

蛋源性抗菌肽的研究进展

王俊杰^{1,2}, 赵燕^{1,2,*}, 涂勇刚³, 罗序英^{1,2}, 李建科^{1,2}, 杨有仙^{1,2}, 邓文辉^{1,2}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学 生物质转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047; 3.江西农业大学食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 抗菌肽具有分子质量小、热稳定性高、抗菌谱广等特点, 已成为生物领域研究的热点之一, 而富含蛋白质的禽蛋成为分离天然或制备抗菌肽的研究对象。本文综述蛋源性抗菌肽的来源、抗菌活性以及结构与活性之间的关系, 提出蛋源性抗菌肽研究中存在的问题, 并对蛋源性抗菌肽的研究与应用进行展望。

关键词: 抗菌肽; 禽蛋; 抑菌活性; 酶解

Research Progress on Antimicrobial Peptides Derived from Egg Protein

WANG Jun-jie^{1,2}, ZHAO Yan^{1,2,*}, TU Yong-gang³, LUO Xu-ying^{1,2}, LI Jian-ke^{1,2}, YANG You-xian^{1,2}, DENG Wen-hui^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Engineering Research Center of Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
3. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Antibacterial peptides are one of the research focuses in biological field, which has several features, such as small molecular weight, high thermal stability and wide antimicrobial spectrum. Naturally, eggs with high content of proteins have become an important source for preparation of antimicrobial peptides. Here we reviewed the antimicrobial peptides derived from egg proteins, its antimicrobial activity and the relationship between peptide structure and antimicrobial activity. At the end, we summarized the problems existing in the study of antibacterial peptides from egg proteins and discussed directions for further study and their potential application in practice.

Key words: antimicrobial peptides; eggs; bacteriostatic activity; enzymolysis

中图分类号: TS253.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)09-0399-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201309076

抗菌肽(antimicrobial peptides)是一类小分子多肽, 通常带有正电荷, 其分子一般由12~100个氨基酸组成, 分子质量小于10kD^[1]。抗菌肽是生物体天然免疫系统的重要组成部分, 大部分生物利用自身的抗菌肽作为抵御微生物入侵的第一道防线^[2-3]。到目前为止, 人们已从鸟类、昆虫、植物、动物以及人体内发现多种抗菌肽, 并已有大约1500多种抗菌肽被分离出来^[4]。

因抗菌肽具有热稳定性高、抗菌谱广等优点, 从食物蛋白中获得抗菌肽成为生物领域的研究热点之一^[5-6], 而富含蛋白质的禽蛋自然成为分离天然或制备抗菌肽的研究对象。禽蛋蛋白质经过酶解后, 可以得到一些抗菌活性的小分子多肽, 这些抗菌肽具有分子质量小、易吸收等优点, 可将其作为抗生素类药物的替代品以及功能性食品的成分^[7]。本文主要综述蛋源性抗菌肽的来源、抗

菌活性的构效关系, 提出蛋源性抗菌肽研究中存在的问题, 以期为蛋源性抗菌肽以及其他抗菌肽的相关研究提供一定的参考。

1 禽蛋蛋白质

禽蛋是一种世界各地最为普遍食用的食品之一, 其营养丰富, 蛋白质易消化吸收, 富含人体所有必需氨基酸, 并且氨基酸组成非常接近人体所需的必需氨基酸比例^[8]。禽蛋中蛋白质不但含量丰富, 而且种类繁多。已经证实禽蛋中含有数百种蛋白质, 现鉴定出结构不同的蛋白质有40余种^[9-10], 大量研究表明禽蛋类蛋白和多肽不仅为人类提供基本的营养需求, 而且还具有多种生物效应, 如抗菌活性、免疫调节作用、抗癌和抗高血压活性。这些生物活性表明禽蛋蛋白在人类健康、疾病的预

收稿日期: 2012-04-07

基金项目: 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-TS-201112)

作者简介: 王俊杰(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: hnwjj87@163.com

*通信作者: 赵燕(1980—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为农产品加工与生物质转化。E-mail: zhaoyan@ncu.edu.cn

防和治疗中有重要作用^[11], 这为蛋源性抗菌肽的制备提供了丰富的物质基础。

2 蛋源性抗菌肽

目前, 人们已从禽蛋中获得多种抗菌肽, 主要来源于卵白蛋白、卵转铁蛋白、卵黏蛋白、溶菌酶、蛋黄蛋白质。这些抗菌肽具有分子质量小、生物活性强、易吸收等优点, 而且这些蛋源性肽比化学合成的更安全、更健康^[12]。

2.1 卵白蛋白源抗菌肽

卵白蛋白是一种糖蛋白, 在禽蛋蛋清约占54%, 分子质量45kD, 等电点4.7, 通过电泳可将其分离成3种不同含磷量的亚基^[13], 卵白蛋白与丝氨酸蛋白酶抑制剂家族有大约30%的序列同源性^[14], 人们对其进行了深入的研究, 但仍不能揭示其生物功能^[15]。经过胰蛋白酶和糜蛋白酶水解卵白蛋白获得的肽片段具有抗细菌、真菌活性和免疫刺激活性, 这些水解片段用于发酵食品中能够抑制细菌的增值^[16-18]。

Pellegrini等^[18]报道卵白蛋白通过胰蛋白酶在37℃条件下水解处理6h, 水解液经分离纯化得到5个抗菌肽, 测得其序列分别是SALAM(残基36~40)、SALAMVY(残基36~42)、YPILPEYLQ(残基111~119)、ELINSW(残基143~148)、NVLOPSS(残基159~165)。此外, 用胰凝乳蛋白酶将卵白蛋白在37℃条件下水解处理6h, 经分离纯化得到3个抗菌肽, 其序列分别为AEERYPILPEYL(残基127~138)、GIIRN(残基155~159)、TSSNVMEER(残基268~276), 用化学方法合成这些抗菌肽分析其抑菌活性, 发现其对枯草芽孢杆菌具有很强的抑制性, 对大肠杆菌、支气管炎博德特菌、绿脓假单胞菌和黏质沙雷氏菌有一定强度的抑制性。在这8种抗菌肽中, TSSNVMEER和GIIRN对测试菌的杀菌活性最强, 而SALAM的杀菌活性最弱, 但GIIRN对所有的G⁻的活性均较弱。此外, 将这些抗菌肽与其他丝氨酸蛋白酶抑制剂进行序列同源性分析, 发现这些抗菌肽分子中的抗菌序列与其他丝氨酸蛋白酶抑制剂没有序列同源性。这些结果表明哺乳动物胃肠道中的蛋白酶能将卵白蛋白酶解得到抗菌肽类物质, 在为机体提供营养的同时, 还增强了机体的免疫防御功能。

2.2 卵转铁蛋白源抗菌肽

禽蛋中的卵转铁蛋白属于转铁蛋白家族, 在蛋清中约占12%, 卵转铁蛋白有686个氨基酸, 分子质量77.90kD, 等电点6.38, 其与人的血清转铁蛋白有51%的同源性, 与人类和牛科乳铁蛋白有49%的同源性, 在C末端区域有最显著的同源性^[19]。卵转铁蛋白对蛋清中革兰氏阴性腐败微生物的抑制起着重要作用^[20]。

Ibrahim等^[21]在天冬酰胺残基处采用特定裂解的方式从卵转铁蛋白中鉴别出1种抗菌肽, 命名为OTAP-92, Pellegrini^[22]通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解卵转铁蛋白, 在水解液中也分离纯化出这种抗菌肽。OTAP-92是鸡蛋中卵转铁蛋白(OTf)N末端的第109~200位氨基酸序列片段, 包含6个半胱氨酸, 形成3个分子内二硫键, 起到维持OTAP-92三级结构的作用^[21-22]。OTAP-92具有比卵转铁蛋白更广的抗菌广谱性, 除了能够抗金黄色葡萄球菌和大肠杆菌k-12^[23], 还有报道^[24-26]称这种肽具有抗芽孢杆菌和肠炎沙门氏菌以及抗病毒活性, 但它不具有结合金属离子的能力^[21]。Ibrahim等^[23]证实了OTAP-92引起大肠杆菌外膜以剂量依赖性的方式渗透到1-N-苯基萘胺荧光探针上, 这一结论表明OTAP-92是以自我促进吸收的方式穿越细菌的外膜, 在细胞质膜上形成小孔和离子通道, 破坏细胞质膜的生物功能, 进而起到杀死细菌的作用。Giansanti等^[27]从鸡卵转铁蛋白中分离得2个多肽片段DQKDEYELL(hOtrf219~227)和KDLLFK, 且KDLLFK在鸡卵转铁蛋白中重复出现2次, 分别对应于N末端的hOtrf296~301和C末端的hOtrf633~638, 二者与2个牛科乳铁蛋白片段ADRDQYELL(bLf222~230)和EDLIWK(bLf264~269)具有序列同源性, 这2个牛科乳铁蛋白片段对单纯性疱疹病毒有抑制活性。用化学方法合成这2个片段, 发现其能防止鸡胚纤维母细胞被马立克病毒感染, 利用NMR分析这2种化学合成的肽, 它们在溶液中没有产生任何新的构象。这表明这2种肽在卵转铁蛋白中所呈现的氨基酸序列和构象对其抗病毒活性中具有重要作用。

2.3 卵黏蛋白源抗菌肽

卵黏蛋白仅占蛋清蛋白的3.5%, 但在蛋清凝胶性质中起主要作用。据报道卵黏蛋白由1个含少量糖类的亚基(α -亚基, 220kD, 10%~15%的糖)和1个富含糖类的亚基(β -亚基, 400kD, 50%~65%的糖)组成^[28]。由卵黏蛋白获得的抗菌肽对细菌和病毒都有抑制作用^[29-31]。

Kobayashi等^[29]用链霉蛋白酶处理母鸡卵黏蛋白, 获得卵黏蛋白糖肽(OGP), 它能与大肠杆菌(*E. coli* O157:H7)特异性结合, 过碘酸盐处理OGP, 二者结合能力明显下降, 说明*E. coli* O157:H7结合于OGP的糖配基上。OGP经蛋白印迹分析, 发现二者的结合部位类似于*E. coli* O157:H7生物素探针与*E. coli* O157:H7的结合部位, 用唾液酸酶处理过的OGP, 完全失去与*E. coli* O157:H7结合的能力, 表明唾液酸在二者结合中起着重要作用, 进而说明OGP中含有唾液酸的部位能与*E. coli* O157:H7产生特异性结合, 起到抑制大肠杆菌生长的作用。此外, 在食品卫生学领域, OGP还可以用于开发检测*E. coli* O157:H7的新型探针^[29]。Tsuge等^[30]通过体外实验已经证实由链霉蛋白酶处理卵黏蛋白得到的抗菌肽

对新城鸡瘟病毒、牛轮状病毒和人流感病毒均有抑制活性。抗菌肽对病毒的抑制作用主要是影响病毒增殖和病毒基因的表达,有的也具有直接杀伤作用^[30-31]。

2.4 溶菌酶源抗菌肽

溶菌酶(lysozyme)又称胞壁质酶,它广泛存在于鸟类、家禽的蛋清中和哺乳动物的泪液、唾液、血浆、乳汁、胎盘以及体液、组织细胞内,其中在蛋清中含量最丰富,约占蛋清蛋白的3.5%,分子质量14.307kD,等电点10.7,包含129个氨基酸残基^[32],这些残基通过4个二硫键相互交联。溶菌酶抗菌活性与对细菌肽聚糖细胞壁上的N-乙酰氨基胞壁酸的C-1和N-乙酰氨基葡萄糖的C-4糖苷键的分裂活性有关,其对细菌的N-乙酰胞壁酸(NAM)和N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)的 β -1,4糖苷键分裂活性越强,抗菌活性就越高^[20,33]。从溶菌酶中酶解后得到的抗菌多肽具有抗G⁺、G⁻的活性,阻止DNA、RNA的合成,抑制细胞的呼吸,同时还可以作为天然防腐剂,抑制芽孢杆菌生长的作用^[34-41]。

Pellegrini等^[37]采用梭菌蛋白酶分段酶解溶菌酶得到1个具有抗菌活性而没有溶菌酶活性的15肽,它的氨基酸序列是Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg,对应于溶菌酶的第98~112位氨基酸,这一序列被认为是螺旋-环-螺旋域的一部分(87~114残基),位于溶菌酶活性中心裂的上唇部位,用化学方法合成这种肽分析其抑菌活性,发现它对G⁺、G⁻以及白色念球菌都有抑制作用^[38]。经化学修饰后检测其抑菌性发现,序列中第108、111位的Trp残基在其抗菌活性中有着重要作用。Mine等^[39]利用胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解蛋清溶菌酶得到2个抗菌肽,其中1个的序列为Lle-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp,对应于溶菌酶氨基酸序列的98~108位,位于溶菌酶螺旋-环-螺旋结构的中部,能够抑制G⁻大肠杆菌k-12;另1个新性抗菌肽序列为His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly,对应于溶菌酶氨基酸序列的15~21位,能够抑制金黄色葡萄球菌。当这2种肽的质量浓度达到400 μ g/mL时,15h后细菌的细胞膜被破坏,他们认为可能是因为这2种抗菌肽在细菌细胞壁上聚集形成螺旋通道,通过C末端螺旋进入细菌细胞内,与细胞内的生物大分子结合,进而起到抑制细菌的生长。Thammasirirak等^[40]用蛋白酶消化鹅型溶菌酶,经过反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化、液相色谱-串联质谱(LC/MS-MS)、Edman化学降解确定该抗菌肽的序列Thr-Ala-Lys-Pro-Glu-Gly-Leu-Ser-Tyr,这个序列位于鹅型溶菌酶N末端外围部分的第20~28位,经化学合成分析,发现该肽对G⁺、G⁻均有抗菌性,但不具有溶菌酶的活性,通过电子扫描显微镜发现这种抗菌肽作用于细菌细胞膜上,他们认为该抗菌肽的作用机理可能是其 α -螺旋结构可横穿细胞膜,破坏细菌膜结构。序列中的Pro可能

在抗菌活性中也有重要作用,因为当该肽与细菌外膜相互作用时,Pro残基可能有利于促进 α -螺旋结构的形成。Memarpoor-Yazdi等^[41]利用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶以及二者的混合物水解鸡蛋溶菌酶,发现采用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶混合水解鸡蛋溶菌酶得到的水解产物比其他酶水解得到的产物活性要高,采用RP-HPLC分离纯化得到活性片段,并命名为F2片段,利用串联质谱分析法鉴定其序列为NTDGSTDYGLQINSR,该序列对应于溶菌酶的46~61位,分子质量为(1753.98 \pm 0.5)D。利用径向扩散分析法(RDA)分析其活性,结果表明F2片段对G⁺、G⁻均有抑制效果,F2片段对大肠杆菌和肠膜状明串菌株的最小抑菌浓度(MIC)值分别为355.642.2、442.252.8g/mL。F2片段的C末端含有Arg,其在抑菌作用中起着重要作用,这可能是因为F2片段的免疫决定簇是在与Arg残基有关的部位,或者可能就是Arg残基本身,能够与细菌细胞内的生物大分子结合,进而抑制其生长^[42]。

2.5 蛋黄源抗菌肽

蛋黄中的蛋白质的生化功能几乎和蛋白中蛋白质一样,其中多数为磷蛋白和脂肪结合而形成的脂蛋白,包括低密度脂蛋白(65.0%)、卵黄球蛋白(10.0%)、卵黄高磷蛋白(4.0%)和高密度脂蛋白(16.0%)等。

Sugita-Konishi等^[43]从蛋黄蛋白质中获得唾液酸糖肽,给被沙门氏菌感染的小鼠口服该肽,能够有效抑制小鼠脾脏中的细菌增殖,同时还能降低致死率。通过给小鼠口服带有放射性的唾液酸糖肽,发现该化合物通过肠道吸收进入血液,8h内通过尿液排出。当连续服用唾液酸糖肽能够有效抑制沙门氏菌的感染,这种抑制作用是通过内脏抑制细菌的入侵实现的。Herve-Grepinet等^[44]采用亲和色谱柱和反相色谱柱提纯方法从原鸡母鸡的卵黄膜中分离出鸟类 β -防御素11,是一种小分子非糖基化阳离子肽,分子质量为(9271.56 \pm 0.12)D,含有82个氨基酸,序列为LPRDTSRCVGYHGYCIRSKVCPKPF AAFGTCSWRQKTCCVDTTSDFTQCQDKGGHCVSPKIRCLEEQGLGLCPLKRWTCCKEI,采用径向扩散的方法检测出AvBD11对金黄色葡萄球菌(ATCC 29740)和单核细胞增多性李斯特氏菌(EGD)的最小抑菌浓度分别为0.33、0.28 μ mol/L。AvBD11对肠炎沙门菌ATCC 13076、肠炎沙门菌LA5、鼠伤寒沙门菌ATCC 14028和大肠杆菌ATCC 25922的最小抑菌浓度分别为0.31、0.15、0.25、0.37 μ mol/L。他们认为AvBD11抗菌活性与其所带的阳离子和氨基酸有关。

3 蛋源性抗菌肽的构效关系

抗菌肽的活性由分子结构决定,研究表明影响抗菌肽生物活性因素与其所带的正电荷数、水脂两亲结构、氨基酸序列等有关。研究天然抗菌肽的构效关系,有

利于定向设计合成或表达新型抗菌肽分子,开发活性更高、抗菌谱更广的抗菌类物质^[45]。

Powers等^[46]证明了阳离子电荷和疏水两亲结构是抗菌肽抗菌活性的必要条件。带正电荷的抗菌肽能够抑制革兰氏阴性菌的生长,这是因为在革兰氏阴性菌的细胞膜上的脂多糖带有负电荷,抗菌肽的正电荷能够与其静电结合,促进低浓度的抗菌肽在细胞膜上富集,进而起到抑制细菌的作用^[47-48]。疏水作用对其活性的影响是通过改变肽链中Leu、Ile、Val数量实现的,由于疏水基团的存在,肽链在溶液中可以通过疏水作用形成多聚体,增加了对真核细胞膜的亲和力;同时也增加了抗菌肽形成两性 α 螺旋的能力,而 α 螺旋的增加也提高了抗菌肽的稳定性^[49]。

但抗菌肽所带的正电荷和疏水作用并不总与其抗菌活性成绝对正相关性,Pellegrini等^[18]通过研究从鸡的卵白蛋白中提取的8种抗菌肽发现,序列为TSSNVMEER和SALAMVY的抗菌肽虽然带有负电荷,但其抗菌活性和广谱性都比唯一1个带有正电荷的GIIRN要强。TSSNVMEER和AEERYPILPEYL在这8种抗菌肽中疏水性均是最弱之一,但二者的抗菌活性却是最强之一,并且TSSNVMEER具有最广的抗菌广谱性。Herve-Grepine等^[44]发现从蛋中提取的 β -防御素11(AvBD11)和 β -防御素10 3b(AvBD10 3b)分别带有9和10个正电荷,但是二者对李斯特菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌有相似抑菌活性,这表明这2个抗菌肽的抗菌活性并不与其所带正电荷呈线性关系。这些蛋源性抗菌肽的发现对现有的抗菌肽的活性模型提出了挑战,说明从蛋源中获得的抗菌肽的作用模型并不总能用已有的作用模型来解释,需要人们进一步去探讨其作用机理。

蛋源中抗菌肽的作用活性与氨基酸序列也有一定的关系,Pellegrini等^[37]从鸡的溶菌酶中提取出1个抗菌肽,其序列为Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg,用化学方法合成这种抗菌肽,发现其与天然抗菌肽有相同的杀菌活性,当用酪氨酸取代第108位的色氨酸,其抗菌活性明显降低;用酪氨酸取代第111位色氨酸,其抗菌活性完全失去;用精氨酸取代第106位天冬酰胺,增强了其抗菌活性,这说明色氨酸和精氨酸在这种抗菌肽的抗菌活性起着重要作用。由N末端的8个氨基酸序列(I-V-S-D-G-N-G-M)组成的多肽没有抗菌性,而由C末端(N-A-W-V-A-W-R)组成的多肽具有形同的抗菌性,这表明序列N-A-W-V-A-W-R在抗菌活性中起着主要的作用。

4 蛋源性抗菌肽研究存在的问题与展望

虽然蛋源性抗菌肽具有诸多优点,但要实现商业化

应用还需解决一系列研究中存在的问题:1)蛋源性抗菌物质的筛选问题,目前多采酶解分离纯化后,采用抑菌实验筛选抗菌物质,这种方法费时且灵敏性低,因此,寻找快速、灵敏、高通量的筛选抗菌物质的方法是下一步工作的努力方向。2)抗菌肽的制备问题,蛋白质酶解是制备蛋源性抗菌肽主要方法,酶解方法的关键问题是如何对肽键进行定向酶解,也就是如何实现酶切点的暴露与隐藏。目前多数利用亚基解离技术、变性技术、接枝技术以及多酶耦联控制酶解技术等对原料蛋白进行预处理,实现对蛋白质的控制酶解。但是酶解方法存在操作复杂、纯化成本高、产品率低等缺点。3)抗菌肽的作用机理与安全问题,虽然人们提出了几种抗菌机理模型,但蛋源中抗菌肽的抑菌机理尚不能统一定论,并且一些对人体有益的抗菌肽物质是基于体外模型或者有限的临床实验,还需要做进一步的深入研究。

禽蛋是一种大宗食品,为人类提供了丰富的营养物质。此外,禽蛋中种类丰富的蛋白质为抗菌肽提供了一个良好的来源。从禽蛋蛋白质中酶解获得的小分子抗菌肽类物质,具有高效、低毒、易吸收等特点。随着生物学技术的发展,特别是蛋白质工程和酶工程技术的广泛应用,人们将会从禽蛋中揭示更多的抗菌活性肽,为替代市场上产生耐药性的抗生素类药物的开发提供思路 and 方向,同时抗菌肽类制品还可以作为天然防腐剂广泛应用于食品行业,对提高禽蛋的深加工、增加附加值也将会有重大的意义。

参考文献:

- [1] HANCOCK R E. Peptide antibiotics[J]. Lancet, 1997, 349: 418-422.
- [2] HANCOCK R E, LEHRER R. Cationic peptides: a new source of antibiotics[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(2): 82-88.
- [3] WANG Z, WANG G. APD: the antimicrobial peptide database[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: 590-592.
- [4] BULET P, STOCKLIN R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation[J]. Protein Pept Lett, 2005, 12(1): 3-11.
- [5] PELLEGRINI A. Antimicrobial peptides from food proteins[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(16): 1225-1238.
- [6] WAKABAYASHI H, TAKASE M, TOMITA M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(16): 1277-1287.
- [7] MINE Y. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals[M]. New York: Wiley-Blackwell Publishing, 2010: 247-263.
- [8] MANN J, TRUSWELL A S. Essentials of human nutrition[M]. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2012.
- [9] FARINAZZO A, RESTUCCIA U, BACHI A, et al. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(8): 1241-1252.
- [10] D'AMBROSIO C, ARENA S, SCALONI A, et al. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries[J]. Journal of Proteome Research, 2008, 7(8): 3461-3474.
- [11] MINE Y, KOVACS-NOLAN J. New insights in biologically active

- proteins and peptides derived from hen egg[J]. World's Poultry Science Journal, 2006, 62(1): 87-96
- [12] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [13] STEVENS L. Egg white proteins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1991, 100(1): 1-9.
- [14] HUNTINGTON J A, STEIN P E. Structure and properties of ovalbumin[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1/2): 189-198.
- [15] IBRAHIM H. Insights into the structure-function relationship of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme[M]. New York: CRC Press, 1997.
- [16] MINE Y, D'SILVA I. Egg bioscience and biotechnology[M]. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2008: 141-184.
- [17] BIZIULEVICIUS G A, KISLUKHINA O V, KAZLAUSKAITE J, et al. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a "cause and effect" theory of bifunctionality[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(1): 131-138.
- [18] PELLEGRINI A, HULSMIEIER A J, HUNZIKER P, et al. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1672(2): 76-85.
- [19] WU J, ACERO-LOPEZ A. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation[J]. Food Research International, 2012, 46(2): 480-487.
- [20] HUOPALAHTI R. Bioactive egg compounds[M]. Heidelberg: Berlin Springer Verlag, 2007: 191-198.
- [21] IBRAHIM H R, IWAMORI E, SUGIMOTO Y, et al. Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1401(3): 289-303.
- [22] PELLEGRINI A. Antimicrobial peptides from food proteins[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(16): 1225-1238.
- [23] IBRAHIM H R, SUGIMOTO Y, AOKI T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1523(2/3): 196-205.
- [24] ABDALLAH F B, CHAHINE J M. Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin[J]. Eur J Biochem, 1999, 263(3): 912-920.
- [25] BARON F, COCHET M F, PELLERIN J L, et al. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*[J]. J Food Prot, 2004, 67(10): 2302-2305.
- [26] GIANSAANTI F, ROSSI P, MASSUCCI M T, et al. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2002, 80(1): 125-130.
- [27] GIANSAANTI F, MASSUCCI M T, GIARDI M F, et al. Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(1): 69-73.
- [28] HARISH PRASHANTH K V, THARANATHAN R N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview[J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(3): 117-131.
- [29] KOBAYASHI K, HATTORI M, HARA-KUDO Y, et al. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(18): 5740-5746.
- [30] TSUGE Y, SHIMOYAMADA M, WATANABE K. Differences in hemagglutination inhibition activity against bovine rotavirus and hen Newcastle disease virus based on the subunits in hen egg white ovomucin[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(9): 1505-1506.
- [31] TSUGE Y, SHIMOYAMADA M, WATANABE K. Structural features of Newcastle disease virus and anti-ovomucin antibody-binding glycopeptides from pronase-treated ovomucin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(7): 2393-2398.
- [32] CHARTER E A, LAGARDE G. Natural antimicrobial systems: lysozyme and other proteins in eggs[M]. RICHARD K R. Encyclopedia of food microbiology. Oxford: Academic Press Elsevier, 1999: 1582-1587.
- [33] YOSHINORI M. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality[J]. Trends in Food Science & Technology, 1995, 6(7): 225-232.
- [34] PELLEGRINI A, THOMAS U, WILD P, et al. Effect of lysozyme or modified lysozyme fragments on DNA and RNA synthesis and membrane permeability of *Escherichia coli*[J]. Microbiological Research, 2000, 155(2): 69-77.
- [35] IBRAHIM H R, INAZAKI D, ABDOU A, et al. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1726(1): 102-114.
- [36] ABDOU A M, HIGASHIGUCHI S, ABOUELEININ A M, et al. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species[J]. Food Control, 2007, 18(2): 173-178.
- [37] PELLEGRINI A, THOMAS U, BRAMAZ N, et al. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme[J]. J Appl Microbiol, 1997, 82(3): 372-378.
- [38] IBRAHIM H R, THOMAS U, PELLEGRINI A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action[J]. J Biol Chem, 2001, 276(47): 43767-43774.
- [39] MINE Y, MA F, LAURIAU S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(5): 1088-1094.
- [40] THAMMASIRIRAK S, PUKCOTHANUNG Y, PREECHARRAM S, et al. Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2010, 151(1): 84-91.
- [41] MEMARPOOR-YAZDI M, ASOODEH A, CHAMANI J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 278-286.
- [42] CHODA N, YANO Y, MATSUZAKI K. Roles of Lys and Arg in the activity of antimicrobial peptides[J]. Biophysical Journal, 2010, 98(Suppl 1): 84.
- [43] SUGITA-KONISHI Y, SAKANAKA S, SASAKI K, et al. Inhibition of bacterial adhesion and salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(12): 3607-3613.
- [44] HERVE-GREPINET V, REHAULT-GODBERT S, LABAS V, et al. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(10): 4401-4409.
- [45] FJELL C D, HISS J A, HANCOCK R E, et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(1): 37-51.
- [46] POWERS J P S, HANCOCK R E W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity[J]. Peptides, 2003, 24(11): 1681-1691.
- [47] PELLEGRINI A, THOMAS U, von FELLEBERG R, et al. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character[J]. J Appl Bacteriol, 1992, 72(3): 180-187.
- [48] BANGALORE N, TRAVIS J, ONUNKA V C, et al. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G[J]. J Biol Chem, 1990, 265(23): 13584-13588.
- [49] LEE D G, KIM H N, PARK Y, et al. Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1598(1/2): 185-194.