فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۳

تعیین خصوصیات بیوشیمیایی لیزوزیم ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum*

ویدا بذرکار[۱]، محمود رضا آقامعالی[۲]*

تاریخ دریافت: مهر ۹۳ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۳

چکیده

لیزوزیم یک مولکول کلیدی در سیستم ایمنی غیراختصاصی است و در سیستم دفاعی بسیاری از گونه‌ها نقش اساسی را در انهدام و سرکوب گونه‌های بیماری‌زای باکتریایی، با هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی بین N-استیل مورامیک اسید و N-استیل گلوکزآمین لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها بر عهده دارد. در گونه‌های دریایی بیش‌ترین میزان این آنزیم در بافت‌هایی مانند کلیه و طحال گزارش شده است. در این بررسی نمونه اولیه از بافت فوق کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) استخراج شده، با استفاده از آمونیوم سولفات به صورت جزئی تخلیص شد و ویژگی‌هایی مانند دما، pH بهینه و اثر غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم و اوره بر فعالیت لیزوزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فعالیت این آنزیم با استفاده از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* به عنوان سوبسترا به دست آمد. نتایج نشان داد که pH بهینه لیزوزیم ماهی سفید ۶ و دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد است. به علاوه فعالیت لیزوزیم ماهی سفید وابسته به نمک است.

واژگان کلیدی: *لیزوزیم، ماهی سفید، دناتورانت، میکروکوکوس لیزودیکتیکوس.*

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان
۲- استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان
* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

ایمنی یک مکانیسم فیزیولوژیکی مهم در جانوران برای حفاظت علیه عفونت و حفظ هومئوستازی داخلی است. سیستم ایمنی معمولاً به دو قسمت ایمنی اولیه یا غیراختصاصی و ایمنی اختصاصی تقسیم می‌شود که ایمنی غیراختصاصی از نظر فیلوژنی قدیمی‌تر است و در همه ارگانیسم‌های پرسلولی وجود دارد. در ماهیان به دلیل تکامل اولیه، به طور عمده دفاع بر عهده ایمنی غیر اختصاصی است.

لیزوزیم[1] (مورامیداز، EC 3.2.1.17)، یک مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی اولیه است که در حفاظت علیه تهاجم میکروبی اهمیت بسیار زیادی دارد. این پروتئین به سه نوع C، G و I وجود دارد. لیزوزیم نوع C، مهم‌ترین و عمده‌ترین نوع لیزوزیم تولید شده توسط اکثر مهره‌داران شامل پستانداران است (Grinde et al., 1988). علاوه بر پستانداران، پرندگان، ماهیان، خزندگان و دوزیستان هم ژن‌های لیزوزیم نوع C را دارند، اما اطلاعات مربوط به دو گروه آخر کم‌تر است (Callewaert et al., 2005). لیزوزیم نوع G نیز در پرندگان، پستانداران، ماهیان و دوزیستان وجود دارد. اگرچه این نوع لیزوزیم ابتدا تنها محدود به مهره‌داران در نظر گرفته می‌شد، ولی اخیراً ژن‌های عملکردی لیزوزیم نوع G در بی‌مهرگانی مانند صدف‌های دوکفه‌ای شناسایی شده است (Lee et al., 1988). سومین نوع لیزوزیم یافت شده در قلمرو جانوران، لیزوزیم موجود در بی‌مهرگان است که اخیراً مورد توجه بیش‌تری قرار گرفته است. لیزوزیم، یک آنزیم موکولیتیک است و به طور گسترده‌ای در جانداران مختلف شامل باکتریوفاژها، گیاهان، بی‌مهرگان و مهره‌داران وجود دارد و در ترشحات جانوران مثل موکوس، بزاق و اشک و تعداد زیادی از بافت‌ها شامل خون و واکوئل‌های سلولی گیاهان یافت می‌شود. این آنزیم پیوند گلیکوزیدی[2] β ۴-۱ بین N-استیل مورامیک اسید[3] و N-استیل گلوکز آمین[4] لایه پتیدوگلیکان را شکسته و بدین طریق از تهاجم باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. این آنزیم به ساختارهای حاوی مورامیک اسید حمله کرده، گلیکوکیتین را هیدرولیز می‌کند و اثر تخریبی محدودی بر

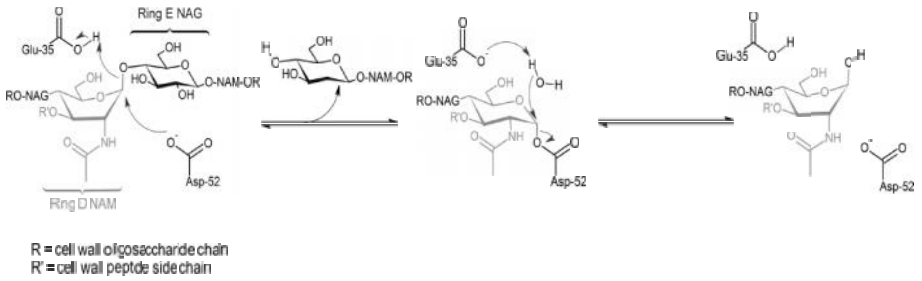
1- Lysozyme

2- Glycosidic bond
3- N-Acetylmuramic acid
4- N-Acetylglucosamine

کیتین که ترکیب عمده دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی بی‌مهرگان است، دارد (سلطانی، ۱۳۸۷).

لیزوزیم یک زنجیره پلی‌پپتیدی ۱۲۴ آمینو اسیدی است که وزن مولکولی حدود ۱۴/۴ کیلودالتون و فعالیت بهینه در pH ۵/۷ دارد. با این وجود، اختلافاتی در pH مطلوب فعالیت در بین ماهیان آب شیرین و دریایی گزارش شده است (سلطانی، ۱۳۸۷). اگرچه ساختار اولیه سه نوع لیزوزیم شناخته شده شباهت‌های کمی با هم دارند ولی ساختار سوم آن‌ها دارای شباهت‌های قابل ملاحظه‌ای است. لیزوزیم سفیده تخم مرغ، اولین آنزیمی است که ساختار سه بعدی آن با روش کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین شد. این آنزیم دو دمین دارد که دمین N- ترمینال به طور عمده دارای صفحات بتا و C- ترمینال شامل مارپیچ‌های آلفا است و توسط یک شکاف عمیق که حاوی جایگاه فعال آنزیم است از هم جدا شده‌اند.

هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی β ۴-۱ بین N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید، از طریق یک واکنش جابه‌جایی دوگانه اتفاق می‌افتد. در مرحله اول واکنش، گروه کربوکسیلات آسپارتات ۵۲ به عنوان یک هسته دوست عمل می‌کند و واسطه گلیکوزیل را تشکیل می‌دهد که منجر به وارونه شدن کنفیگوراسیون ساختار می‌شود. در اینجا گلوتامات ۳۵ به عنوان یک اسید عمومی عمل می‌کند که دهنده پروتون به اکسیژن گلیکوزیدی است و شکستن پیوند را تسهیل می‌کند. در مرحله دوم گروه کربوکسیلات آنزیم از حد واسط آنزیم- گلیکوزیل به وسیله آب حذف می‌شود که این مرحله نیز با وارونگی کنفیگوراسیون همراه است (Mondon et al., 2000).



شکل ۱: مکانیسم عمل لیزوزیم (منبع: http://medlibrary.org).

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)، از خانواده Cyprinidae، یکی از گونه‌های بومی دریای خزر است. اندازه آن بین ۵۵-۴۵ سانتی‌متر و وزن آن به ندرت به ۵ کیلوگرم می‌رسد. جمعیت آن به طور عمده در پاییز و بهار در رودخانه‌های ایران و در آب‌های شیرین نواحی جنوب و جنوب غربی دریای خزر یافت می‌شود. در ماهیان، لیزوزیم اغلب در بافت‌های غنی از لکوسیت‌ها مانند قسمت قدامی کلیه و بافت‌های پوست، آبشش و دستگاه گوارش وجود دارد. این نواحی در ماهیان بیش‌تر از سایر مناطق مورد تهاجم باکتری قرار می‌گیرند. همچنین لیزوزیم به میزان قابل توجهی در تخم ماهیان وجود دارد که نشان‌دهنده خاصیت ضدمیکروبی این آنزیم و نقش مهم آن در مقابله با عوامل عفونی در ماهیان است.

با توجه به ارزش اقتصادی بالای ماهی سفید دریای خزر به عنوان یک منبع ارزشمند غذایی به ویژه در مناطق بومی و کاهش جمعیت این گونه منحصر به فرد در اثر بهره-برداری بیش از حد و همچنین مقاومت پایین آن در برابر عوامل بیماری‌زای عفونی با منشاء باکتریایی، مطالعه سیستم ایمنی ماهی سفید به ویژه پروتئین‌های با ویژگی ضدباکتریایی، که از جمله مهم‌ترین آن‌ها لیزوزیم است ، در بهبود مقاومت و کاهش تلفات آن مفید خواهد بود. همچنین لیزوزیم در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و داروسازی کاربرد فراوان دارد. با توجه به کاربردهای فراوان این آنزیم و اهمیت آن در سیستم ایمنی ماهی سفید، در این مطالعه آنزیم لیزوزیم از ماهی سفید دریای خزر جدا شد و خصوصیات بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری *Micrococcus lysodeikticus* از شرکت سیگما و لیزوزیم، SDS، تریس، آمونیوم سولفات و سایر مواد مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌برداری از ماهی سفید دریای خزر در اسفند ۱۳۹۲ در بخش دریایی منطقه جفرود انزلی انجام شد، سپس بافت فوق کلیه از ماهی جدا شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تهیه عصاره بافتی

مقدار یک گرم از هر بافت در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۶ رقیق و با

استفاده از دستگاه سونیکاتور (3000 Sonicator Misonix) سونیکیت شد. سپس عصاره به دست آمده به وسیله دستگاه سانتریفیوژ (Hettich) در ۵۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی از رسوب جدا شد.

کشت باکتری

در این مرحله، سوسپانسیونی از باکتری لیوفیلیزه[1] *Micrococcus lysodeikticus* با استفاده از آب استریل تهیه شد و روی محیط کشت Muller Hinton Agar کشت داده شد. سپس، محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (Labcon) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک شد. در مرحله بعد، باکتری‌های رشد یافته پس از رقیق شدن در آب استریل در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از خارج کردن محلول رویی، رسوب باقی‌مانده به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه فریز درایر (Vacuum Brand GMBH، آلمان) قرار داده شد. باکتری جامد به دست آمده جهت انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

1- Lyophilized

خالص‌سازی جزئی آنزیم

رسوب دهی پروتئین

برای خالص‌سازی جزئی لیزوزیم از روش آمونیوم سولفات و در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد استفاده شد. پس از انحلال کامل آمونیوم سولفات، محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب به دست آمده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶ حل شد. سپس، نمونه‌ها دیالیز شد و باندهای پروتئینی با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE مشاهده شد.

سنجش لیزوزیم بافتی

برای سنجش فعالیت لیزوزیم از روش اصلاح شده Shugar (۱۹۵۲) استفاده شد. مقدار ۳۰ میکرو لیتر از آنزیم به ۲/۹ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (۲ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار، pH ۶/۲) اضافه شد و تغییرات جذب به مدت ۳ دقیقه در ۴۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Pharmacia) بررسی شد. همچنین برای بررسی pH بهینه آنزیم از بافر میکس که مخلوطی از بافر فسفات ۰/۲ مولار و بافر

سیترات ۰/۱ مولار بود، استفاده شد. یک واحد فعالیت معادل با کاهش کدورت ۰/۰۰۱ در مدت یک دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر و pH ۶/۲ است. لازم به ذکر است که در این مطالعه از لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL[1]) برای مقایسه با لیزوزیم به دست آمده از ماهی سفید به عنوان استاندارد استفاده شد.

نتایج و بحث

سیستم ایمنی غیراختصاصی برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا ضروری است و به عنوان یک عامل تقویت کننده سلامت عمومی عمل می‌کند. مطالعات بسیاری در مورد اجزای سیستم ایمنی جانوران صورت گرفته است و آنزیم‌های کلیدی مانند لیزوزیم که نقش ایمونولوژیک موثری در دفاع غیراختصاصی ایفا می‌کنند، شناسایی شده‌اند (Kopacek et al., 1999). میزان لیزوزیم همواره در بافت‌ها و اندام‌های حساس‌تر و آسیب پذیرتر نسبت به عوامل پاتوژن، بیش‌تر است. بافت فوق کلیه نیز از این قاعده مستثنی نیست و شرایط بافتی مساعدتری برای رشد پاتوژن‌ها دارد، در نتیجه نقش عوامل ایمنی از جمله لیزوزیم در آن برجسته‌تر است. در این مطالعه، آنزیم لیزوزیم از بافت فوق کلیه ماهی سفید جدا شده، خصوصیات بیوشیمیایی آن تعیین شد.

تخلیص جزئی آنزیم لیزوزیم

عصاره به دست آمده از بافت فوق کلیه ماهی سفید در درصدهای مختلف آمونیوم سولفات جداسازی و تغلیظ شد و فرکشن‌های به دست آمده، پس از دیالیز، روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فرکشن ۶۰ درصد دارای باندهای کم‌تر و یک باند قوی در قسمت ۱۴ کیلو دالتون بود و همچنین این فرکشن بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم را داشت. از این رو برای تعیین خصوصیات بیوشیمیایی از آن استفاده شد.

تعیین pH بهینه آنزیم

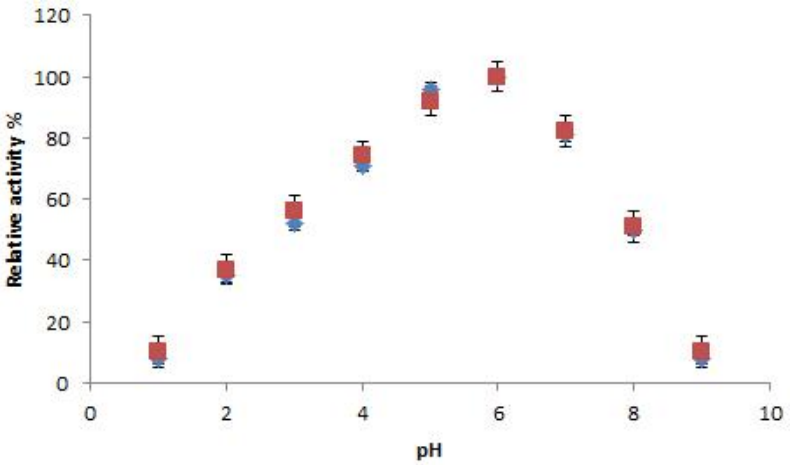
لیزوزیم ماهی سفید در محدوده pH ۷-۵ بیش‌ترین میزان فعالیت را داشت و pH بهینه این آنزیم ۶ بود. همچنین HEWL نیز روند مشابهی با لیزوزیم ماهی سفید را داشت (شکل ۲).

بر اساس مطالعات پیشین، چندین لیزوزیم در pH اسیدی فعال هستند که شامل لیزوزیم نوع C و G در فلاندر ژاپنی[2] (Minagawa et

1- Hen Egg White Lysozyme

2- Japanese Flounder

al., 2001) و لیزوزیم نوع C در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Grinde et al., 1988) و Chlamysin که یک بی‌مهره دریایی است (Nilsen et al., 1999)، می‌شوند.



شکل ۲: منحنی تعیین pH بهینه لیزوزیم ماهی سفید (لوزی) و HEWL (مربع)

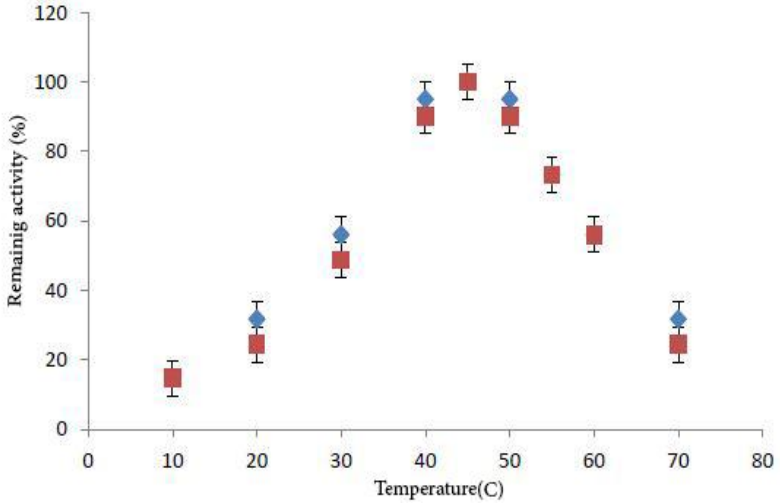
دمای بهینه

بر اساس داده‌های به دست آمده (شکل ۳)، آنزیم در محدوده ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین میزان فعالیت را داشت و دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود. دمای بهینه لیزوزیم اکثر ماهیان در محدوده ۵۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد است (Minagawa et al., 2001). لیزوزیم قزل‌آلای رنگین‌کمان دمای بهینه ۴۵ درجه (Grinde et al ., 1988) و لیزوزیم نوع G در فلاندر نیز در دمای ۲۵-۲۰ درجه فعالیت بالایی را نشان می‌دهد (Minagawa et al., 2001).

اثر غلظت نمک‌های مختلف بر فعالیت لیزوزیم

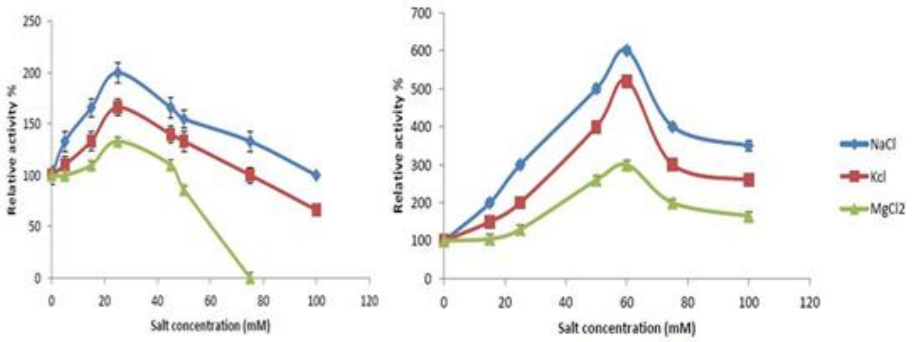
فعالیت آنزیمی در غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۵ میلی‌مولار) از نمک‌های KCl، $MgCl_2$ و NaCl در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار و pH ۶/۲ مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، فعالیت لیزوزیم ماهی سفید با افزایش غلظت نمک‌های KCl، NaCl و $MgCl_2$ در محدوده ۶۰-۰ میلی‌مولار افزایش یافت. در حالی‌که، در غلظت‌های بالاتر کاهش پیدا کرد. در مورد HEWL این افزایش فعالیت در محدوده ۲۵-۰ میلی‌مولار مشاهده شد. قابل توجه است که

NaCl، بیش‌ترین و $MgCl_2$ کم‌ترین تاثیر را روی فعالیت لیزوزیم داشت و لیزوزیم ماهی سفید افزایش فعالیت را در غلظت‌های بالاتری نسبت به HEWL نشان داد. اثر متفاوت نمک بر فعالیت آنزیم می‌تواند به دلیل اختلاف در منشا آنزیم مورد نظر باشد. ماهی سفید جزء ماهیان آب‌های لب‌شور بوده و درجات بالاتر شوری را تحمل می‌کند.



شکل ۳: دمای بهینه لیزوزیم ماهی سفید (لوزی) و HEWL (مربع).

در پژوهشی مشابه، مطالعه اثر نمک بر فعالیت لیزوزیم جدا شده از *Ruditapes philippinarum* نشان داد که با افزایش غلظت NaCl در محدوده ۷۰-۰ میلی‌مولار و $MgCl_2$ در محدوده ۵-۰ میلی‌مولار، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (Misook et al., 2012). همچنین، آنزیم جدا شده از شیر بوفالو (*Bubalus bubalis*) تا غلظت ۵۰ میلی‌مولار NaCl و ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ افزایش فعالیت نشان می‌دهد (Priyadarshini and Kansal, 2003). مکانیسم دقیق اثر یون‌ها بر فعالیت لیزوزیم کاملاً شناسایی نشده است. افزایش فعالیت لیزوزیم در غلظت‌های پایین نمک می‌تواند به دلیل اتصال الکتروستاتیک بین لیزوزیم و دیواره سلولی باکتری و میان‌کنش نمک با گروه‌های قطبی در سطح سلول باشد که سبب تغییر نفوذپذیری می‌شود.

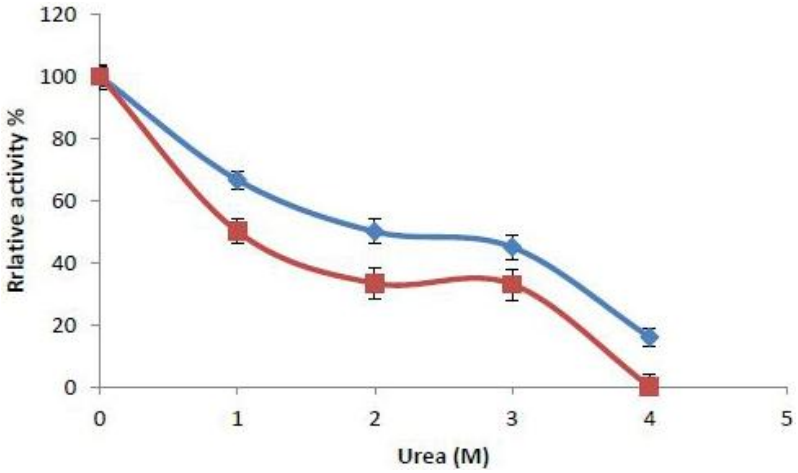


شکل ۴: فعالیت لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نمک. HEWL (چپ)؛ لیزوزیم ماهی سفید (راست).

فعالیت در حضور دناتورانت

اثر دناتورانت اوره بر فعالیت لیزوزیم در غلظت‌های ۴-۰ مولار مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). با توجه به شکل ۵ افزایش غلظت اوره سبب کاهش فعالیت لیزوزیم ماهی سفید و HEWL شد. در مطالعه‌ای مشابه که در مورد خصوصیات بیوشیمیایی لیزوزیم جدا شده از کبد موش انجام گرفت، روند مشابه کاهش فعالیت لیزوزیم با افزایش غلظت اوره مشاهده شد (Sidhan and Gurnani, 1982).

در این مطالعه، عصاره بافت فوق کلیه ماهی سفید دریای خزر تهیه شد و تخلیص جزئی آنزیم با استفاده از نمک آمونیوم سولفات انجام گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticos*، به عنوان سوبسترا، در بافر فسفات pH ۶ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد و pH و دمای بهینه به ترتیب ۶ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. همچنین اثر غلظت‌های مختلف نمک و اوره بر فعالیت لیزوزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم ماهی سفید همانند لیزوزیم سفیده تخم مرغ وابسته به نمک بوده و اوره مهار کننده آنزیم است.



شکل ۵: فعالیت لیزوزیم در غلظت‌های مختلف اوره. ماهی سفید (لوزی)؛ HEWL (مربع).

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به خاطر حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارند.

منابع

سلطانی، م. ۱۳۸۱ ، ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان، انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ص.

Callewaert L., Masschalck B., Deckers D., Nakimbugwe D., Atanassova M., Aertsen A. and Michiels C.W. 2005. Purification of Ivy, a lysozyme inhibitor from *Escherichia coli*, and characterisation of its specificity for various lysozymes. Enzyme and Microbial Technology, 37(2): 205–211.

Grinde B., Jolles J. and Jolles P. 1988. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). European Journal of Biochemistary, 173(2): 269−73.

Kopacek P., Vogt R., Libor Jindrak L., Weise C. and Safarik I. 1999. Purification and characterization of lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 989−997.

Lee J.Y., Chun S.K. and Park S. 1988. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Bulletin Korean Society of Fish Pathology, 1: 54−50.

Minagawa S., Hikima J., Hirono I., Aoki T. and Mori H. 2001. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. Developmental and Comparative Immunology, 25(5-6): 439−445.

Misook K., Minjeong P. and Yoonhwa J. 2012. Purification and characterization of lysozyme from Filipino venus, *Ruditapes philippinarum*: Food Science and Biotechnology, 21(5): 1463-1468

Mondon J.A., Duda S. and Nowak B.F. 2000. Immune response of greenback flounder after exposure to contaminated marine sediment and diet. Marine Environmental Research, 50: 443−50.

Nilsen I.W., Overbo K., Sandsdalen E., Sandaker E., Sletten K. and Myrnes B. 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. FEBS Letters, 464: 153–158.

Priyadarshini S. and Kansal V.K. 2003. Biochemical characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) milk lysozyme. Journal of Dairy Research, 70(4): 467−471.

Shugar D. 1952. Enzymatic assay of lysozyme. Biochimica et Biophysica Acta 8: 302−309.

Sidhan V. and Gurnani S. 1982. Kinetic characterization of rat liver nuclear lysozyme. Journal of Biosciences, 4(2): 191−195.

Aquatic Physiologyand Biotechnology

Vol. 2, No. 4, Winter 2015

Biochemical characterization of lysozyme from of *Rutilus frisii kutum*

Vida Bazrkar[1], Mahmoud Reza Aghamaali[2]*

Received: October 2014 Accepted: February 2015

Abstract

Lysozyme is a key molecule in innate immune system and plays a vital role in the immune systems of many species against bacterial species with hydrolysis of glycosidic bonds between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramicacid of the peptidoglycan layer in the bacterial cell wall and infectional microorganisms. The highest activity of the enzyme in marine species has reported in kidney and spleen. In the present study, lysozyme was extracted from adrenal gland of Caspian Sea *Rutilus frisii kutum*; then, partially purified by ammonium sulfate and properties such as pH and optimum temperature as well as salt and denaturant concentrations on enzyme activity was evaluated. The enzyme activity was assayed using a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. Based on the results, the optimum pH and temperature was found 6 and 45ºC, respectively. Furthermore, lysozyme activity is dependent on salt concentration.

Key words: *Lysozyme*, Rutilus frisii kutum, *Denaturant*, Micrococcus lysodeikticus.

1- M.Sc. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Iran.

*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir