

LISOZIMA: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ALERGENICIDAD

LYSOZYME: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ALLERGENICITY

WILMAN CARRILLO

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC-UAM) Madrid- España.

Resumen

Desde que la lisozima fue descubierta por Alexander Fleming en 1922, muchos son los trabajos que se han llevado a cabo para describir las distintas actividades biológicas de esta proteína como son su actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, analgésica, antitumoral y antioxidante. Su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas es la actividad más ampliamente estudiada. Muchas investigaciones se han realizado para ampliar el espectro antibacteriano y poder atacar bacterias Gram-negativas. Se han llevado a cabo modificaciones térmicas, químicas, enzimáticas, mutaciones genéticas y efectos sinérgicos con otros compuestos, y se consiguió exitosamente ampliar el espectro antibacteriano, proponiendo en todos los casos que dicha actividad es independiente de su actividad enzimática natural. En este trabajo destacamos todas las propiedades estructurales de la lisozima y sus principales actividades biológicas y las investigaciones que se han llevado a cabo para potenciar dichas actividades.

Palabras claves: Lisozima, Actividad muramidasa, Actividad antibacteriana y Péptidos antibacterianos.

English

Português

LYSOZYME: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ALLERGENICITY

SUMMARY

Since lysozyme was discovered by Alexander Fleming in 1922, many papers have been published on the different biological activities of this protein, such as its antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, analgesic, antitumor and antioxidant properties. Its antibacterial activity against Gram-positive bacteria is the most widely studied. Much research has been done to widen the antibacterial spectrum and to attack the Gram-negative bacteria. Thermal, chemical and enzymatic modifications, as well as genetic mutations and synergistic effects, with other compounds have been made. The antibacterial spectrum was successfully widened in all cases, suggesting that this activity is independent of its natural enzymatic activity. In this paper we describe the structural properties of lysozyme and its main biological activities, and also the research that has been carried out to maximize these activities.

Key words: lysozyme, muramidase activity, antibacterial activity, antibacterial peptides

LISOZIMA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ALERGENICIDADE

RESUMO

Desde que a lisozima foi descoberta por Alexandre Fleming em 1922, muitos são os trabalhos que foram realizados para descrever as diferentes atividades biológicas desta proteína, como são sua atividade bacteriana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral e antioxidante. Sua atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas é a atividade mais amplamente estudada.

Muitas pesquisas foram realizadas para ampliar o espectro antibacteriano e poder atacar bactérias Gram-negativas. Foram realizadas modificações térmicas, químicas, enzimáticas, mutações genéticas e efeitos sinérgicos com outros compostos, e obteve-se com sucesso ampliar o espectro antibacteriano, propondo em todos os casos que tal atividade é independente da sua atividade enzimática natural.

Neste trabalho destacamos todas as propriedades estruturais da lisozima e suas principais atividades biológicas e as pesquisas que foram realizadas para potenciar tais atividades.

Palavras-chaves: Lisozima, Atividade muramidase, Atividade antibacteriana e Péptidos antibacterianos.

La lisozima

La lisozima, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa, E. C. 3. 2.1. 17), fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming. Es la primera proteína de la que se dispuso de su secuencia por cristalografía de rayos-X, además la primera enzima de la que se determinó su mecanismo enzimático gracias a David Phillis en 1966 (Jollés y Jollés, 1984).

Desde su descubrimiento esta proteína ha jugado un papel muy importante en los modelos enzimáticos, y en muchos aspectos de la biología moderna, incluyendo la química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), inmunología y plegamiento de proteínas (Chantal y col., 2007).

La lisozima se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva y es además secretada por leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba y Ogawa, 2005).

En los humanos, la lisozima juega un rol muy importante en la defensa frente a las infecciones. En las lágrimas se encuentra en cantidades comprendidas entre 3.000 y 5.000 µg/mL y protege frente a bacterias y virus (Lesnierowski y col., 2007). En la saliva protege frente a una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos de diferentes especies de *Candida* (Tenovuo, 2002; Samaranayake y col., 2008).

Además de la actividad antibacteriana, se han descrito muchas otras actividades biológicas de la lisozima: por ejemplo la actividad antiviral. La lisozima administrada por vía oral y cutánea previene enfermedades de la piel, como herpes simple y la varicela, debido a su actividad antiinflamatoria (Sava, 1996). Se ha descrito que posee actividad frente al virus del VIH tipo 1 en ensayos *in vitro* (Lee-Huang y col., 1999), proponiéndose como mecanismo de acción, que la actividad antiviral puede estar asociada con su carga positiva y las interacciones con la superficie del virus cargadas negativamente (Losso y col., 2000).

Se han descrito otras actividades a la lisozima de huevo como actividad antioxidante (Liu y col., 2006), actividad antiheparínica (Mega y col., 1994), actividad antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim y col., 2001).

También se ha descrito en la bibliografía que la lisozima humana actúa como agente inmunomodulante, jugando un papel muy importante en el mecanismo de defensa natural (Koslov y col., 2000; Cho y col., 2005). La función del sistema inmune es reconocer y controlar los microorganismos, basándose en la habilidad de presentar y reconocer productos conservados del metabolismo microbiano que son únicos de los microorganismos y no se producen en células eucarióticas. Como ejemplo de estas moléculas asociadas a

patógenos encontramos al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, secuencias de ADN no metiladas y peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y negativas. Varias sustancias antimicrobianas y enzimas hidrolíticas están distribuidas dentro de los gránulos citoplasmáticos de neutrófilos y son eficientes en la defensa frente a bacterias. Estudios recientes han demostrado que la lisozima es uno de los principales componentes de los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y el principal producto secretado por los macrófagos, por ello puede actuar en la activación de estas células frente a los procesos de inflamación por la presencia de bacterias (Ganz y col., 2003; Cho y col., 2005).

Organismos internacionales como la FAO/WHO y muchos países como Alemania, Austria, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Italia, Japón y Reino Unido tienen reconocida a la lisozima de clara de huevo como una proteína no tóxica y por ello es utilizada para fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos, se estima que más de 100 toneladas de lisozima son usadas anualmente para estos propósitos (Mine y col., 2004). La FDA (Administración de drogas y alimentos en Estados Unidos) considera a la lisozima como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para el uso en la industria quesera.

La lisozima de huevo está catalogada como aditivo de uso alimentario con el código (E-1105). Vegetales frescos, pescado, carne, frutas, langostinos y otros alimentos han sido preservados por contacto de la superficie del alimento con la lisozima. Esta proteína también es usada para conservar otros alimentos como pepinillos Kimuchi, sushi y fideos chinos. Entre sus usos encontramos la protección en los quesos frente a bacterias dañinas como el *Clostridium tyrobutyricum* que provoca la hinchazón de los quesos. Varias patentes garantizan que la lisozima a bajas concentraciones controla el crecimiento de microorganismos en quesos durante más de 24 meses. Recientemente se han creado plásticos que contienen la lisozima adherida fuertemente a un biopolímero, estos biofilms son utilizados como conservantes por contacto del alimento con los biopolímeros (Mine y col., 2004).

La lisozima también está adquiriendo gran importancia en la elaboración del vino. El dióxido de sulfuro es comúnmente usado como conservante en enología. Actúa como un antioxidante para proteger de la oxidación a los compuestos fenólicos. Además el SO₂ inhibe las oxidasas endógenas y previene la fermentación indeseable como fermentación acética y maloláctica. Se quiere reducir el uso de SO₂ por su efecto tóxico en la salud humana. Por ello se han establecido unos límites para añadirlo en la fabricación de los vinos. Se han realizado muchos estudios para desarrollar protocolos enológicos con aditivos alternativos que sustituyan al

sulfito en las mencionadas funciones. Mundialmente se busca la fabricación de vinos libres de sulfitos. A partir de los años 1990 el uso de la lisozima de clara de huevo ha sido propuesto para el control de la fermentación maloláctica en la elaboración de los vinos, porque promueve la estabilización microbiana y previene el aumento de las concentraciones de ácido acético y aminas biógenas. Se ha demostrado que la lisozima previene el crecimiento de *Oenococcus oeni* y bacterias lácticas alterantes. De acuerdo a la legislación de la comunidad europea EC Nr 2066 se permite agregar 500 mg/L para vinos tintos y 250 mg/L para los blancos (Sonni y col., 2009; Weber y col., 2009). Aunque en la industria del vino se utiliza para controlar el crecimiento de bacterias lácticas (*Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*), tiene poca acción sobre las bacterias Gram-negativas (bacterias acéticas) y levaduras por lo que no puede reemplazar totalmente al anhídrido sulfuroso (Delfini y col., 2004; Tirelli y De Noni, 2007).

Estructura de la lisozima de clara de huevo

La lisozima se clasifica en seis tipos: lisozima de gallina (tipo-C) entre ellas se encuentran lisozima de estómago y lisozima de unión a calcio, lisozima de ganso (tipo-G), lisozima de plantas, lisozima bacteriana, lisozima del fago T4 y lisozima de invertebrados (tipo-I). Cuatro de estas lisozimas: tipo-C, tipo-I, tipo-G y lisozima T4 tienen la estructura tridimensional muy parecida (Thammasirirak y col., 2010).

De todas las lisozimas existentes, la lisozima de huevo de gallina ha sido la más estudiada, por encontrarse en alta concentración (1-3 g/L de clara de huevo), su fácil manejo y la posibilidad de purificación por cristalización en NaCl al 5% a pH 9,5. La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,4% de las proteínas de la clara de huevo. Su masa molecular es 14.307 Da y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. Es una proteína muy catiónica, con un elevado punto isoeléctrico (pI= 10,7), con 19 aminoácidos en su secuencia cargados positivamente. Posee cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las ocho cisteínas presentes en la molécula (You y col., 2010).

Se han desarrollado muchos métodos de aislamiento para la lisozima de clara de huevo de gallina desde cromatografía de intercambio catiónico o ultrafiltración hasta llegar a métodos como cromatografía de intercambio iónico con columnas y membranas microporosas (Chiu y col., 2007; Jiang y col., 2001).

La característica más llamativa de la molécula de la lisozima es una hendidura prominente, el sitio de fijación del sustrato, que atraviesa una cara de la molécula. El sitio catalítico de la lisozima se encuentra dividido en seis zonas: A, B, C, D, E y F que a su vez se unen a seis

azúcares. En el sitio catalítico se encuentran dos aminoácidos que son necesarios para que ocurra la catálisis que son (Glu 35 y Asp 52) siendo estos los grupos funcionales en el centro de reacción de la lisozima que tienen propiedades catalíticas requeridas, estos residuos son invariables en la familia de la lisozima. Por medio de la mutación dirigida se comprobó la importancia de estos aminoácidos, cuando se cambia Glu 35 por Gln se genera una enzima sin actividad catalítica detectable, por consiguiente Glu 35 debe ser esencial para la actividad enzimática; por otro lado cuando se cambió Asp 52 por Asn se obtiene una enzima que no tiene más del 5% de su actividad catalítica, por consiguiente se dedujo que Asp 52 es importante para la actividad enzimática de la lisozima (Callewaert y Michellies, 2010; Ibrahim y col., 1998).

La estructura de la lisozima se compone de dos dominios o lóbulos, el dominio α con los residuos (1-40 y 90-129) y el β dominio (41-89), unidos por una larga α -hélice donde se encuentra el sitio activo. La región alfa se compone de cinco segmentos helicoidales que son: hélice A (4-15), hélice B (24-36), hélice C (88-99), hélice D (108-115) y hélice 310 (120-125). La región beta laminar con tres cadenas: lámina- β (41-60), hélice central 310 (79-84) y un largo bucle (61-78) (Mine y col., 2004). En la región alfa tiene dos puentes disulfuro (**Cys 6-Cys 127** y **Cys 30-Cys 115**), en el dominio beta posee otro (**Cys 64-Cys 80**) y el cuarto puente (**Cys 76-Cys 94**) se encuentra entre los dos dominios (Figura 1). Estos cuatro puentes disulfuro confieren a la lisozima una elevada estabilidad térmica (Matsumura y col., 1989). Como es de esperar, la mayoría de las cadenas laterales no polares están en el interior de la molécula, fuera del contacto con el solvente acuoso. Además es una proteína estable en soluciones ácidas (Lesnierowski y col., 2007).

Funciones biológicas de la lisozima

La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG) [Figura 2], debilitando así la pared celular.

El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis [Figura 3].

FIGURA 1

Estructura de la lisozima de huevo. A) Estructura tridimensional donde se observa la hendidura de fijación del sustrato y B) Representación MOLSCRIPT de la lisozima nativa con el dominio- α con las α -hélices A-D y C terminal 310 hélice en color púrpura, el dominio β contiene tres láminas β entrecruzadas y un largo loop de color verde. Las hélices están representadas como cilindros. Los átomos de los cuatro puentes disulfuro, cisteínas en azul y azufre en rojo. Los dos puentes disulfuro del dominio α son: (Cys6-Cys127 y Cys30-Cys115). Los otros puentes disulfuro son Cys64-Cys80, localizado en el dominio- β , y Cys76-Cys94, se encuentra entre los dos dominios (Figura tomada de Van den Berg y col., 1999).

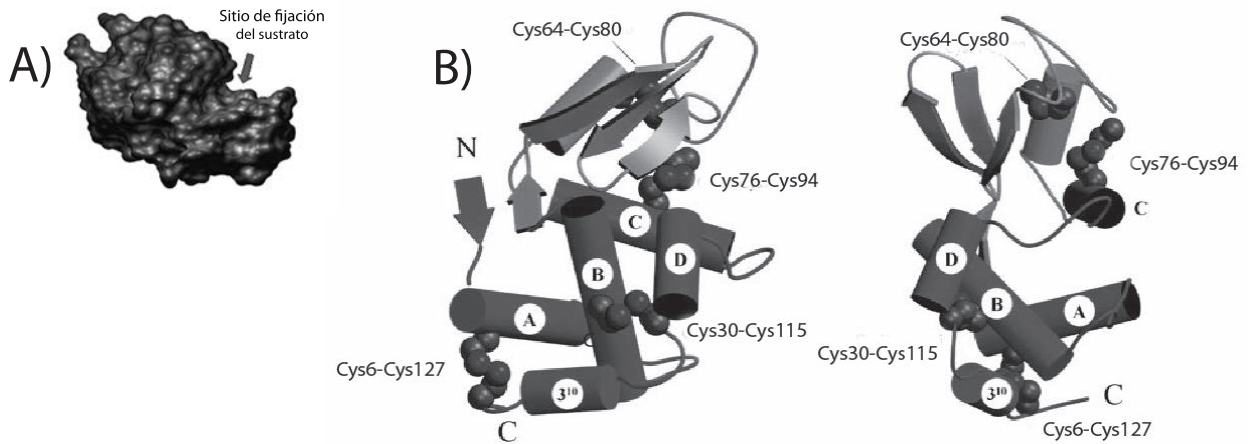


FIGURA 2

Estructuras repetitivas del peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Se muestra el sitio de corte de la lisozima

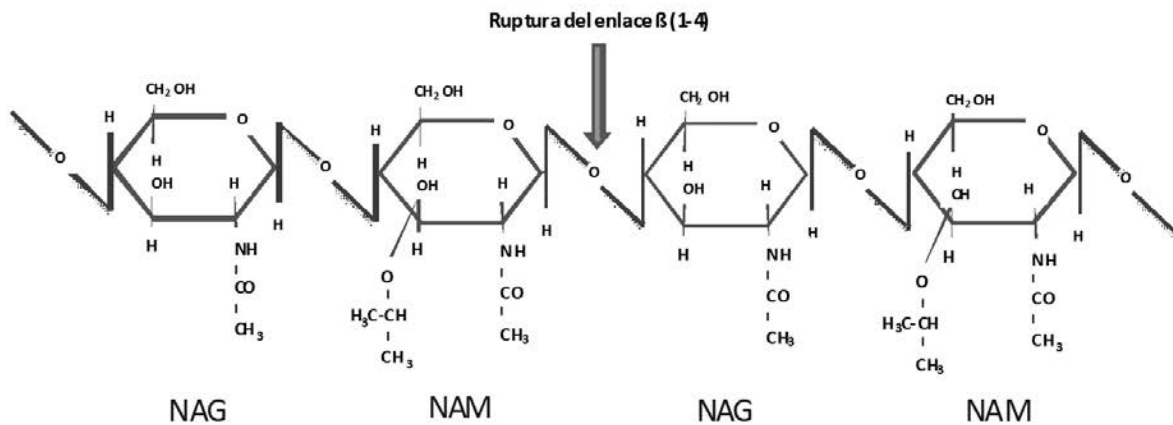


FIGURA 3

Formación de protoplastos: en una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana citoplasmática.

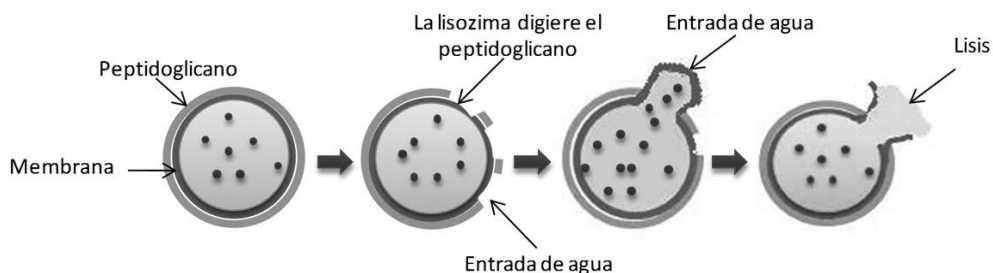
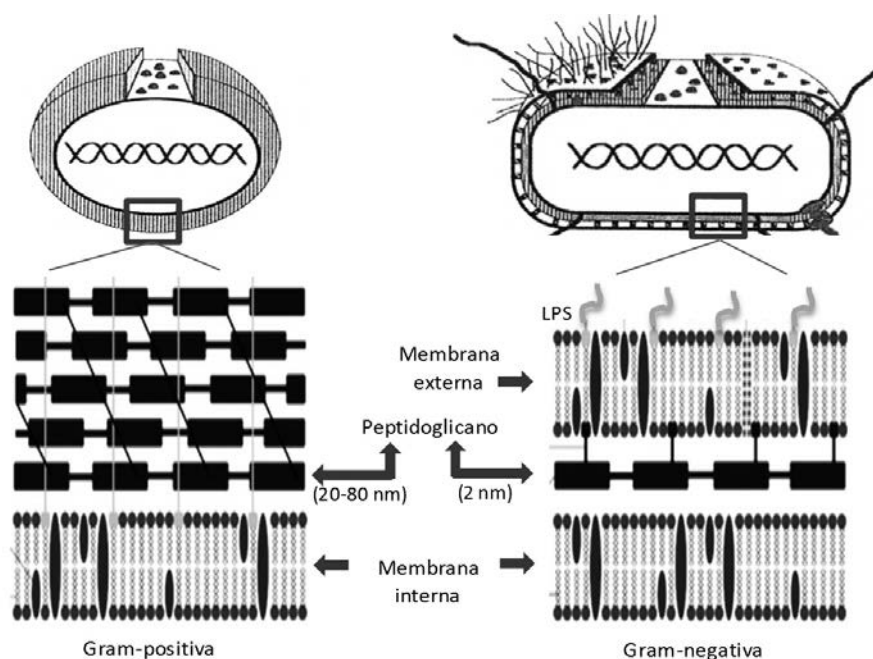


FIGURA 4

Comparación de la estructura de paredes celulares de bacterias Gram-positiva (izquierda) y Gram-negativa (derecha). A) Morfología de las células B). Corte sobre la estructura morfológica (Imagen tomada y modificada de Ibrahim y col., [2002]).



La lisozima es casi inactiva frente a microorganismos Gram-negativos por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa [Figura 4 (Ibrahim y col., 2002)]. También es importante destacar que en las bacterias Gram-positivas el peptidoglicano representa alrededor del 90 % de la pared celular, mientras que en las Gram-negativas apenas abarca el 10 %.

La desnaturalización por calor da lugar a una estructura dimérica que conserva dos puentes disulfuro que siguen reteniendo su actividad lítica frente a las paredes bacterianas. Esta forma dimérica también llega a formarse durante el almacenamiento de los huevos (Back, 1984). Estas formas oligoméricas de la lisozima de huevo han sido descritas en diferentes trabajos. Estos dímeros se obtuvieron mediante diferentes métodos desde desnaturalización térmica en diferentes soluciones, tratamiento con agentes reductores, agentes de unión química, ultrafiltración, calentamiento con vacío, radiación, etc., (Ibrahim, 1996 a, b; Lesnierowski y col., 2004). En algunos de los trabajos se le atribuyen actividades biológicas a estas formas diméricas de la lisozima, como por ejemplo actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas y positivas, virus y hongos. Nika Health Products Inc (Patente Nº US00546649A) ha desarrollado un sistema de preparación de un producto puro de dímero de

lisozima para usarlo en tratamientos virales y antibacterianos. Se sabe que el dímero de la lisozima simula la síntesis de algunas interleucinas y de los interferones alfa y gamma. Además también modula la generación de TNF alfa (factor de necrosis tumoral), previniendo los efectos negativos por cantidades excesivas. El dímero de la lisozima induce la actividad de células fagocíticas y también previene la producción de radicales libres. Se ha sugerido que la lisozima en las células del sistema inmunológico se encuentra en forma dimérica, parece ser que esta estructura es menos tóxica que el monómero, y además ejerce un efecto inmunomodulador. El dímero de la lisozima es utilizado en veterinaria y medicina (Malinowski, 2001).

Durante la lactación, la lisozima protege a los bebés frente a infecciones respiratorias y gastrointestinales. La exposición a las bacterias en los neonatos ocurre en el tracto gastrointestinal, la mucosa intestinal no contiene normalmente fagocitos o células inmunológicamente maduras, por ello tiene que existir un sistema de defensa del organismo. En el momento del desarrollo del sistema inmune, la leche materna aporta al neonato entre 0,3-0,5 g/L de lisozima proporcionando de esta manera una importante defensa frente a los microorganismos. Es sabido que la lisozima de la leche humana juega un papel importante en el sistema inmune de los recién nacidos. Rosenthal y Lieberman (1931) fueron los primeros en describir la importancia de la lisozima en la flora intestinal de los recién nacidos

y lactantes. Estos autores observaron que el tracto intestinal del recién nacido libre de bacterias en el momento del nacimiento, era invadido, en un corto periodo de tiempo, por los microorganismos del medio ambiente. Esta flora inicial desaparece al tercero o cuarto día en los lactantes alimentados en forma natural y es reemplazada por una flora en la cual predomina el *Lactobacillus bifidus*. En los niños alimentados en forma artificial no sucede lo mismo, desarrollándose una flora microbiana intestinal muy variada y sin predominio de ninguna especie determinada. Estos investigadores además encontraron lisozima sólo en las deposiciones de los niños alimentados naturalmente, concluyendo que esta enzima se encuentra en mayor cantidad en la leche humana que en la leche de vaca (fórmulas infantiles) y que atraviesa el tracto intestinal, sin ser destruida por el jugo gástrico ni por las secreciones intestinales.

En los recién nacidos el pH gástrico es mayor que el de los adultos y se encuentra en valores de pH 4,0. Al ser menos ácido el pH, la acción de la pepsina se ve reducida, lo que puede favorecer el paso a la circulación de proteínas intactas. La barrera intestinal constituye un mecanismo de defensa al inducir el fenómeno de tolerancia oral. En este proceso se encuentran implicadas células presentadoras de antígenos y células T reguladoras. La barrera de la mucosa gastrointestinal, que incluye mecanismos físicos e inmunológicos, procesa y modifica las proteínas de la dieta, de forma que sólo

un 2% se convierte al final en antígenos potenciales (Figura 5).

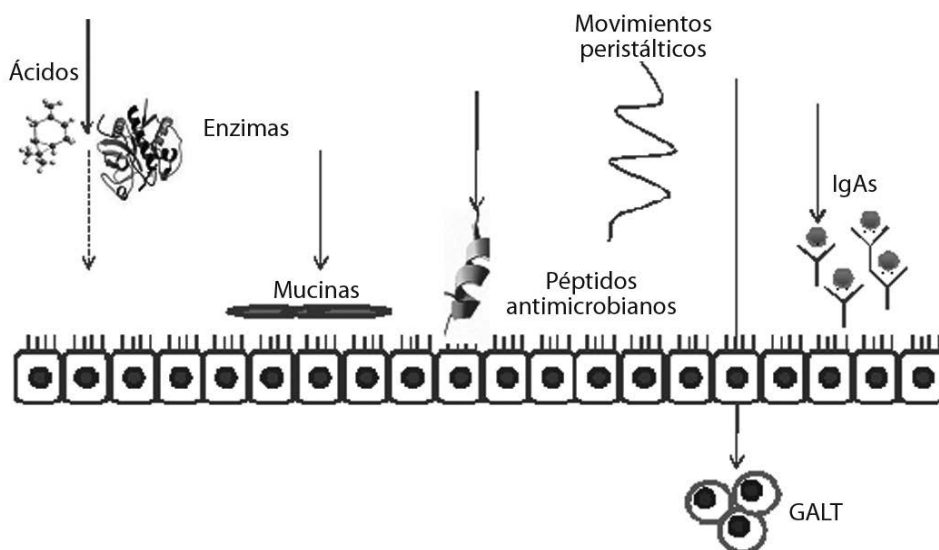
Capacidad antigénica de la lisozima

Los huevos de gallina se incluyen como uno de los "grandes ocho" alimentos más alergénicos, siendo el ovomucoide (OM) y la ovoalbúmina (OVA) los ejemplos más típicos de proteínas de huevo con potencial alergénico. Sin embargo, aunque no se haya estudiado en profundidad, la lisozima (Gal d4, 14 KDa, 3,5%) es también uno de los principales alérgenos de clara de huevo y se han descrito reacciones clínicas a la lisozima y con frecuencia se han encontrado anticuerpos IgE anti-lisozima en los pacientes alérgicos de huevo como marcadores de sensibilización.

En la industria alimentaria se utilizan muchas proteínas como aditivos o conservantes ya sea por sus propiedades funcionales como capacidad espumante o por sus propiedades biológicas como la capacidad antibacteriana. Muchos derivados del huevo son utilizados para estos fines, entre estos derivados se encuentra la lisozima de clara de huevo de gallina, la cual está catalogada y aceptada como aditivo de uso alimentario en muchos países por su comprobada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas. Por ejemplo en la Unión Europea, está permitido su uso en la fabricación de quesos (Directiva Europea N° 95/2/EC), en la que se establece que se puede utilizar entre 50 y 350 mg de lisozima por kg de queso. La

FIGURA 5

Barreras fisiológicas para la penetración de antígenos en la mucosa intestinal. Incluye mecanismos inmunológicos como la inmunoglobulina A secretora (IgAs), el tejido linfóide asociado al tubo digestivo (GALT) y los péptidos antimicrobianos, y mecanismos físicos, como la acción del peristaltismo intestinal, el ácido gástrico y las enzimas proteolíticas, las células epiteliales, unidas por las uniones estrechas, que restringen el paso de moléculas grandes, o la capa de moco que cubre fisiológicamente las células epiteliales.



adición de estos conservantes en los alimentos puede conducir a reacciones alérgicas especialmente en personas ya sensibilizadas. Incluso cantidades comprendidas entre 1 y 2 mg de lisozima de huevo pueden producir reacciones en personas muy sensibles. Estos alérgenos ocultos son un problema común en la seguridad alimentaria que se conoce desde hace muchos años y que además puede estar contribuyendo a la prevalencia de las alergias alimentarias (Weber y col., 2007; 2009).

La prevalencia de las alergias al huevo se estima que puede llegar a ser entre 1.6-3.2 % en los países desarrollados y es la segunda causa de alergias alimentarias en niños en Estados Unidos (Mine y col., 2008). Estudios epidemiológicos recientes sugieren que el mayor nivel de higiene en las poblaciones urbanas de los países desarrollados puede jugar un papel importante en el desarrollo de las alergias (Renz y col., 2006). La lisozima de clara de huevo tiene un 60% de homología con la lisozima de leche humana y comparten la resistencia a las enzimas proteolíticas. El proceso de la digestión juega un papel importante en la sensibilización alérgica. Saber qué le sucede a los alérgenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (fragmentación, absorción, biodisponibilidad y conjugación con otras proteínas) es importante para el conocimiento del mecanismo que subyace en las alergias. Un gran número de alérgenos alimentarios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre estas proteínas hay ciertas características comunes, se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesado, sobre todo al tratamiento térmico (Taylor y Lehrer, 1996). Con este objeto, se han desarrollado diferentes modelos de digestión *in vitro* estáticos y dinámicos. Los modelos estáticos (modelos bioquímicos), no simulan las condiciones físicas de una digestión *in vivo*, mientras que los modelos dinámicos se caracterizan porque tratan de simular las condiciones físicas que ocurren *in vivo* (como hidratación, mezclado, etcétera). Estos modelos usan alimentos complejos y tienen en cuenta los efectos de la matriz del alimento en la cinética de la liberación del alérgeno. Un modelo dinámico descrito en la literatura es el modelo intestinal descrito por Moreno y col. (2005). Este modelo analiza cómo afecta la estructura del alimento en la liberación de alérgenos en el tracto gastrointestinal, su estabilidad y su degradación en el lumen intestinal. También es importante tener en cuenta las interacciones de las proteínas con otros componentes. Las asociaciones lípido-proteína podría ejercer un efecto protector frente a la digestión, puesto que absorción de la proteína en la interfase aceite/agua origina cambios en la conformación que hacen que algunos enlaces susceptibles no sean acce-

sibles al ataque enzimático. Por ejemplo Mandalari y col (2009) encontraron que el surfactante biológico fosfatidilcolina (secretado por el estómago y también presentes en las sales biliares) interfiere con la degradación del alérgeno α -lactoglobulina. Además hay que tener en cuenta que un 30% de los lípidos de la yema de huevo son fosfolípidos, de los cuales un 80% es fosfatidilcolina (Thomas y col., 2007).

Actividad antibacteriana

Los microorganismos evolucionan con humanos y animales y, en general, muchas de las relaciones que se generan son mutuamente beneficiosas. En los casos donde hay competición, por ejemplo enfermedades, tanto microorganismos como humanos tienen la oportunidad de desarrollar estrategias de defensa. Las bacterias continuamente desarrollan resistencia a los agentes antimicrobianos, convirtiéndose en un problema alarmante. Esta situación es considerada como uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Se estima que entre el 50%-60% de las infecciones nosocomiales que ocurren cada año en los Estados Unidos son causadas por cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, por lo que constituye una de las mayores preocupaciones en los cuidados médicos. Esta alta infectividad con cepas resistentes incrementa la morbilidad, mortalidad y costes médicos (Pellegrini y col., 2003 b).

Por otro lado la industria alimentaria también se ve afectada, por la contaminación de alimentos. Este hecho genera pérdidas millonarias anualmente. Por ello la industria alimentaria busca agentes antimicrobianos eficaces. En la actualidad, existe mucho interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, debido a que por lo general presentan baja toxicidad, amplio espectro microbiano y su obtención es económica. Por ejemplo, desde hace décadas en la industria alimentaria se utilizan como conservantes la nisina una bacteriocina y la lisozima de huevo (Pellegrini y col., 2003 b).

Durante las últimas décadas, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos se ha basado en el *screening* de productos naturales y químicos sintéticos. Muchos de los antimicrobianos descubiertos han sido utilizados como drogas (antibióticos) o como conservantes en alimentos. Los factores más importantes que se tienen en cuenta para considerar la selección de un agente antimicrobiano incluyen: (1) el espectro antimicrobiano y las propiedades fisicoquímicas del compuesto; (2) la seguridad del compuesto que se pretende usar; y (3) el tipo de microorganismo al que se ataca. Considerando todos estos factores muchas veces se necesita más de un agente antimicrobiano. Para ello se pueden combinar compuestos que por efecto sinérgico potencien su actividad. Por tanto,

cualquier hecho que permita potenciar la especificidad de un agente antimicrobiano seguro que logre actuar sobre un amplio espectro de bacterias, puede considerarse como una importante contribución a la biotecnología moderna, en la lucha contra la resistencia de los microorganismos (Ibrahim y col., 2002).

Los péptidos antimicrobianos representan un antiguo sistema de defensa en un gran rango de organismos como son: mamíferos, aves, anfibios, crustáceos, peces, insectos, plantas y microbios (Bacheré, 2003; Tomma y col., 2003). Algunos péptidos antibacterianos son producidos habitualmente por el organismo mientras que otros son sintetizados como respuesta a un ataque microbiano (Gallo y col., 2002). La rápida disponibilidad de estos péptidos es importante para el sistema inmune innato, ya que su alta efectividad les pone en primera línea de defensa en el organismo. Los péptidos antimicrobianos son capaces de matar a un gran rango de células y microbios incluidas las bacterias, hongos, protozoos, virus, células tumorales y algunos parásitos (Vizioli y Salzet, 2002 a y b).

Muchas de estas moléculas exhiben mecanismos de acción altamente complejos y distintos. Estos péptidos tienen mayor afinidad por los microorganismos que por las células de mamíferos, siendo así sustancias que no son tóxicas para los tejidos. Se ha descrito que los péptidos antimicrobianos logran distinguir entre los tejidos infectados por patógenos acumulándose en esos sitios. Dentro de las características que comparten estas moléculas se encuentran la conservación de la estructura y la carga. Se ha visto que los péptidos antimicrobianos a pH fisiológico son anfipáticos y con carga neta catiónica. Se considera que los péptidos antimicrobianos comparten ciertos parámetros estructurales como son la conformación, carga, hidrofobicidad, momento hidrofóbico, anfipaticidad y ángulo polar. Todas estas características permiten seleccionar posibles péptidos con actividad antibacteriana (Epand y Vogel, 1999; Yeaman y Yount, 2003).

Los péptidos antimicrobianos pueden generarse durante la digestión de las proteínas alimentarias en el tracto gastrointestinal. En la actualidad se conocen más de 750 péptidos con actividad antibacteriana en mamíferos, anfibios, artrópodos y plantas (Reddy y col., 2004). Se ha descrito la actividad antibacteriana de proteínas alimentarias y sus respectivos hidrolizados. Dentro de los alimentos que poseen proteínas con esta actividad se encuentran la leche y el huevo. Recientemente ha crecido mucho el interés de las proteínas alimentarias porque se han encontrado péptidos dentro de sus secuencias primarias que pueden ejercer actividad antibacteriana, convirtiéndose así estas proteínas en un sustrato potencial para aumentar las defensas del organismo o utilizarlas en la industria alimentaria como posibles conservantes.

Ibrahim y colaboradores (1996) han propuesto que la lisozima desnaturalizada por calor expone regiones ocultas en la forma nativa, como son dos grupos de tioles que le permiten aumentar la hidrofobicidad de la molécula y como consecuencia tener una mayor afinidad por las membranas bacterianas desestabilizándolas y provocando la lisis. Además, este aumento de la hidrofobicidad de la lisozima desnaturalizada por calor permite ampliar su espectro bacteriano frente a los microorganismos Gram-negativos, destacando que este mecanismo es independiente de su actividad neuraminidasa natural. Este hecho ha creado controversia durante dos décadas porque diferentes grupos han intentado reproducirlo, algunos sin mucho éxito (Ibrahim y col., 1996 a y b; Masschalk y col., 2002).

Una prueba evidente de este nuevo mecanismo antibacteriano se ha logrado con la construcción de un mutante de lisozima de huevo catalíticamente inactivo mediante la sustitución de un residuo de ácido aspártico del centro activo por una serina. El mutante resulta activo frente a bacterias Gram-negativas, y fue tan bactericida como la lisozima enzimáticamente activa frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, sugiriendo de este modo que la actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas es independiente de la actividad enzimática (Ibrahim y col., 2001a).

La lisozima de huevo cuando es modificada por distintos métodos logra ampliar su espectro antibacteriano frente a ciertas bacterias Gram-negativas, además de potenciar su actividad frente a los Gram-positivos. Entre los métodos utilizados para modificar la lisozima se encuentran tratamientos de tipo físico como la aplicación de altas presiones (Masschalk y col., 2001; 2002), la ultrafiltración (Lesnierowski y col., 2009), la desnaturalización por calor (Ibrahim y col., 1996 a y b), la radiación gamma (Schmidt y col., 2007) y una serie de modificaciones químicas como son la unión de polisacáridos, combinación con ácidos grasos (Ibrahim y col., 1993), la combinación con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Bolder, 1997) y la reducción de puentes disulfuro con DL-ditiotreitol (DTT) (Touch y col., 2004).

Por otro lado, la lisozima recombinante con un péptido hidrofóbico en el extremo C-terminal de la molécula incrementa su actividad frente a *Escherichia coli* (Ibrahim y col., 1992; Kato y col., 1998). También se han desarrollado métodos que buscan potenciar el espectro antibacteriano de la lisozima de huevo mediante la combinación de tratamientos térmicos y químicos (Cegielska-Radziejewska y col., 2009).

La lisozima sin actividad enzimática posee propiedades bactericidas, por lo que se han publicado varios trabajos enfocados en la búsqueda de péptidos antimicrobianos derivados de esta proteína de huevo.

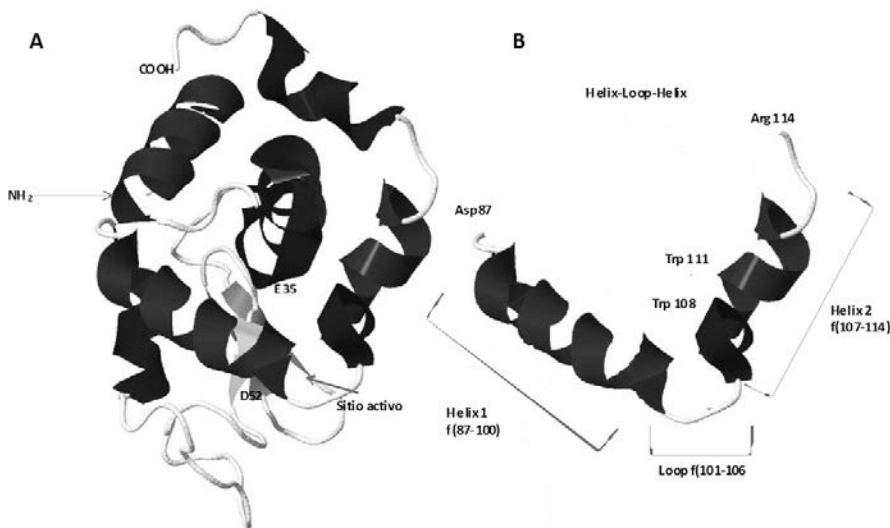
Entre ellos, Pelligrini y col. (1997) han identificado un pentadecapéptido derivado de la lisozima de huevo con actividad antibacteriana, pero sin actividad neuraminidasa, producto de la hidrólisis con clostripaina. El péptido identificado corresponde al fragmento f(98-112) **IVSDGDGMNAWVWR**, el cual presentó actividad frente a bacterias Gram-positivas y negativas. Sin embargo dicha actividad fue bastante menor que la actividad de la lisozima nativa. Con el objetivo de conocer posibles mecanismos de acción independientes de la actividad lítica natural de la lisozima de clara de huevo se han llevado a cabo modificaciones en la secuencia del fragmento f(98-112) mencionado anteriormente. La sustitución de una Asn en la posición 106 por una Arg aumentó la actividad bactericida del péptido considerablemente. Además los autores encontraron que en la lisozima humana y de babuinos la Arg aparece de manera natural en la posición 106. Posteriormente en otro trabajo del mismo grupo (Ibrahim y col., 2001b) se sintetizó el dominio de la doble hélice que corresponde al fragmento f(87-114) en el caso de la lisozima de huevo llamado **Helix-Loop-Helix**, y f(87-115) para la lisozima humana. Este dominio se encuentra en el sitio activo de la proteína (Figura 6).

Además se sintetizaron diferentes regiones del dominio de la doble hélice de la lisozima, como el fragmento f(87-100) llamado **Helix 1**, el fragmento correspon-

diente a f(101-106) llamado **Loop** y el péptido f(107-114) llamado **Helix 2** para la lisozima de clara de huevo. Se determinó la actividad antibacteriana de estos péptidos, frente a seis bacterias Gram-negativas (*Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Salmonella typhimurium*) y seis bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* y *Streptococcus zooepidemicus*). También se determinó la actividad antifúngica frente al hongo (*Candida albicans*).

En este estudio se encontró que el fragmento f(87-114) llamado **Helix-Loop-Helix** era activo frente a los Gram-negativos ensayados a excepción de las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* además tampoco presentó actividad frente al hongo *Candida albicans*. El fragmento f(87-100) **Helix 1**, no presentó ninguna actividad frente a los seis Gram-negativos ensayados, mientras que fue muy activo frente a los seis Gram-positivos, incluyendo además al hongo *Candida albicans*. Por otro lado, el fragmento f(107-114) **Helix 2** demostró una fuerte actividad frente a todas las cepas utilizadas a excepción de *Serratia marcescens*, este fragmento también fue muy activo frente al hongo *Candida albicans*, y cabe destacar que las actividades más fuertes fueron las de este fragmento. Por último el fragmento f(101-106) **Loop**, sólo pre-

Estructura de la lisozima de huevo A) Sitio activo de la enzima B) Helix-loop-helix f(87-114) y C) secuencias de los fragmentos (Imagen tomada y modificada de Ibrahim y col., 2001b).



Helix-Loop-Helix
f(87-114) **D-I-T-A-S-V-N-C-A-K-K-I-V-S-D-G-N-G-M-N-A-W-V-A-W-R-N-R**
Helix 1
f(87-100) **D-I-T-A-S-V-N-C-A-K-K-I-V-S**
Loop
f(101-106) **D-G-N-G-M-N**
Helix 2
f(107-114) **A-W-V-A-W-R-N-R**

sentó actividad frente a *Bacillus subtilis* y a *Candida albicans*.

Posteriormente, Pellegrini y col. (2003 a), sintetizaron otros péptidos derivados de la lisozima de huevo: f(106-112) RAWVAWR, f(106-112-NH2) RAWVAWR-NH2, f((D)106-112) (D) RAWVAWR, con D aminoácidos, f(107-112) RWVWR, f(107-112-NH2) RWVWR-NH2, f(107-114) AWVAWRNR llamado **Helix-2** y f(107-115) RAWVAWRNR **Helix 2** de la lisozima humana. Examinaron la actividad antibacteriana frente a los patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; *Escherichia coli* O157: H7 EDL 933; *Salmonella enteritidis* ILS 386/98 (cepa salvaje); *Salmonella typhimurium* (cepa salvaje); *Escherichia coli* O157: H (cepa salvaje) y se determinó que el péptido f(106-112) era muy activo frente a *Staphylococcus aureus* pero su actividad fue moderada frente a las otras bacterias. La amidación en el C-terminal de este péptido f(106-112-NH2) produce un fuerte aumento de su actividad antibacteriana frente a todas las bacterias ensayadas. El fragmento f(107-112) fue altamente bactericida frente a *Salmonella typhimurium* pero ineficaz frente a *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Escherichia coli* O157: H. Además, fue moderadamente activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. La amidación en el C-terminal de este péptido f(107-112-NH2) produjo un aumento de la actividad frente a todas las cepas utilizadas en el experimento. Fue particularmente muy activo frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. El fragmento f(107-114) llamado **Helix 2** de la lisozima de huevo fue significativamente activo frente a *Salmonella typhimurium*, mostró una actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, frente al resto de las cepas fue inactivo. Finalmente el fragmento f(107-115) llamado **Helix 2** de la lisozima humana fue altamente activo frente a todas las bacterias ensayadas.

Teniendo en cuenta lo anterior se concluyó que los péptidos formados durante la hidrólisis que se

encuentren en este dominio de la molécula pueden tener una elevada actividad antimicrobiana. El péptido correspondiente al fragmento f(98-112) con la secuencia **IVSDGDGMNAWVAWR** descrito por Pellegrini y colaboradores (1997) se encuentra en este dominio, y su actividad antimicrobiana podría deberse a ello. Mine y colaboradores (2004) han descrito dos péptidos producto de la digestión de la lisozima con pepsina y tripsina. El péptido correspondiente al fragmento f(98-108) con la secuencia **IVSDGDGMNAW**, el cual inhibió el crecimiento de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* K-12, y que se encuentra en el centro del **Helix-Loop-Helix** de la molécula de la lisozima, y el otro péptido fue el fragmento f(15-25) con la secuencia HGLDNYR con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* 23-394.

Conclusiones

La lisozima de clara de huevo es una de las proteínas alimentarias utilizada en la industria para diferentes fines por su demostrada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y su actividad antiviral. Es utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, en veterinaria, en medicina y en la industria cosmética. Muchas modificaciones de la proteína permiten ampliar su espectro antibacteriano logrando así afectar a bacterias Gram-negativas. Se ha demostrado que el tratamiento térmico de la proteína a pH 6 potencia su actividad antibacteriana. Los mismos resultados se han conseguido con modificaciones químicas reduciendo sus puentes disulfuro, con modificaciones genéticas e hidrólisis enzimática. Esta nueva actividad es independiente de la actividad muramidasa. Por todo lo anterior, la lisozima se ha convertido en una molécula con muchas posibilidades de uso en la industria alimentaria. La unión Europea ha reglamentado su uso en la elaboración de vinos y en la fabricación de quesos. Sin olvidar de ninguna manera su capacidad alergénica en personas sensibilizadas y los posibles riesgos que conlleva para estas personas consumir alimentos que contengan lisozima.

Agradecimientos

Wilman Carrillo agradece a la Comunidad de Madrid y al Fondo Social Europeo por la concesión del Contrato Pre-doctoral de Personal de Apoyo de Investigación. También agradece al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-UAM-CSIC), al Consejo de Investigaciones Científicas y la Universidad Autónoma de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachère, E: Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larvi-culture. *Aquaculture*, 2003, 227: 427-438.
- Bolder, N.M: Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends Food Sci. Technol.* 1997, 8: 221-228.
- Cegielsa-Radziejewska, R., Lesnierowski, G and Kijowski, J: Antibacterial activity of hen egg White lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.* 2009. 228: 841-845.
- Chantal, A., Monchois, V., Byrne, D., chenivesse, S., Lembo, F., Lazaroni, J. C and Claverie, J. M: Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *PNAS.* 2007, 104: 6394-6399.
- Chiu, H.C., Lin, C. W and Suen S.Y: Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *J. Membrane Sci.* 2007, 290: 259-266.
- Cho, J. H., Fraser, I. P., Fukase, K., Kusumoto, S., Fujimoto, Y., Stahl, G. L and Ezekowitz, A. B: Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood.* 2005, 106: 2551-2558.
- Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A and Ambrò, S: Resistence Screening Essay of wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52: 1861-1866.
- Epand, R.M and Vogel, H.J: Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462: 11-28.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T and Zaiou, M: Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2002, 110: 823-831.
- Ganz, T., Gabayan, V., Liao, H., Liu, L., Oren, A., Graf, T., Cole, A. M: Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan. *Blood.* 2003, 101: 2338-2392.
- Ibrahim, H.R and Kiyono, T: Noverl anticancer activity of Autocleaved Ovotransferrin against Human Colon and Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57: 11383-11390.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T. and Aoki, T: Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.* 2001 a, 506: 27-32.
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L.R., Kim, M., and Yamamoto, T: A structural phase of heat-denatured lysozymewith novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.* 1996 a, 44: 1416-1423.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, F., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y and Aoki, T: Partially nfolded lysozymeatneutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 1996 b, 44: 3799-3806.
- Ibrahim, H.R., Yamada, M., Kobayashi, K. and Kato, A. Bactericidal action of lysozyme against Gram-negative bacteria due to insertion of a hydrophobic peptapeptide into its C-terminus *Biosci. Biotec. Biochem.* 1992, 56: 1361-1363.
- Jiang, C. M., Wang, M. C., Chang, W. H and Chang, H. M: isolation of Lysozyme Hen Egg Albumen by Alcohol-Insoluble Cross-Linked Pead Pod Solid Ion-Exchange Chromat. *J. Food Sci.* 2001, 66: 1089-1092.
- Jolles, P and Jolles, J: What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 1984, 63: 165-189.
- Kato, A., Nakamura, S., Ibrahim, H.R., Matsumi, T., Tsumiyama, C and Kato, M: Production of genetically modified lysozymes having extreme heat stability and antimicrobial activity against Gram-negative bacteria in yeast and in plant. *Nahrung-Food.* 1998, 42: 128-130.
- Kozlov, L.V., Lakhtin, V.M., Batalova, T.N., Gouzova, V.A., D'yakov, V.L and Ramanov, S.V: Inhibition by an egg lysozyme of three stages of an enzymatic cascade of cativation of a classic path of a human complement. *Vestnik Moskovskogo Universitaria Khimiya.* 2000, 41: 88-90.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Sun, Y., Huang, P.L., Kung, H.F., Blithe, D.L and Chen, H.C: Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chronic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96: 2678-2681.
- Lesnierowski, G., Kijowski, J and Cegielska-Radziejewska, R: Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *International J. Food Sci. Technol* 2009, 44, 305-311.
- Lesnierowski, G., and Kijowski, J: Lysozyme in : Bioactive Compounds (edited by R. Huopalathi, R. López-Fandiño, M, Amton & R, Schade. 2007, Pp 33-42. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lesnierowski, G ,Cegielska-Radziejewska, R & Kijowski, J: Thermally and chemical thermally modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World's Poultry Science Journal*, 2004, 60: 303-309.
- Liu, H., Zheng, F., Cao, Q, Ren, B., Zhu, L., Striker, G and Vlassara, H: Amelioration of oxidant stress by the defen-sin lysozyme. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, 290: E824.

- Losso, J. N., Nakai, S and Charter, E.A: Lysozyme. In: Naidu AS, ed. *Natural Food Antimicrobial Systems*. New York: CRC Press. 2000, 185-210.
- Malinowski, E: Properties and activity of lysozyme in: Lysozyme dimer in therapy and prophylaxis of animal diseases (edited by T. Tatcher), 2001, pp 7-13. Nika Health Products Vaduz, Lischtestein, Poznan-Poland.
- Mandalari, G., Mackie, A.M., Rigby, N.M., Wickman, M.S.J and Mills. E.C.N: Physiological phosphatidylcholine protects bovine β -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2009, 53: S131-S139.
- Masschalck, B, Deckers, D and Michiels, C.W: Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of Gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 2002, 65: 1916-1923.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E. G.R and Michiels, C.W: Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. *Appl. Env. Microbiol.* 2001, 67: 339-344.
- Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M and Mattheus, B. Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 September; 86(17): 6562-6566.
- Mega, T and Hase, S: Conversion of egg-white lysozyme to lectin like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinin. *Biophysic.* 1994, 64: 1488-1490.
- Mine, Y., Ma, F.P and Lauriau, S: Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 58: 1088-1094.
- Mine, Y and Yang, M. Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56: 4874-4900.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickman, M. S. J., Bottrill, A. R and Mills, E. N. C: Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal.* 2005, 272: 341-352.
- Niyonsaba, F and Ogawa, H: Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J. Dermatol. Sci.* 2005, 40: 157-168.
- Pellegrini, A., Schumacher, S., Sthepan, R: In vitro activity of various antimicrobial peptides developed from the bacterial domains of lysozyme and β -lactoglobulin with respect to *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp. And *Sthapylococcus aureus*. *Archiv.für ebensmittelhygiene.* 2003 a, 54: 25-48.
- Pellegrini, A: Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Design.* 2003 b, 9: 1225-1238.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klausner, S., Humziker, P. and von Fellenberg, R: Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.* 1997, 82: 372-378.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D and Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004, 24:536-547.
- Renz, H.,Blümer, N., Virna, S., Sel and Gran, H: The immunological basis of the hygiene hypothesis. En: *Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach.* Chem. Immunol. Allergy. Ed. Cramer, R.;Karger. Basilea, Suiza. 2006, 91: 30-48.
- Rosenthal, L and Lieberman, H: The Role of lysozyme in the Development of the intestinal Flora of the New-born Infant *J. Infect. Dis.* 1931, 48: 226-235.
- Sacoman, J.L., Monteiro, K.M., Possenti, A., Figueira, M.A., Foglio, M.A and Carvalho, J.E: Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2008, 41: 411-415.
- Samaranayake, Y.H., Cheung, B.P.K., Parahitiyawa, N., Senevitatne, C.J., Yau, J.Y.Y., Young, K.W.S and Samaranayake, L.P: Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms of denture acrylic surfaces. *Arch. Oral Biol.* 2009, 54: 115-126.
- Sava, G: Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. *EXS.* 1996, 75: 433-449.
- Schmidt, L., Blank, G., Boros, D and Slominski, B. A: The nutritive value of egg by-products and their potential bactericidal activity: in vitro and in vivo studies. *J. Sci. Food Agric.* 2007, 87: 378-387.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N and Riponi, C: Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of wine wines. *J. Sci. Food Agric.* 2009, 89: 688-696.
- Taylor, S. L., Lehrer, SB: Principles and characteristics of food allergens. *Critical review in Food Science and Nutrition*, 1996, 36: S165-S186.
- Tenovuo, J: Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Dis.* 2002, 82: 23-29.
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharram, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T and Araki, T: Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 2010, 151: 84-91.

Thomas, K., Herouet-Guichenev, C., Ladics, G., Bannon, G., Cockburn, A., Crevel, R., Fitzpatrick, J., Mills, C., Privale, L and Vieths, S: Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45: 1116-1122.

Thomma, B. P., Cammue, B. P and Thevissen, K: Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug targets Infect. Disord.* 2003, 3: 1-8.

Tirelli, A and De Noni, I: Evaluation of lysozyme in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chem.* 2007, 105: 1564-1570.

Touch, V., Hayakawa, S., Fukada, K., Aratani, Y and Sun, Y: Preparation antimicrobial reduced lysozyme compatible in Food Applications. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 53: 5154-5161.

Van der Beng, B., Chung, E. W., Robinson, C. V., Mateo, P. L and Dobson, C. M: The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *The EMBO Journal.* 1999, 18: 4794-4803.

Vizioli, J a., and Salzet, M: Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002a, 23: 494-496.

Vizioli, J and Salzet, M: Antimicrobial peptides versus parasitic infections? *Trends Parasitol.* 2002b, 18: 475-476.

Weber, P., Brockow, k., Ring, J., Steinhart, H and Pascheke, A: Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53: 1469-1477.

Weber, P., Steinhart, H and Pascheke, A: Investigation of the Allergenic Potential of wines Fined with various Proteinogenic Fining Agents by ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55: 3127-3133.

Yeaman, M. R and Yount, N: Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews.* 2003, 55: 27-55.

You, S.J; Udeniwe, C. C; Aluko, R. E and Wu, J: Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International.* 2010, 43: 848-855.