se determinó el efecto antibacteriano de la lisozima de la almeja *T. stultorum* (LT), utilizando como referencia a la lisozima *Chlamys islandica* (LC) y de huevo de gallina (LH) sobre las bacterias *Streptococcus alfa* (gram +) y *Escherichia coli* (gram -), por medio de mediciones de actividad mediante una modificación de la técnica de agar en plato (lisoplato), (Lie *et al.*, 1986). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putrefaciens* y *Vibrio parahaemolyticus* fueron también probadas aunque no se tuvo éxito en la técnica de agar en plato. El extracto crudo de estiletes cristalinos de la almeja *Chlamys islandica*

fue proporcionado por el departamento de bioquímica marina de la universidad de Tromso en Noruega.

Preparación de las cepas bacterianas:

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Oceanológicas y por el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de las Américas (Ensenada B.C.). Para asegurar el crecimiento, cada cepa bacteriana en estado latente (5°C) fue inoculada en 5 ml de medio enriquecido estéril contenido en tubos de ensaye, e incubada a 37 °C por un periodo de 24 horas, al termino de la incubación 2 ml fueron retirados y adicionados a tubos de ensaye conteniendo 5 ml de medio enriquecido, los tubos fueron incubados nuevamente durante 24 horas a 37°C para lograr con esto la fase exponencial tardía.

Ensayo:

Cada cepa bacteriana fue adicionada a una solución de gel agarosa (Sea Kem ME, FMC) al 1% en amortiguador citrato fosfato 0.08M, pH 5.6, estéril, a una temperatura de 40-50°C. Hecha la mezcla, un volumen de 20 ml se adicionó a cada una de las cajas petri, las cuales se dejaron gelificar durante 30 minutos a temperatura ambiente. En cada caja petri se perforaron 6 pozos de 3 mm de diámetro, utilizando un saca bocados (estéril) conectado a una bomba de vacío manual. En cada pozo se agregaron 35 µl de solución de prueba y los halos de inhibición fueron medidos con un vernier después de 24 horas de incubación a 37°C en una cámara húmeda.

Tratamientos:

Tres soluciones enzimáticas fueron comparadas entre sí, con el propósito de observar un posible efecto de cada lisozima, así como de su mezcla con EDTA, sobre las bacterias. Una solución concentrada de EDTA fue adicionada a cada mezcla enzimática para dar una concentración final de 5 mM, haciendo un total de 6 tratamientos (con y sin EDTA), como se muestra a continuación:

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

Cabe aclarar que la concentración utilizada de EDTA en el presente experimento se encuentra por debajo de los valores reportados para producir un efecto inhibitorio en las bacterias (Chander y Lewis, 1980).

Con objeto de estandarizar las soluciones enzimáticas utilizadas se eligió una actividad específica aproximada a 147 U/ml a una temperatura de cerca de 4°C, utilizando *M. lisodeikticus* como sustrato, resultando en una concentración de 12.41 mg de proteína/ml, 1.33 mg de proteína/ml y 0.0382 mg de proteína/ml para la LT, LC y LH, respectivamente. Cada solución de prueba se estabilizó con 1% de albúmina de suero de bovino (BSA) disuelta en el amortiguador óptimo, que para la LH fue de fosfatos 0.07M pH 6.2, para la LT, fue de citrato fosfato 0.08M pH 5.8, y para la LC, fue de fosfatos 0.1M pH 5.20 (Viana y Raa, 1992).

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 en ausencia de EDTA, así como para los tratamientos en presencia de EDTA. Se utilizó una prueba no paramétrica de suma de rangos de Mann-Whitney para comparar el efecto mostrado por cada lisozima y su respectiva mezcla con EDTA, así como para comparar el efecto de las lisozimas hacia *E. coli* y *S. alfa*, en presencia o ausencia de EDTA. Para detectar posibles diferencias o similitudes entre los tratamientos se realizaron pruebas de comparaciones múltiples mediante el método de Student-Newman-Keuls. El método de Kruskal-Wallis se utilizó para las pruebas no paramétricas con análisis de varianza de una vía en rangos.

RESULTADOS

Purificación

La lisozima fue purificada a partir de un extracto de 120 estiletes cristalinos en solución amortiguadora de citrato fosfato 0.08 M, pH 5.8 mediante dos cromatografías de intercambio catiónico utilizando carboximetil-celulosa. (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 de alta concentración de proteína, y otro denominado **Ib** formado por las fracciones (271-308) en disminución de concentración proteica. El grupo **Ia** presentó una actividad específica de 4,192.6 U/mg de proteína y el grupo **Ib** mostró 5,805.5 U/mg de proteína (Tabla 1). Ambos fueron dializados y sometidos por segunda vez a cromatografía, donde 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 diversos (resultados no mostrados). La segunda cromatografía del grupo **Ib**, dio dos componentes 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** (Figura 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 mg de proteína (U/mg) correspondiendo a una purificación de 100 veces comparada con el extracto crudo. En cambio la lisozima de huevo de gallina mostró una actividad específica de 4,684 U/mg bajo las mismas condiciones de determinación.

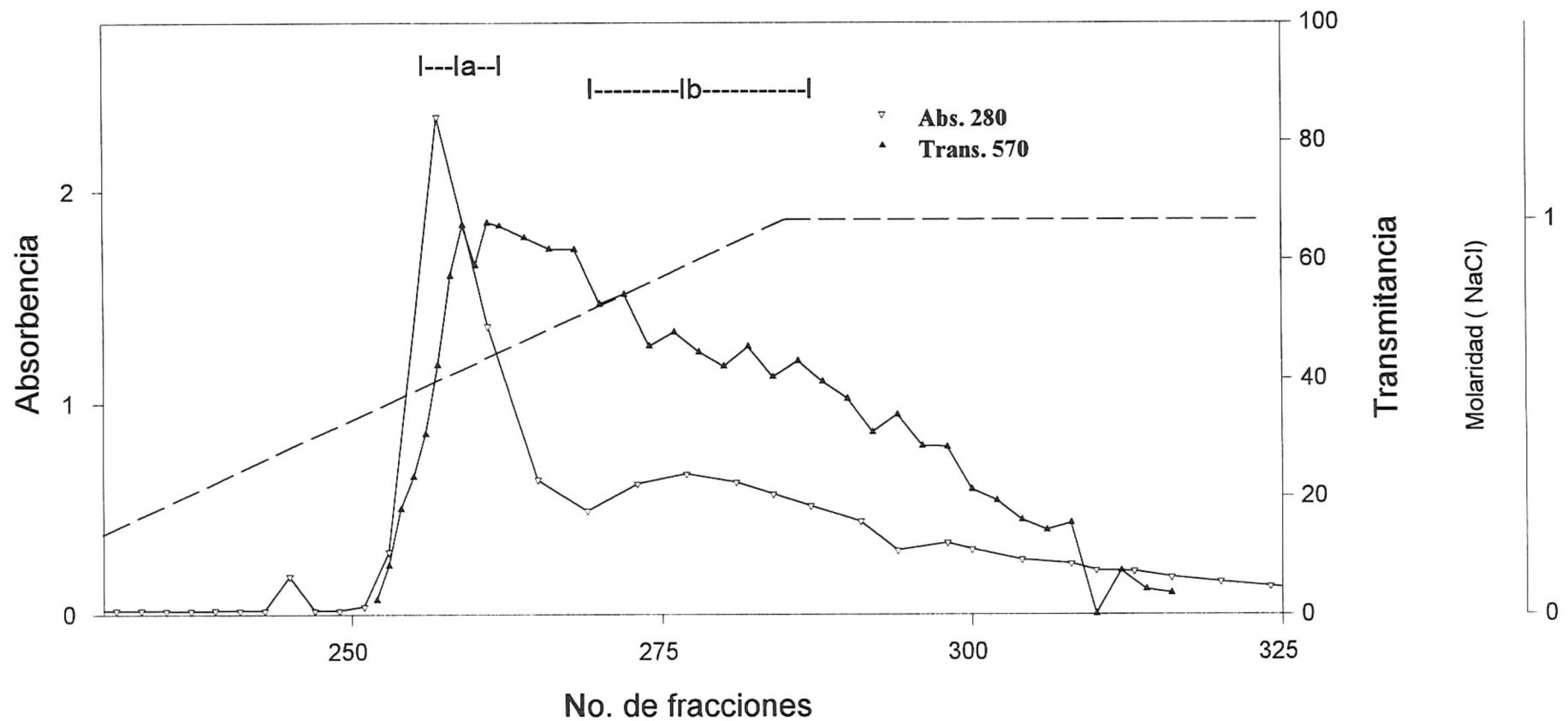


Figura 1. Cromatografía de intercambio iónico I (CM-Celulosa), con un gradiente de elución de 0-1M de NaCl. El contenido de proteína fue medido por absorbencia a 280 nm. La actividad de la lisozima fue determinada con *Micrococcus lisodeikticus* (570 nm).

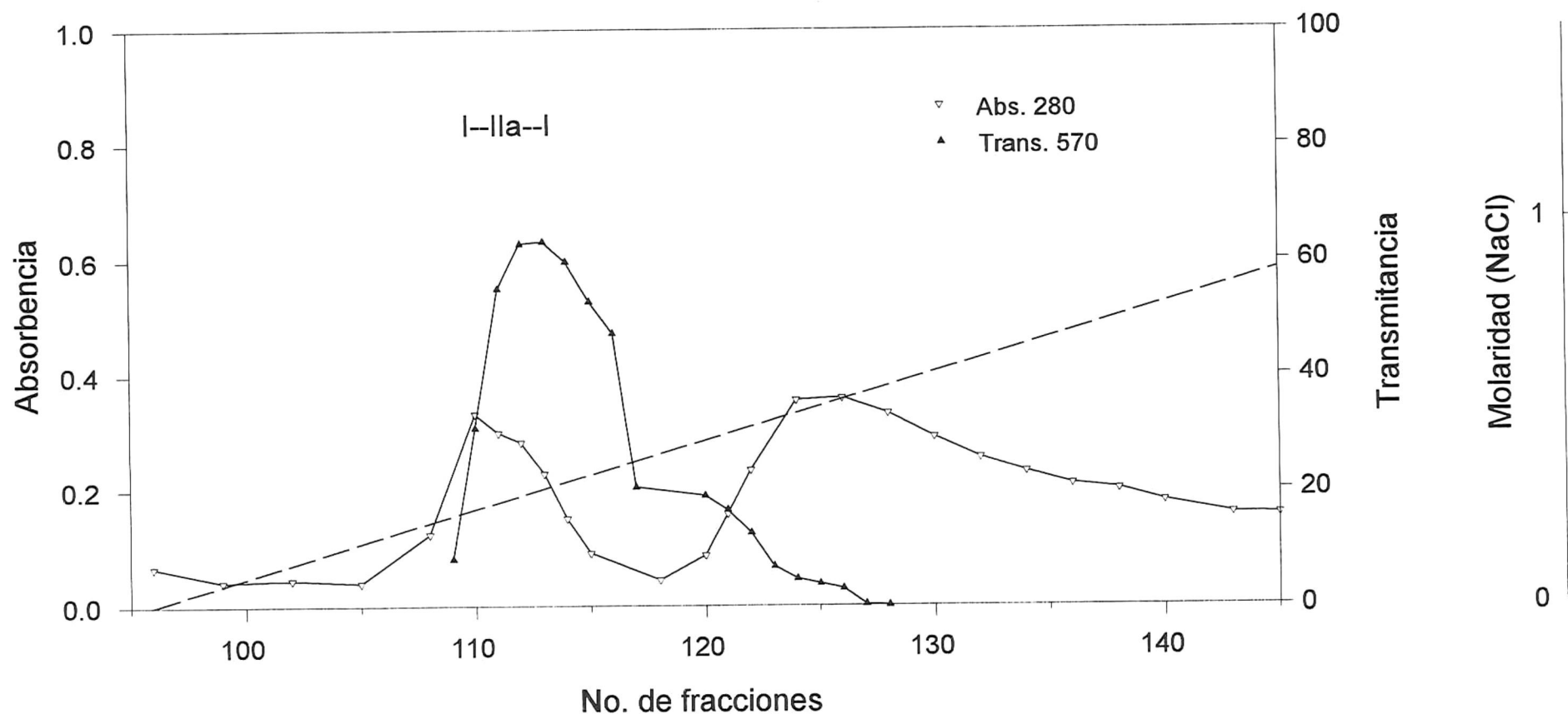


Figura 2. Cromatografía de intercambio iónico II (CM- Celulosa) obtenido del grupo Ib (cromatografía I), con un gradiente de elución de 0-1M de NaCl. El contenido de proteína fue medido por absorbencia a 280 nm. La actividad fue determinada con *Micrococcus lisodeikticus* (570 nm).

Tabla 1. Secuencia de fraccionación para la purificación de la lisozima de la almeja *Tivela stultorum*

	Volumen Total (ml)	Concentra- ción de Proteínas (mg/ml)	Prot. Total (mg)	Activ. Esp. (U/mg)	Proteína Total Equi- valente (mg/gr de estilete)	Factor de Purifica- ción	Rendimien- to (%)
Extracto crudo	181.0	15.6878	2839.5	253.7456	76.399	"1.00"	"100.0"
Ia	29.5	1.7691	52.19	4,192.63	1.404	16.522	30.41
Ib	118.0	0.2601	30.7	5,805.45	0.826	22.879	24.73
IIa	3.3	0.5502	0.7539	25,407.9	0.020	100.131	2.66

La LT fue purificada según los resultados de electroforesis de punto isoelectrico, que mostraron una banda proteica principal, con un punto isoelectrico de 7.7 (Figura 3). Las electroforesis de SDS-PAGE mostraron una banda proteica principal seguida de 3 bandas de pesos moleculares mayores. El peso molecular aproximado de la banda principal fue de 17.0 kDa mientras que para las otras bandas fue de 21.5, 25.1 y 31.6 kDa (Figura 4).

Caracterización: Condiciones óptimas de actividad y estabilidad de la lisozima de *T. stultorum* (LT).

Las características generales de la LT se muestran en la Tabla 2. La LT presentó su máxima actividad en un amortiguador de citrato fosfato 0.08M, a un pH de 5.6-5.8 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 (Figura 5). Su estabilidad fue significativamente mayor a pHs ácidos para los 30 minutos (K-W, $H = 27.3$, $gl = 9$ $P = 0.0012$) así como para los 60 minutos ($F = 532.4$, $gl = 9$, $P < 0.0001$), con porcentajes de actividad mayores al 90% para pHs en el intervalo de 3.8-7.8 para los 30 minutos de incubación, y para pHs en el intervalo de 3.8-6.8 para 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 a pH de 2.8. A excepción del pH 8.8 no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) para incubaciones de 30 y 60 minutos (prueba t de student), sin embargo éste 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 a 0.8 (figura 6).

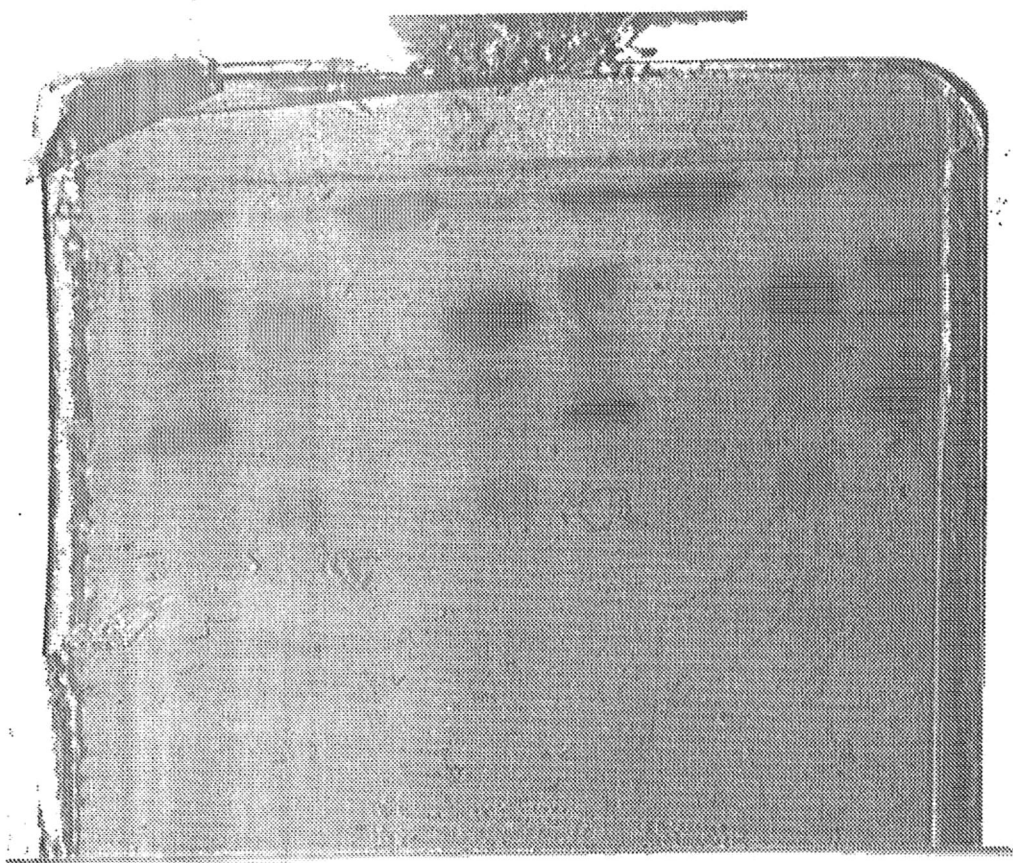


Figura 3. Electroforesis de punto isoelectrico (pI) del componente **IIa** en gel homogéneo de poliacrilamida (IEF-PAGE), con un gradiente de 5-9, mediante Phast system.

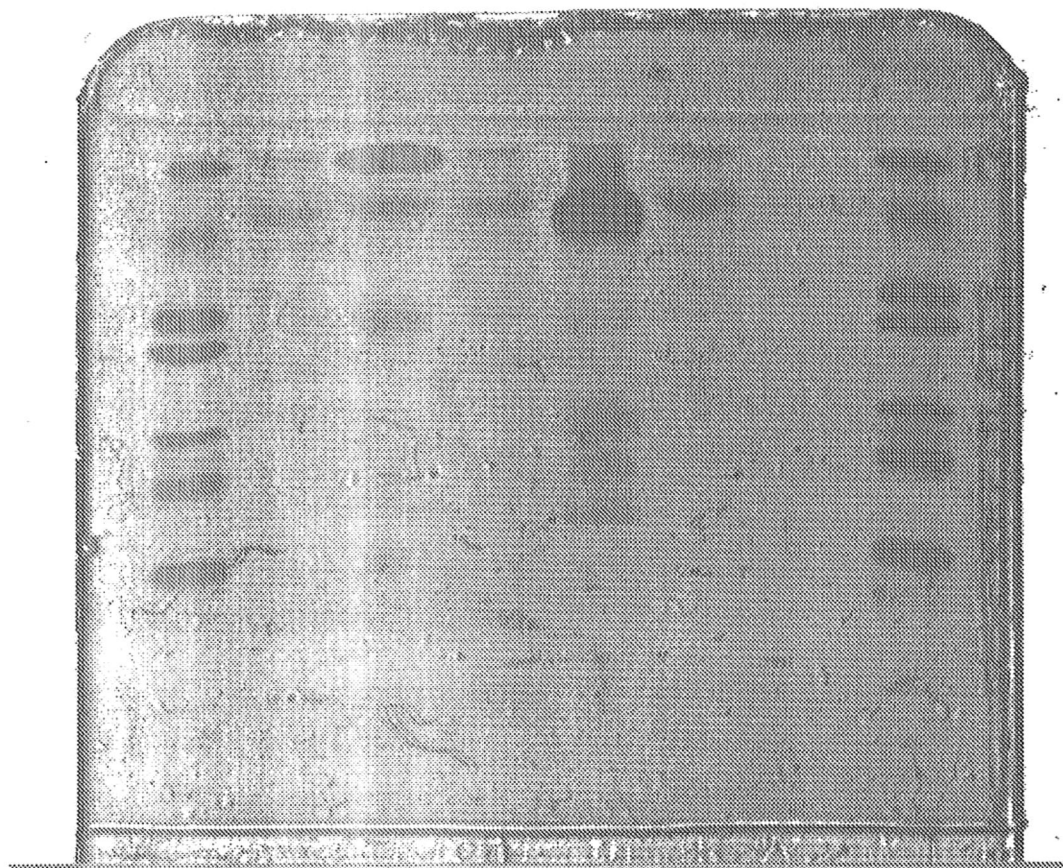


Figura 4. Electroforesis de peso molecular (pM) del componente **IIa**, en el gel homogéneo de poliacrilamida (20%) (SDS-PAGE), mediante Phast system.

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

Peso molecular	17.0 kDa
Punto isoeléctrico	7.7
pH óptimo	5.5-5.8
Temperatura óptima	40 °C
Molaridad óptima (amortiguador)	0.1 M
Fuerza iónica de máxima actividad	0.1043*
Actividad (en %) a 4°C	26.7 %
Actividad (en %) a 85°C	10.4 %
Actividad (en %) a 2.8 pH	24.3 %
Actividad específica en relación a LH	6 veces mayor
Estabilidad al pH (a 4°C)	2.8-7.8
Estabilidad (en %) a 90 °C	86 %

* cantidad equivalente a amortiguador citrato-fosfato 0.08M

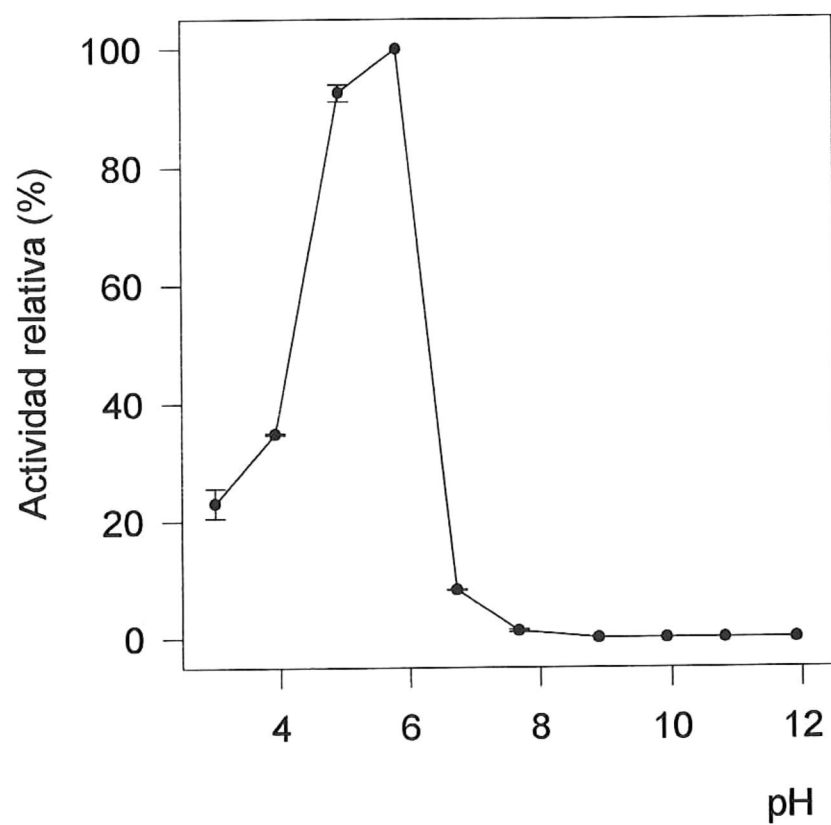


Figura 5. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función del pH. Tomando como 100% a la actividad máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.
(Temperatura = 37°C, Molaridad = 0.08)

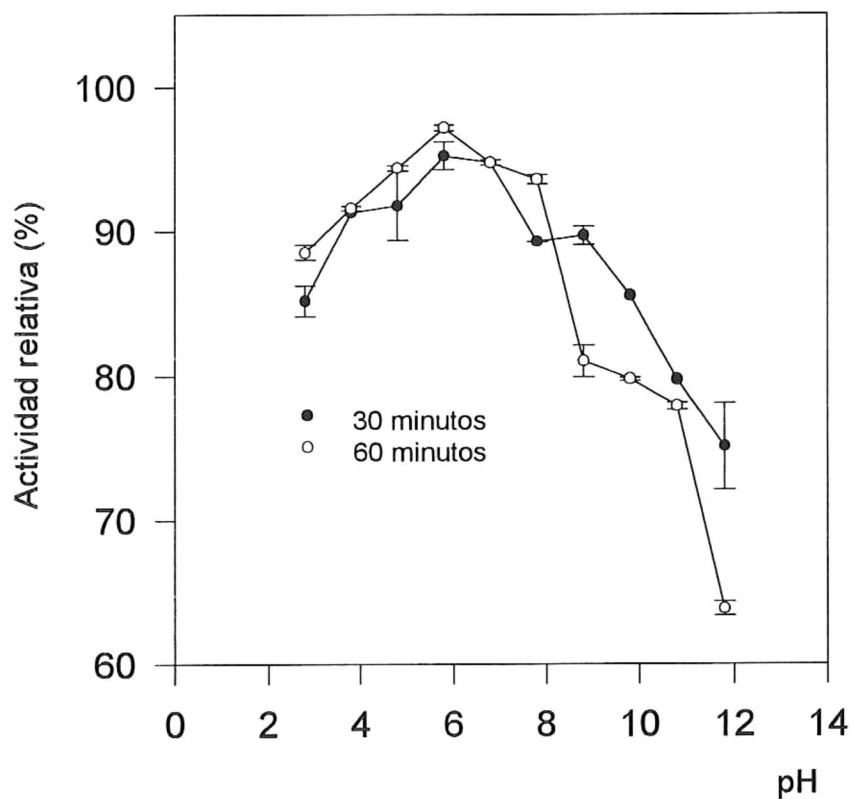


Figura 6. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función - del pH, después de haber sido incubada durante 30 y 60 minutos a 4°C. Tomando como 100% de actividad a la solución enzimática a un pH de máxima actividad -- (5.8), en el tiempo cero. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.

La concentración molar óptima del amortiguador fue de 0.1 M mostrada en la figura 7, 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 0.12 M.

La actividad máxima obtenida (100 %) se presentó en ausencia de sal a una fuerza iónica de 0.1043 correspondiente a 0.08 M en el amortiguador de reacción. La enzima presentó disminución de actividad conforme al incremento de fuerza iónica al adicionar concentraciones molares mayores de NaCl (Figura 8). Un 3.6% de actividad se observó a una fuerza iónica de 0.3643 en el amortiguador de reacción.

La figura 9, 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 enzima mostró ser más estable a temperaturas en un intervalo de 37 a 60 °C para ambos tiempos de incubación, con porcentajes de actividad del 95 al 97 %, en donde a los 10 minutos de incubación no se observaron diferencias significativas entre 37 y 90 °C, que presentaron actividades entre 94-96 %, observándose diferencias entre 45-90 °C y 60-90 °C ($F = 8.52$, $gl = 3$, $P = 0.0139$). En las incubaciones de 30 minutos no se observaron diferencias significativas entre 37-60 °C y 45-60 °C, pero sí para éstas a los 90 °C ($F = 34.7$, $gl = 3$, $P = 0.0009$) la cual presentó un 86 % de actividad residual. La prueba t de student mostró diferencias significativas entre las incubaciones de 10 y 30 minutos, a excepción de los 37 y 60 °C (Figura 10).

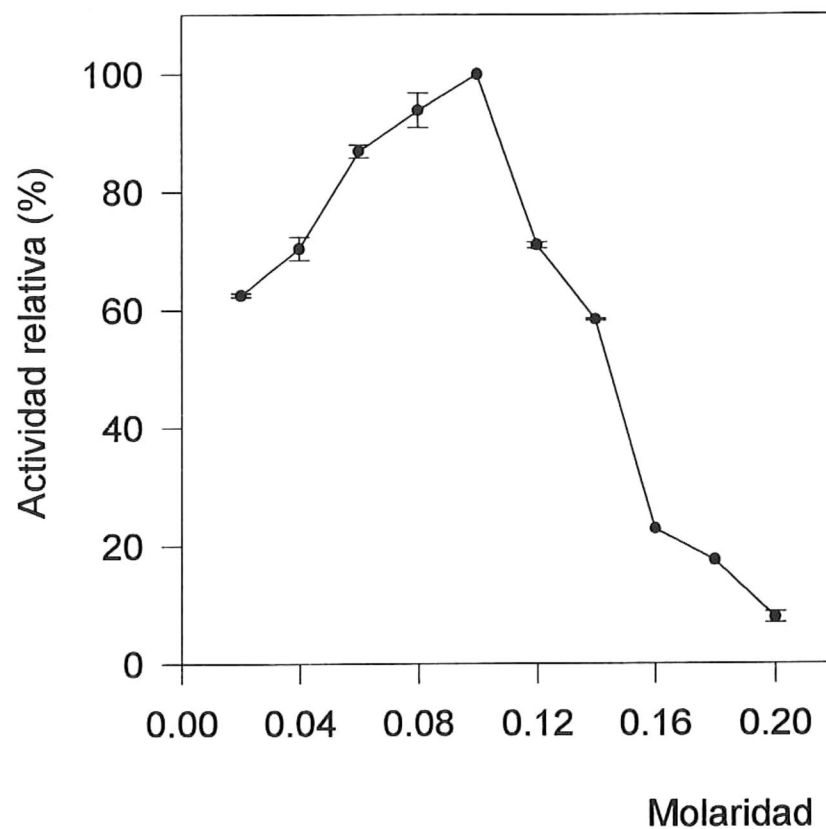


Figura 7. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función - de la concentración molar. Tomando como 100% a la actividad máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio. (Temperatura = 37°C, pH = 5.8)

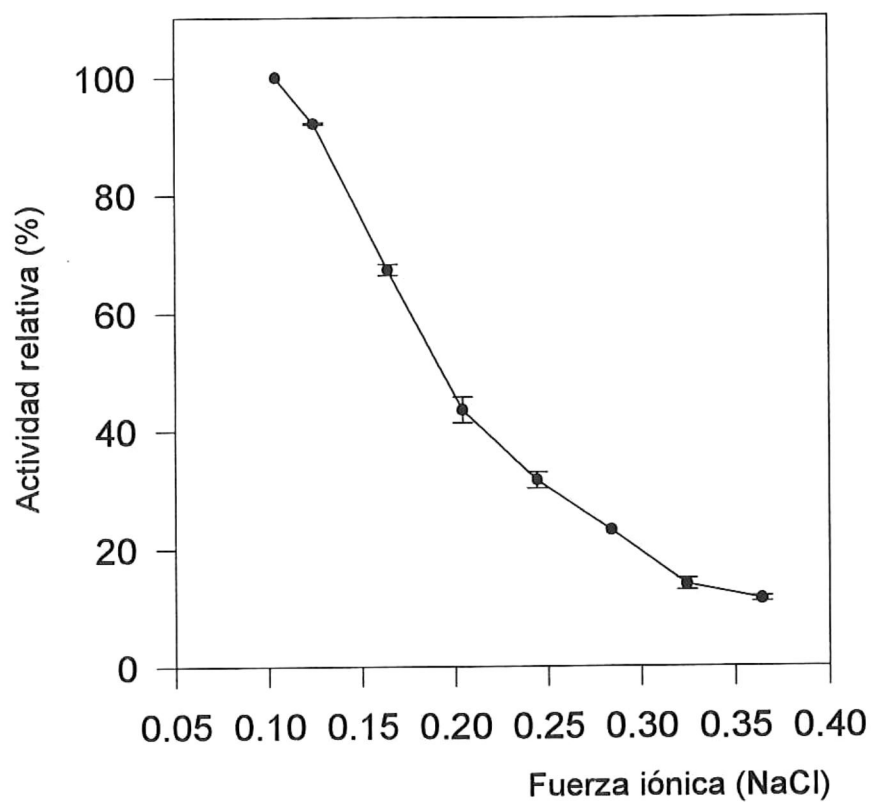


Figura 8. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la fuerza iónica. Tomando como 100% de actividad a la máxima observada. El error -- estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.
(Temperatura = 37°C, Molaridad = 0.08, pH = 5.8)

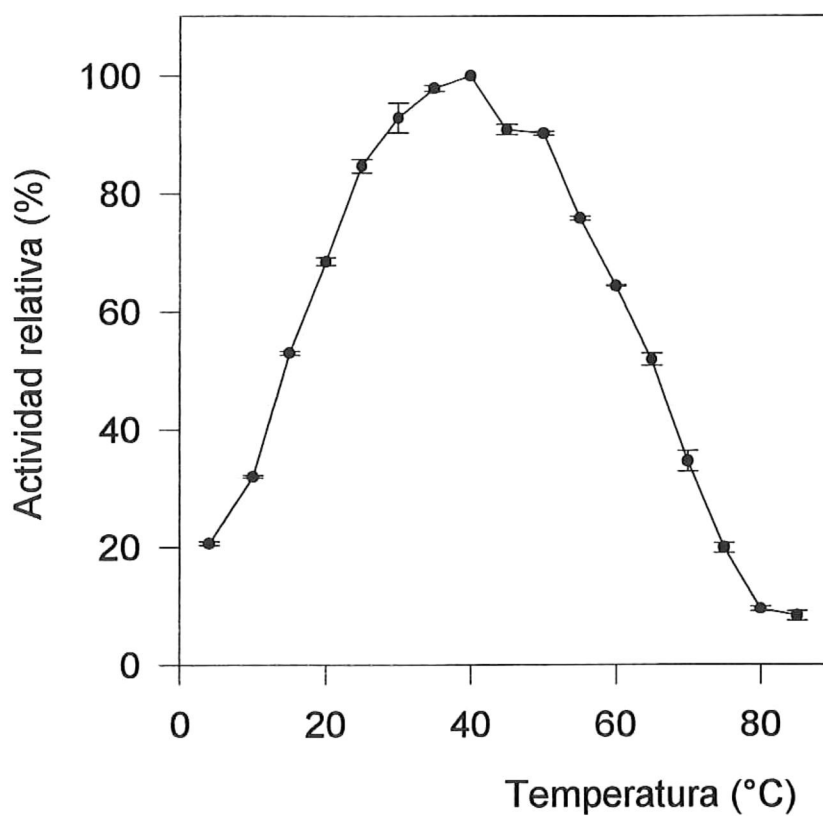


Figura 9. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la temperatura. Tomando como 100% a la actividad máxima observada. El error -- estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.
(pH = 5.8, Molaridad = 0.08)

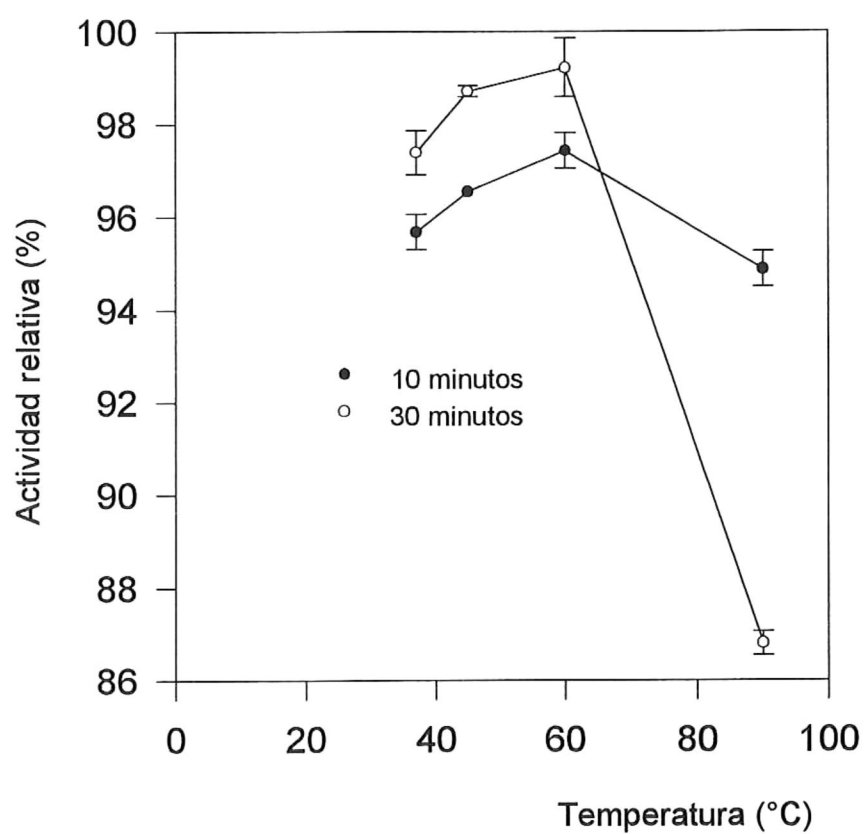


Figura 10. Actividad relativa residual de la lisozima de *Tivela stultorum* en función de la temperatura, después de haber sido incubada durante 10 y 30 minutos. Tomando como 100% de actividad a la solución enzimática a 4°C. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio.

Pruebas bacterianas

La **LT** y **LC** en presencia y ausencia de 5 mM de EDTA mostraron ser efectivas en la lisis de *Streptococcus alfa* y *Escherichia coli*, mientras que la **LH** solamente mostró lisis en presencia de 5 mM de EDTA, para ambas bacterias (Figura 11).

La lisis de células de *S. alfa* mostró diferencias significativas entre tratamientos con o sin EDTA ($F = 420.1$; $gl = 2$; $P < 0.0001$), donde el valor más alto en presencia de EDTA correspondió **LT**, con una media de 24.5, seguida por la mezcla de **LH** con un valor de 15.7 y 13.4 para la mezcla de la **LC**. Los tratamientos de lisozima en ausencia de EDTA también fueron significativamente diferentes (K-W, $H = 26.8$; $gl = 2$; $P < 0.0001$), en donde el valor más alto fue para **LT** con 23.31 de mediana, seguido por **LC** con 11.23, y finalmente **LH** con valor de cero, ya que no mostró halo inhibitorio (Tabla 3).

Los tratamientos con **LT**, **LC** y **LH** mostraron diferencias significativas (K-W, $H = 2.68$, $gl = 2$, $P < 0.0001$) en la lisis a células de *E. coli*, en donde el tratamiento de **LT** presentó una mediana de 16.34, mayor a la mostrada por el tratamiento de **LC** con 12.96 (Tabla 3). Los tratamientos en presencia de EDTA también mostraron diferencias significativas ($F = 122.8$, $gl = 2$, $P < 0.0001$), en donde el valor mas alto obtenido fue para el tratamiento **LT** con una media de 21.8, mientras que no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de **LC** y **LT** con valores de medianas de 13.3 y 13.5 respectivamente (Análisis de comparaciones múltiples de Newman-Keuls).

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza de una vía (no paramétrico y paramétrico) realizado a el efecto lítico de las lisozimas (**LT**, **LC**, **LH**) en presencia y ausencia de EDTA hacia bacterias *S. alfa* y *E. coli*.

Fuente de variación	g.l.	F*	H**	P
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

*F es la prueba estadística que se indica para el análisis paramétrico

** H es la prueba estadística que se indica para el análisis no paramétrico

Pruebas <i>a posteriori</i> 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

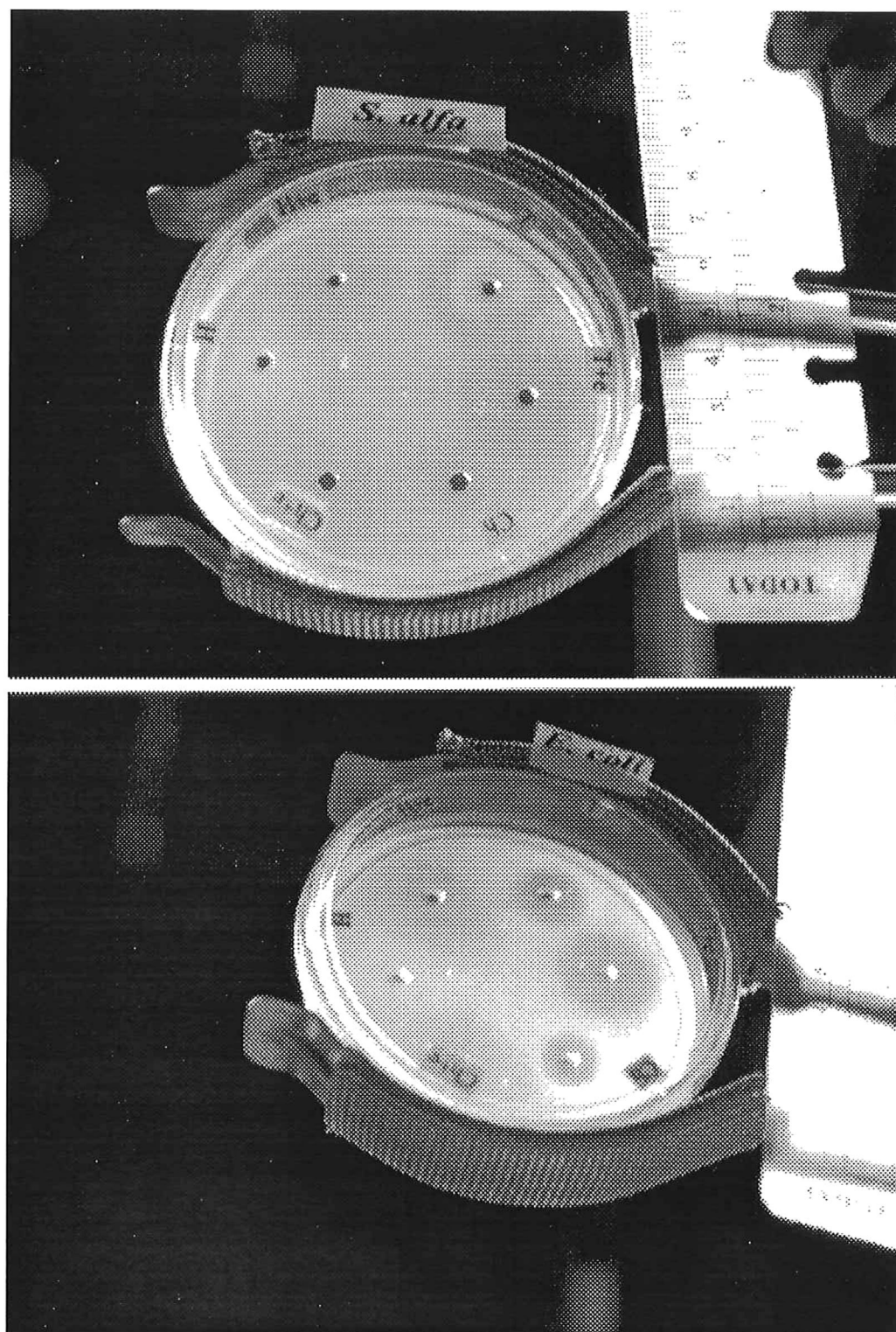


Figura 11. Ensayo de LT, LC , LH, y sus respectivas mezclas con EDTA en gel de agarosa conteniendo (A) *S. alfa* y (B) *E. coli*.

El efecto de las lisozimas hacia la lisis de *S. alfa* en presencia y ausencia de EDTA fue significativamente diferente para **LT**, **LC** y **LH** (M-W, $T = 72$, $P = 0.0156$; $T = 59$, $P < 0.0001$ y $T = 55$, $P < 0.00010$, respectivamente), con valores de medianas más altos para las lisozimas en presencia de EDTA (Tabla 4). Cuando *E. coli* fue utilizada los tratamientos de **LT** y **LH** fueron significativamente diferentes en ausencia y presencia de EDTA (M-W, $T = 55$, $P < 0.0001$; $T = 55$, $P < 0.0001$, respectivamente) mientras que no se observaron diferencias significativas entre **LC** sola y con EDTA ($T = 92$, $P = 0.345$) (Tabla 4).

Comparando el efecto de ambas bacterias (*S. alfa* y *E. coli*) con las diferentes lisozimas en ausencia de EDTA, la **LT** y **LC** mostraron diferencias significativas en su efecto (M-W, $T = 155$ $P = < 0.0001$; $T = 73$, $P = 0.0173$, respectivamente, en donde **LT** mostró un valor mayor (23.3) para *S. alfa*, que para *E. coli* (16.3), y de manera contraria **LC** con un valor máximo para *E. coli* (13.0) que para *S. alfa* (11.2) (Tabla 5). La **LH** no presentó lisis en ninguna de las dos bacterias.

En presencia de EDTA, **LT** y **LH** mostraron diferencias significativas entre las dos bacterias probadas (prueba t, $T = 150$, $P < 0.0001$; M-W, $T = 149$, $P = 0.001$, respectivamente), con valores máximos de 24.5 y 15.5 para *S. alfa*, y mínimos para *E. coli* de 21.4 y 13.7 para **LT** y **LH** respectivamente, en contraste a **LC** que no fue significativamente diferente entre las dos bacterias (M-W, $T = 109$, $P = 0.791$) (Tabla 5).

Tabla 4. Comparación entre medianas para detectar el efecto lítico de cada lisozima (LT, LC, LH) en presencia o ausencia de EDTA, en *S. alfa* y *E. coli*. Análisis de dos muestras (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 (LT, LC, LH) hacia las bacterias *S. alfa* y *E. coli* en presencia y ausencia de EDTA. Análisis de dos muestras (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

DISCUSIONES

Purificación

Las diferencias que caracterizan a las enzimas tipo lisozima han llevado a el uso de diversos métodos de extracción (Viana y Raa, 1992; Ito *et al.*, 1990; McHenery y Birkbeck, 1979; Grinde *et al.*, 1988). El método utilizado en el presente trabajo proporcionó una purificación de 100 veces con respecto al extracto crudo, obteniéndose 20.2 μg de proteína por cada gramo de estilete, con alta actividad enzimática. Dicha cantidad no es alta considerando que el estilete es una fuente rica de lisozima (McHenery y Birkbeck, 1979), pero si tomamos en cuenta que la actividad específica para la fracción pura fue de 25,407.9 U/mg de proteína y de 253.8 U/mg para el homogenado original (Tabla 1), entonces podríamos esperar 762.4 μg de lisozima pura en un gramo de estilete. Concentraciones similares de 644 $\mu\text{g/g}$ en peso húmedo de lisozima han sido reportadas en el bivalvo *Modiolus* (McHenery *et al.*, 1979), a comparación con la lisozima encontrada en la clara de huevo de gallina donde se registran niveles máximos de 4,500 $\mu\text{g/g}$ (Jollés *et al.*, 1965).

De acuerdo a esto, podemos decir que el rendimiento obtenido en el presente trabajo fue bajo (2.7 %), con 20.2 μg por gramo de estilete (Tabla 1). Gran parte de la pérdida de proteína se debió a la eliminación del grupo Ia, que no se mejoró mediante la segunda cromatografía con intercambio iónico y exclusión molecular (resultados no mostrados). Dicho grupo descartado (Ia) contenía 4,192.6 U/mg de proteína, lo cual

representaba cerca del 50 % de la actividad de la lisozima. Sin embargo en el presente trabajo se optó por lograr la máxima purificación posible, sacrificando el rendimiento.

La cromatografía de intercambio iónico, utilizada aquí ha probado ser un método exitoso en la purificación de enzimas básicas, estables y de bajo peso molecular como la lisozima (McHenery y Birkbeck, 1979; Fletcher y White, 1976). Un procedimiento de purificación generalmente pasa a través de varios métodos cromatográficos diferentes para aumentar la sensibilidad de la separación. A pesar de esto, la utilización de la misma técnica cromatográfica, bajo las mismas condiciones ha mostrado resultados satisfactorios (Ito *et al.*, 1990). Aquí, no se obtuvo una mejor separación con el método de exclusión molecular, probablemente a causa de una escasa concentración de la muestra o un inadecuado empaque de la columna. Mediante la segunda cromatografía del grupo **Ib**, bajo las mismas condiciones de separación de la primer cromatografía, se obtuvieron dos componentes a 280 nm, donde el pico con actividad enzimática se presentó entre los dos componentes de proteína, sesgado hacia el primero y observó una banda principal mediante electroforesis de punto isoelectrico, como se observa en la figura 9. Este hecho muestra el escaso grado de purificación que presentaba dicho componente, y se demuestra con la actividad específica obtenida en **IIa** (25,407.9 U/mg de proteína equivalente a BSA) correspondiendo a una actividad 5.4 veces mayor a la obtenida con **LH** de 4,684 U/mg de proteína equivalente a BSA. Esta alta actividad específica obedece a lo reportado con anterioridad para otro tipo de lisozimas marinas y en general enzimas de especies acuáticas (Viana y Raa, 1992).

Caracterización

Al igual que otras enzimas marinas tipo lisozima, la LT presentó actividades máximas a pHs ácidos (5.6-5.8), aunque menor al reportado para el mejillón *Mytilus edulis* de 6.4 y mayor al de la almeja *C. islandica* de 4.8-5.0 (McHenery *et al.*, 1978; Viana y Raa, 1992). En contraste la LH, tienen su máxima actividad a pH de 6.2, presentando actividad aún a pHs básicos (Davies *et al.*, 1969).

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, en donde se le han atribuido funciones principalmente digestivas. De tal manera que enzimas con funciones digestivas presentan un óptimo de actividad a pHs ácidos, alrededor de 5, (Wilbur y Yonge, 1966) como probable respuesta a una adaptación (Jollés y Jollés, 1984).

La LT al igual que la LC (Viana y Raa, 1992) y lisozima del mejillón *Mytilus edulis* (McHenery *et al.*, 1978) muestran un comportamiento contrario a la LH, con respecto a la adición de sales, en donde ésta última requiere de fuerzas iónicas mayores a 0.005 para mostrar actividad (Davies *et al.*, 1969), mientras que la actividad de la LT y las lisozimas marinas mencionadas anteriormente son inversamente proporcionales al incremento de fuerza iónica, hasta llegar al grado de su inhibición.

Como la mayoría de las enzimas, la LT presentó una actividad óptima a una temperatura de 40°C. Sin embargo observó una actividad residual de 26.7 % a 4 °C. Esta característica parece ser particular de enzimas marinas procedentes de aguas templadas o

frías, como se ha reportado antes (Gildberg, 1988; Viana y Raa, 1992). Se sabe que las enzimas encontradas en ambientes extremos, como a bajas temperaturas (comunmente encontradas en el mar), presentan estrategias de adaptación comunes, tales como: aumento en la actividad específica y presencia de actividad a temperaturas bajas (Hochachka y Somero, 1984). Estas estrategias de adaptación probablemente radican en una mayor flexibilidad molecular de la enzima, lo cual les permite actuar con una menor energía de activación, y por ende, mayor actividad (Gildberg, 1988). 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 serían capaces de actuar contra bacterias evitando la descomposición de alimentos.

Otra característica interesante, común a todas las lisozimas es la de mostrar una gran estabilidad a diferentes pH y temperaturas. Era de esperarse que si la LT actúa a temperaturas menores como resultado de una mayor movilidad molecular, fuera menos estable. La estabilidad de la lisozima es atribuida a dos factores principales, su tamaño y sus puentes disulfuros los cuales le confieren cierta rigidez, impidiendo su desdoblamiento en un amplio intervalo de pHs, temperaturas, etc (Branden y Tooze, 1991). Sin embargo, LT presentó una gran estabilidad a diferentes pHs y temperaturas, de manera similar como se reporta para otras lisozimas (Jollés y Jollés, 1984).

Afinidad a bacterias

Los resultados de este trabajo muestran que LT y LC presentan una mayor afinidad para lisar células de *S. alfa* y *E. coli*, que la LH, en ausencia de EDTA, siendo

totalmente nulo el efecto mostrado por la LH. Era de esperarse que la LH presentara actividad hacia *S. alfa* por tratarse de una bacteria gram (+), aparentemente más susceptible a ser lisada por la LH. Sin embargo, la agresividad de las bacterias no depende exclusivamente de la presencia de la pared rígida bacteriana existiendo varias bacterias gram (+) reportadas donde la LH no presenta sensibilidad (Shahani y Kilara, 1974).

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 éste trabajo se utilizó una concentración de 0.0383 mg/ml.

En presencia de EDTA todas las lisozimas presentaron actividad, siendo para LT comparativamente mayor 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, temperatura a la que presenta mayor actividad LC (67% de actividad residual según Viana y Raa, 1992), seguida por LT (26.7 %, Tabla 2) y por último LH (4 %, según Viana y Raa, 1992). Esto, seguramente favorecería a la LH seguida por la LT, pues mayor cantidad de enzima tuvo que suministrarse para igualar la actividad específica de LC, al realizarse las pruebas a 37 °C. Por esto, la LH seguida por la LT tenían mayor cantidad de enzima por µl que la LC, por lo que resulta sumamente difícil comparar la actividad de manera numérica entre las lisozimas, aunque es obvio que

la mayor actividad reportada en **LT** con respecto a la **LH** le confiere mayor ventaja. No obstante, es importante analizar las diferencias encontradas en el comportamiento de actividad entre 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 +) fue diferente significativamente ($P < 0.001$), siendo mayor la actividad para **LT** seguido por **LH** y **LC**. En cambio, para *E. coli*, que es gram (-) solamente **LT** fue diferente significativamente a **LC** y **LH** ($P < 0.001$), no existiendo diferencias entre éstas dos últimas (Tabla 3). Esto podría indicar que comparativamente la **LH** es menos sensible que **LC** a *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 sensible en presencia de EDTA. Sin embargo, con *E. coli*, no se observó diferencia significativa para la **LC**, mientras que en **LT** y **LH** si 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, de igual forma se observa que el único grupo que no presenta diferencias significativas del efecto mostrado por ambas bacterias es el **LC** con EDTA, mientras que sin EDTA la **LC** fue la única que presentó una mayor actividad significativa hacia *E. coli*, donde **LT** y **LH** presentaron una actividad significativamente menor hacia *E. coli* que hacia *S. alfa* en presencia o ausencia de EDTA.

Esto significa que **LC** presenta una mayor sensibilidad a las gram (-) que **LT** y **LH**. Era de 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 intermareal templado (18 °C) mientras que *C. islandica* vive en temperaturas inferiores a los 5 °C y profundidades mayores a los 50 m (Comunicación personal). 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, pues como se discutió anteriormente LT presenta mayor actividad a temperaturas inferiores que como se observa en LH, además de que LT si presentó actividad en ausencia de EDTA lo que no se observó con LH. Esta mayor afinidad aparente de LC hacia *E. coli*, pudiera entonces deberse a que en el medio donde se desarrolla *T. stultorum* sea más rico en alimento que donde se desarrolla *C. islandica*, no existiendo la necesidad de ser aun 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). Dicha propiedad probablemente es debida 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 la LH se encuentra cargada positivamente, por su pI de 11 (Worthington, 1979), impidiendo el

rechazo por cargas. Esto podría explicar el hecho de que las lisozimas marinas al presentar un pI más bajo que la LH (Grinde *et al.*, 1988; McHenery y Birkbeck, 1979) no dependan tanto de la presencia del EDTA, aunque si se observaron diferencias significativas en algunos casos antes mencionados. Resultados no publicados muestran un pI aparente en LC de 6, que de ser cierto explicarían el porque en LC el EDTA no actúa con el mismo sinérgismo que con las otras enzimas, mientras que LT presenta un pI de 7.7 (Tabla 2). Por otro lado, en las bacterias gram (+) como *S. alfa*, sin pared bacteriana rígida, su agresividad (y/o toxicidad) a desarrollarse radica en la composición de carbohidratos antigénicos y aminoácidos que la forman. De alguna manera el EDTA actúa también como quelante neutralizando posibles cargas que impidan el funcionamiento de enzimas tipo lisozima. Si el EDTA es capaz de inhibir el desarrollo de bacterias por sí mismo, a concentraciones mayores a 0.5% (Chander y Lewis, 1980), las cuales son mucho más altas que las utilizadas en este trabajo de 5 mM (equivalente a 0.0014 %), se descarta la posibilidad de que el EDTA hubiera actuado solo.

Con esto, puede resumirse que LT es una enzima capaz de degradar bacterias como *S. alfa* y *E. coli* en ausencia de EDTA aunque si presenta un efecto sinérgico cuando EDTA se encuentra presente para degradar ambas bacterias, siendo mayor dicho efecto con *E. coli*. De manera contraria, la LC es más sensible a las gram (-) presentando el EDTA un efecto sinérgico para *S. alfa*, con un comportamiento indistinto con o sin EDTA hacia *E. coli*. LH fue la enzima que se comportó más diferente, donde la presencia de EDTA es necesaria y su actividad fue menor hacia *E. coli*.

CONCLUSIONES

La lisozima proveniente del estilete cristalino de la almeja *T. stultorum* presentó lo siguiente:

⇒ Fue purificada 100 veces mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando resina de carboximetil celulosa aunque se obtuvo un rendimiento bajo.

⇒ Mostró un punto isoelectrico (pI) de 7.7, y un peso molecular (pM) de 17 kDa.

Su óptimo de actividad fue a pH de 5.6-5.8, en ausencia de sal ($I=0.1043$), a una molaridad de 0.08M, y una temperatura de 40°C en un amortiguador de citrato fosfato, mostrando un 26.7 % de actividad residual a 4 °C y 24.3 % a un pH de 2.8.

⇒ Al igual que otras lisozimas mostró una alta estabilidad a temperaturas elevadas (85 °C) y pHs extremos de 2.8 a 11.8, y su actividad específica fue 6 veces mayor a la mostrada por LH, bajo las mismas condiciones de actividad.

⇒ Mostró ser efectiva en la lisis de las bacterias *S. alfa* y *E. coli*, aún sin la presencia de EDTA, al igual que LC y al contrario que LH, que requirió de EDTA.

⇒ Tuvo mayor sensibilidad hacia *S. alfa* que *E. coli* contrario a lo observado en LC y similar a LH.

⇒ Mostró un efecto sinérgico con el EDTA, siendo mayor en *E. coli* que en *S. alfa* mientras que el efecto de LC fue indistinto con o sin EDTA hacia *E. coli*

LT presentó una mayor sensibilidad con y sin EDTA, hacia *S. alfa*, mientras que LC sin EDTA es más sensible hacia *E. coli* y con EDTA no presenta diferencias entre bacterias.

BIBLIOGRAFIA

- Alegre-Salazar, (1979) Determinación enzimática del pescado. **Pesca Marina**. 31(5):13-15
- Baqueiro, C. E. (1989) Clam culture in México: past, present and future. En J.J. Manzi y M. Castagna (Ed.). Clam Mariculture in North América. Developments in aquaculture and fisheries science, Elsevier, Amsterdam. pp.383-394
- Bernal-Castro, R. M. (1993) Variación de la composición química proximal de la viscera de abulón durante la epoca de su captura en Baja California. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Baja California, México.pp
- Bianchi, C. (1983) Is flemining's lysozyme an analgesic agent?. Experiments on mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 10:45-52
- Biggar, W. D. y Sturgess, J. M. (1977) Role of lysozyme in the microbial activity of rat alveolar macrophages. **Infection and Immunity**. pp. 974-982
- Birckbeck, T. H. y McHenery, J. G. (1982) Degradation of Bacteria by *Mytilus edulis*. **Marine Biology**. Scotland. 72:7-15
- Branden, C. y Tooze, J. (1991) Prediction, engineering and design of protein structures. En: Introduction to protein structures. Garland Publishing, Inc. 16:247-268
- Bratlid, D. (1977). A simple procedure for determination of bacteriolytic activity in biological fluids. **Acta Path Microbiol. Scand. Sect. C.Norway**. 85:17-20
- Braude, A. I. (1982) Bacterial endotoxins. En: A. I. Braude (Ed.). Microbiology Basic Science and Medical Applications. W. B. Saunders Company Phyladelphia.pp.63-74
- Cota-Robles, E. H. y Ringo, D. L. (1982) The structure of the bacterial cell. En: A. I. Braude (Ed.). Microbiology, Basic Science and Medical Applications. W. B. Saunders Company Phyladelphia. pp.1-8
- Chander, R. y Lewis, N. F. (1980) Effect of Lysozyme and sodium EDTA on Srimp Microflora. **European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol**. 10:253-258.
- Das, S.; Banerjee, S. y Das-Gupta, J. (1992) Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of lysozyme. **Experimental chemotherapy**. 38:350-357

Davies, R.C.; Neuberger, A. y Wilson, B. M. (1969) The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. **Biochem. Biophys. Acta.** 178:294-503

Dubois-Prevost, R. (1970) Le lysozyme applications alimentaires. **Alimentation et la, Vie.** 58:(1/3):44-49

Fenouil, E. y Roch PH.(1991) Evidence and characterization of lysozyme in six species of freshwater crayfishes from astacidae and cambaridae families. **Comp. Biochem. Physiol.** 99B(1):43-49.

Fletcher, T.C. y White, A. (1976) The lysozyme of the plaice (*Pleuronectes platessa*) L. **Biochem. Physiol.** 55B:207-210

Fox, P.F. (1982) Use of enzymes in food technology. International Symposium, Versailles, 5-7 May.

Gildberg, A. (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. **Comp Biochem. Physiol.** 91B(3):425-435

Grinde, B.; Jollés, J. y Jollés, P. (1988) Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Biochem.** 173: 269-273

Gorin, G.; Wany, S. F. y Papapavlou, L. (1971) Assays of the lysozyme by its lytic action on *Micrococcus lysodeikticus* celss. **Analitical Biochemistry.** 39:113-127

Gounot, A. M. (1991) A Review. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. **Journal of Applied Bacteriology.** 71:386-397.

Haneberg, B. y Finne, P. (1974) Lysozymes in feces from infants and children. **Acta Paediatr. Scand.** 63:588-594

Hardy, S. W.; Fletcher, T. C. y 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. y Somero, G. N. (1984) Biochemical Adaptation. Princeton University Press, Oxford.pp. 355-449

Hughey, V.L. y Johnson, E. (1987) Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. **Applied and Environmental Microbiology.** 53(9):2195 -2170

Hughey, V.L.; Wilger, P.A. y Johnson, E. (1989) Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes*. Scott A in foods. **Applied and Environmental Microbiology**. 55(3):631-638

Huss, H. H. (1988). El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Colección FAO: Pesca No. 29, Roma. 127 pp.

Iacono, V. J.; Byrnes, T.P.; Crawford, I. T.; Grossbard, B.L.; Pollock, J.J.y Mackay, B.J. (1985) Lysozyme mediated De- chain of *Streptococcus mutans* and its antibacterial significance in an acidic environment. **J.Dent Res**. 64(1):48-53.

Igarashi, H. y Zama, K. (1972) Preservation of edible sea food. Patent No. Japan. 71:19, 576 (Cl.; A 23b)

Ito, Y.; Ysamada, H.; Nakamura, S.y Imoto, T. (1990) Purification, amino acid sequence, and some properties of rabbit kidney lysozyme. **J. Biochem** 107:236-241

Jollés, P.; Charlemagne, D.; Petit, J. F.; Maire, A. C. y Jollés, J. (1965) Biochimie Comparee Des lysozymes. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 47(12):2241-2259.

Jolles, P.y Jolles, J. (1984) What's new in lysozyme research?. Allways a model system today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry** 63:165-189.

Koivisto, M.; Hackert, O. y Raunio, V. (1973) Lysozymimjolk och dess betydelse for infektionss Kydd. Semper Nutrition Symposium. Stockholm 9:67-80

Klockars, M. y Roberts, P. (1976) Stimulation of phagocytosis by human lysozyme. **Acta haemat.** 55:289-295

Lehninger, A. (1985) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función molecular. Segunda edición. Ediciones Omega, S. A. Barcelona España pp.25

Lie, O.; Syed, M. y Solbu, H. (1986) Improved agar plate assays of bovine lysozyme and haemolytic complement activity. **Acta vet scand.** 27:23-32

Lindsay, G. J. H. (1986) The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defense. **Aquaculture**. 51:169-173

McDade, J. E. y Tripp, M. R. (1967) Lysozyme in the haemolymph of the oyster *Crassostrea virginica*. **J. Invertebr. Pathol.** 9, 531-535.

McHenery, J. C.; Allen, J. A. y Birkbeck, T. H. (1978) The lysozyme activity of the common mussel *Mytilus edulis*. **Soc. Gen. Microbiol. Proc.** 5:107

McHenery, J.G. y Birkbeck, T. H. (1979) Lysozyme of the mussel, *Mytilus edulis* (L). **Marine Biology Letters**. 1:111-119

McHenery, J.G. y 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. y Allen, J.A. (1979) The Occurrence of lysozyme in marine bivalves. **Comp. Biochem. Physiol.** 63B:25-28

Minch, M. (1989) Experiments in biochemistry. Prentice-Hall

Olafsen, J. (1983) The use of marine enzymes in the industry. Annual Congress of the Western European Technological Application, Tromso, Norway.

Orskov, F. y Orskov, I. (1982) Gram-Negative Rods Enterobacteriaceae. En: A. I. Braude (Ed.). Microbiology Basic Science and Medical Applications. W. B. Saunders Company Philadelphia. pp.340-351

Osserman, E. F.; Canfield, R.E. y Beychock, S. (1974) Lysozyme. Academic Press, New York and London, 637pp.

Porstmann, B.; Jung, K.; Schemechta, H.; Evers, U.; Pergande, M.; Porsmann, T.; Kramm, H. J. y Krause, H. (1989) Measurement of lysozyme in human body fluids: Comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic application. **Clin. Biochem.** 22:349-355.

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. y Froning, G.W. (1985) The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on salmonella on broiler parts. **Poultry Science**. 64:1488-1490

Scopes, R. K. (1988) Protein purification. Principles and practice. 2a edición, Springer-Verlag. Australia. pp.57-62

Shahani, K. H. and Kilara, A. (1974) Lysozyme. **J. Food Sci.** 39:480-482

Shugar, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultraviolet inactivation of lysozyme. **Biochim. Biophys. Acta** 8, 302-309

Skujins, J.; Pukite, A y McLaren, A. D. (1973) Absorption and reactions of chitinase and lysozyme in chitin. **Molec. Cell. Biochem.** 2:221-228

Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of protein. En: M. P. Deutscher, (Ed.). *Methods in enzymology, Guide to protein purification*. Academic Press, San Diego. 182:57-68

Trevor, P. (1991) *Understanding enzymes*. 3a. edición. Ellis Horwood. New York. pp. 21

Van Heyningen, W. E. (1982) Bacterial Exotoxins. En: A. I. Braude (Ed.). *Microbiology Basic Science and Medical Applications*. W. B. Saunders Company Philadelphia. pp. 63-74

Viana, M. T. y Raa, J. (1992) Lysozyme -like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. *Ciencias Marinas* 18(1):93-107

Wasserfall, F. y Teuber, M. (1979) Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(2):197-199

Wilbur, K. M. y Yonge C. M. (1966) *Physiology of Mollusca*. VolIII. Academic Press. London. pp 65

Williams, B. y Wilson, K. (1981) *Principios y técnicas de bioquímica experimental*. Ed. Omega. Barcelona, España. 39pp

Worthington, (1979) *Enzymes and related biochemicals*. Millipore Corporation Bedford, Ma 01730. USA 210p.

Zobell, C.E. y Feltham, C.B. (1938) Bacteria as food for certain marine invertebrates. *J. Mar. Res.* 1:312-327.