

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA DA CLARA DE OVOS DE *Gallus gallus*, *GUTTERA* SP, *Cairina moschata*, *Anser cygnoides* E *Phrynos geoffraonus*

COMPARATIVE STUDY OF BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF EGG-WHITES FROM *Gallus gallus*, *GUTTERA* SP, *Cairina moschata*, *Anser cygnoides* AND *Phrynos geoffraonus*

Gilson Caetano DUARTE¹; Fábio de OLIVEIRA²; Maria Inês HOMSI-BRANDEBURGO³; Amélia HAMAGUCHI

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade bacteriolítica presente na clara de ovos de galinha (GL), gansa (GN), galinha d'angola (GA), pata (PT) e cágado (CG). As zonas de lise observadas por eletroforese em gel de poliácridamida co-polimerizado com *M. lysodeikticus*, em condições desnaturantes, revelaram que todas as claras de ovos de aves apresentaram esta atividade. As atividades bacteriolíticas específicas apresentadas para as claras GL, GN, GA e PT, monitorando-se a redução da turbidez da suspensão de *M. lysodeikticus* (pH 6,0), foram de 15,60; 2,80; 11,40 e 8,20 U.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. A clara CG apresentou somente traços dessa atividade. Os resultados deste trabalho evidenciaram que a clara GL constitui a amostra com maior atividade bacteriolítica e que esta, pode estar relacionada ao maior percentual de lisozima presente nesta amostra. Em pH 9,0, a clara CG apresenta um componente protéico com atividade bacteriolítica semelhante à demonstrada principalmente pelas claras GL, GA e PT, contudo sua detecção requer um método com maior sensibilidade.

UNITERMOS: Clara de ovos, Atividade bacteriolítica

INTRODUÇÃO

A clara de ovos de aves constitui uma fonte natural de proteínas de comprovado interesse biológico e tecnológico, sem mencionar seu rico poder nutricional. Este fluido orgânico é constituído por um complexo protéico, cuja função principal é nutrir o futuro embrião nos estágios do desenvolvimento, bem como fornecer componentes protéicos capazes de funcionar como agentes na defesa contra patógenos (VACHIER et al., 1995).

Dentre as inúmeras proteínas que compõem a clara de ovos de aves, destaca-se a lisozima ou muramidase. Esta enzima, definida como 1,4-b-N-acetilmuramidase, tem como atividade catalítica a hidrólise da ligação glicosídica b1@4 que une o resíduo glicídico N-acetilmurâmico ao carbono-4 do resíduo N-acetilglicosamina. Por sua vez, estes resíduos constituem o peptidoglicano que é o principal componente da parede celular de bactérias (JOLLÈS e JOLLÈS, 1984; IBRAHIM et al., 1996).

A lisozima é utilizada na preservação de alimentos (VACHIER et al., 1995), na indústria farmacêutica na

potencialização de fármacos (IBRAHIM et al., 1994), em experimentos que envolvam modelagem molecular (EVRARD et al., 1998; WEISS et al., 2000) e em biologia molecular como agente de lise sobre bactérias transformadas por plasmídios recombinantes (SAMBROOK et al., 1989).

A lisozima apresenta uma ampla distribuição entre vertebrados e invertebrados (JOLLÈS e JOLLÈS, 1984), sendo classificada em quatro tipos principais: a lisozima de plantas Bernier et al. (1971 apud JOLLÈS e JOLLÈS, 1984); a de bacteriófagos Inouye et al. (1970 apud JOLLÈS e JOLLÈS, 1984) e as formas principais denominadas tipos c e g. O tipo c foi encontrado primeiramente na clara de ovos de galinha, bem como na clara de ovos das duas ordens de aves, Galiformes e Anseriformes Prager et al. (1974 apud SCHOENTGEN et al., 1982). Já o tipo g foi purificado da clara de ovo de gansa (*Anser anser*) (CANFIELD e MCMURRY, 1967), cuja distribuição encontra-se em nove diferentes ordens de aves.

A constituição protéica da clara de ovos de répteis, principalmente de cágado, tem sido pouco relatada na literatura. Gayen et al. (1977) relataram que o conteúdo

¹ Mestre em Genética e Bioquímica do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

² Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

³ Prof.^a Titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

protéico da clara de ovos de duas tartarugas de água doce (*Trionyx gangeticus* e *Geomyda trijuga trijuga*) e uma tartaruga marinha *Caretta caretta*, corresponde a 1% para *T. gangeticus* e apenas 0,7% para *G. trijuga trijuga* e *C. caretta*, comparados aos aproximados 10,6% que constitui a clara de ovos de galinha. Para *T. gangeticus*, do conteúdo protéico correspondente a 1%, apenas 16% é constituído pela lisozima. A clara de ovos de cágado também constitui um componente nutricional para o desenvolvimento embrionário, sendo assim, as proteínas presentes podem ser semelhantes às encontradas na clara de ovos de aves. Este trabalho compara as atividades bacteriolíticas presentes na clara de ovos de galinha (*Gallus gallus*), galinha d'angola (*Guttera* sp), pata (*Cairina moschata*), gansa (*Anser cygnoides*) e cágado (*Phrynos geoffroanus*) em pH 6,0 e pH 9,0.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos de pata, gansa e galinha d'angola foram cedidos por criadores de aves domésticas da região do Triângulo Mineiro. Os ovos de galinha foram adquiridos no comércio local da cidade de Uberlândia. Os ovos de cágado foram obtidos junto ao setor de répteis da Universidade Federal de Uberlândia. Bactérias *Micrococcus lysodeikticus* liofilizadas, produto da Sigma-Aldrich, USA. Marcador de peso molecular LMW (Low Molecular Weight), produto da Amersham Biosciences, USA. Demais reagentes utilizados de grau analítico.

As claras de 2 ovos de galinha, 3 ovos de gansa, 4 ovos de galinha d'angola, 3 ovos de pata, e 9 ovos de cágado foram homogeneizadas separadamente e diluídas em dois volumes de tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,05 mol/L, pH 9,0 e armazenadas a 4°C. Após 24 horas, cada amostra foi submetida à centrifugação a 27.000 x g durante 15 minutos à 4°C (centrifuga HIMAC, modelo CR 21 HITACHI) e posteriormente liofilizada (liofilizador LABCONCO, modelo LYPH-LOCK 1L).

As amostras liofilizadas, cerca de 25 mg, foram aliquotadas e ressuspendidas em 300 mL de água destilada. A solução foi centrifugada a 10.500 x g durante 5 minutos a 4°C (centrifuga Sigma Laborzentrifugen, modelo 2K-15). A dosagem protéica do sobrenadante foi realizada pelo método do microbiureto conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964), utilizando-se soluções padrões contendo 0,1 a 2,0 mg de soroalbumina bovina como proteína de referência.

A atividade bacteriolítica foi realizada por método eletroforético utilizando-se gel de poliacrilamida (15%) em presença do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi co-polimerizado com 2,0% (m/v) de bactérias *M. lysodeikticus* conforme descrito por Audy et

al. (1989). Amostras contendo 15 mg de proteínas foram diluídas em solução tampão de amostra [tris-HCl 0,187 mol/L, pH 7,0, SDS 2,0% (m/v), azul de bromo fenol 1,0% (m/v) e glicerol 27% (v/v)]. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, sob voltagem constante de 200 V, utilizando-se o sistema de mini-gel (Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, USA).

Após a corrida, uma faixa do gel correspondente ao marcador de peso molecular (Low molecular weight-LMW, Amersham Biosciences, USA), foi cortada e corada separadamente por 15 minutos em coomassie Blue R-250 0,1% (m/v) dissolvido em solução fixadora [metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)] e descorada em solução [etanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)]. O restante do gel foi incubado por 12 horas à 37°C em recipientes fechados contendo 100 mL de tampões de renaturação (acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,0 ou tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,0), contendo triton X-100 1,0% (v/v). Em seguida, o gel foi corado em solução azul de metileno 0,5% (v/v) e KOH 0,01% (v/v) por 8 horas a 4°C. As zonas de lise foram visualizadas pela transparência do gel opaco em fundo branco.

A atividade bacteriolítica específica foi determinada pelo método turbidimétrico, conforme proposto por Weaver et al. (1977 apud VACHIER et al., 1995), com base na redução da densidade óptica a 450 nm, de uma suspensão de *M. lysodeikticus* (125 mg de bactérias/mL) em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,0 ou tampão tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,0 para uma absorbância inicial de 0,65 a 0,70. Cerca de 50 mg de cada amostra, diluídos em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,2, foram adicionados à suspensão de bactérias, para um volume final de reação de 2,0 mL. A redução na densidade óptica foi medida utilizando-se um espectrofotômetro (ULTROSPEC 1000, Amersham Biosciences, Suécia), durante 3 minutos, à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a turbidez inicial da suspensão de *M. lysodeikticus* em 0,1 unidade de absorbância a 450 nm e temperatura ambiente. A atividade específica foi representada por U.mg⁻¹ de proteínas por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a atividade bacteriolítica da clara de ovos de galinha (GL), gansa (GN), galinha d'angola (GA), pata (PT), e cágado (CG). A análise dos resultados da atividade bacteriolítica, após SDS-PAGE, revelou que com exceção da clara CG, todas as claras de ovos de aves apresentaram atividade bacteriolítica em ambos pHs sendo capazes de lisar, em maior ou menor intensidade, as bactérias *M. lysodeikticus*, em pHs 6,0 e 9,0 (figura 1 A e B).

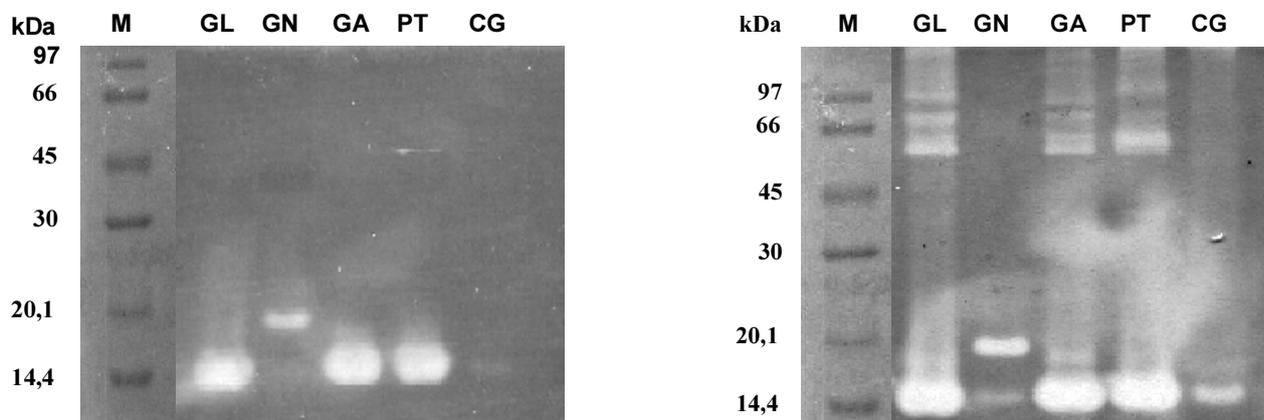


Figura 1. Atividade bacteriolítica por método eletroforético das claras de ovos de galinha (GL), gansa (GN), galinha d'angola (GA), pata (PT) e cágado (CG) em pH 6,0 (A) e pH 9,0 (B). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE (15%) co-polimerizada com *M. lysodeikticus*. A detecção da atividade foi representada pelas zonas transparentes em gel opaco, após a incubação em tampão de renaturação [acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,0 + triton X-100 1,0% (v/v) ou tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,0 + triton x-100 1,0% (v/v)]. M - marcador de peso molecular: fosforilase B – 97 kDa., soroalbumina bovina – 66 kDa., ovoalbumina – 45 kDa., anidrase carbônica – 30 kDa., inibidor de tripsina do feijão de soja – 20,1 kDa. e a-lactoalbumina – 14,4 kDa.

De acordo com a massa molecular observada para a figura 1 A, as zonas de lise correspondentes à atividade bacteriolítica em pH 6,0 foram representadas pela lisozima (L) com cerca de 14,5 kDa. para as amostras GL, GA, PT e CG, todas pertencentes ao tipo-c de lisozima (JOLLÈS e JOLLÈS, 1984).

Este resultado sugere que tal método permitiu a observação de semelhanças na constituição protéica a nível de lisozima para grupos de seres vivos pertencentes a taxons diferentes como aves e répteis, o que poderia refletir uma proximidade de origem desta enzima em particular.

Jollès et al. (1977) demonstraram uma relação filogenética entre a lisozima purificada da clara GL e da clara de ovos de tartaruga, *Trionyx gagenticus*, por meio da análise de sequências homólogas de aminoácidos localizados na extremidade N-terminal dessas enzimas.

Matthews et al. (1981) e Grutter et al. (1983) demonstraram que a lisozima das claras GL e GN e a expressa pelo bacteriófago T4 dividem uma proteína ancestral comum durante a evolução. Qasba e Kumar (1997), por meio de análises de propriedades físico-químicas e sequências de aminoácidos, discutiram a homologia para algumas regiões estruturais entre as lisozimas tipo-c da clara de ovos de aves com a proteína a-lactoalbumina presente na glândula mamária de mamíferos, trazendo indícios para uma proximidade de origem entre as duas enzimas.

Ainda na figura 1 A, foi observado que a amostra GN apresentou uma zona de lise correspondente a 20,1 kDa que é condizente com a massa molecular de um outro tipo de lisozima, designado tipo-g. (JOLLÈS e JOLLÈS, 1984).

Esta enzima é caracterizada por sequência de aminoácidos e propriedades físico-químicas, estruturais e catalíticas distintas daquelas apresentadas pela lisozima tipo-c. (ARNHEIN et al., 1973; QASBA e KUMAR, 1997). Foi observado também, uma outra zona de lise com massa molecular, correspondente a 14,5 kDa, indicando que, a amostra GN apresenta os dois tipos de lisozima. De acordo com estudos imunológicos, segundo Arnheim et al. (1972 apud QASBA e KUMAR, 1997), claras de ovos de algumas aves podem apresentar a lisozima tipos c e g.

A clara CG ensaiada em pH 6,0 (figura 1 A) revelou apenas traços de atividade bacteriolítica, contudo em pH 9,0 (figura 1 B), esta foi consideravelmente mais intensa. Este resultado, apoiado pelas observações apresentadas por Gayen et al. (1977), sugerem que a menor atividade demonstrada pela amostra CG, em relação às claras de ovos de aves, pode estar relacionada ao baixo conteúdo protéico que constitui a amostra.

Em pH 9,0 (figura 1 B) foram observadas zonas de lise adicionais, com massas moleculares superiores a 50 kDa., nas amostras GL, GA, PT e CG. Tais zonas de lise adicionais podem representar a ovotransferrina, uma proteína carreadora de íon ferro, cuja massa molecular aparente está entre 70 a 80 kDa. (DESERT et al., 2001). Estes resultados estão de acordo com Valenti et al. (1982 apud VACHIER et al., 1995) que visualizaram uma atividade de lise sobre *M. lysodeikticus* atribuída à ovotransferrina. As novas zonas de lise encontradas em pH 9,0, também, podem ser representadas por isoformas da ovotransferrina, as quais apresentam pequenas diferenças físicas quanto aos valores

de pH isoelétrico e ao número de átomos de Ferro carregados (até três) conforme relatado por Desert et al. (2001).

Essas zonas de lise poderiam ainda ser consequência da formação de agregados protéicos, nos quais a lisozima estaria presente. Jollès e Jollès (1984) afirmaram que a lisozima, por ser uma proteína básica, pode interagir com uma série de componentes ácidos. A enzima poderia estar intimamente relacionada a outros componentes como fatores do complemento e imunoglobulinas, seja de maneira individual ou como agregados moleculares, potencializando a defesa de secreções naturais: saliva, lágrimas, leite, fluido mucobronquial e clara de ovos.

Watanabe et al. (1999) e Sun e Hayakawa (2002) demonstraram que as proteínas da clara GL, quando submetidas a condições extremas de pH ou temperatura, formam agregados moleculares com diferentes proporções de proteínas, cuja visualização em SDS-PAGE pode ser representada

por massas moleculares aparentes superiores a 60 kDa.

A análise da atividade bacteriolítica pelo método turbidimétrico, em pH 6,0 ou pH 9,0 (figura 2 A e B), revelou que a clara GL apresentou maior atividade específica dentre todas as outras (tabela 01).

Em pH 6,0, a atividade apresentada pelas claras de ovos representaram a catálise enzimática promovida pela lisozima, cuja faixa de pH ótimo para a enzima da clara GL encontra-se próximo a 5,5 conforme demonstrado por Arima et al. (1997).

O método turbidimétrico ensaiado em pH 9,0 revelou uma queda pronunciada nos valores de atividade bacteriolítica. A amostra GN em pH 9,0, em relação a pH 6,0 e a outras aves demonstrou maior queda de atividade, o que poderia ser justificado, pela ausência de atividade bacteriolítica atribuída a proteínas com migração eletroforética menor que a lisozima tipo g (figura 1 B).

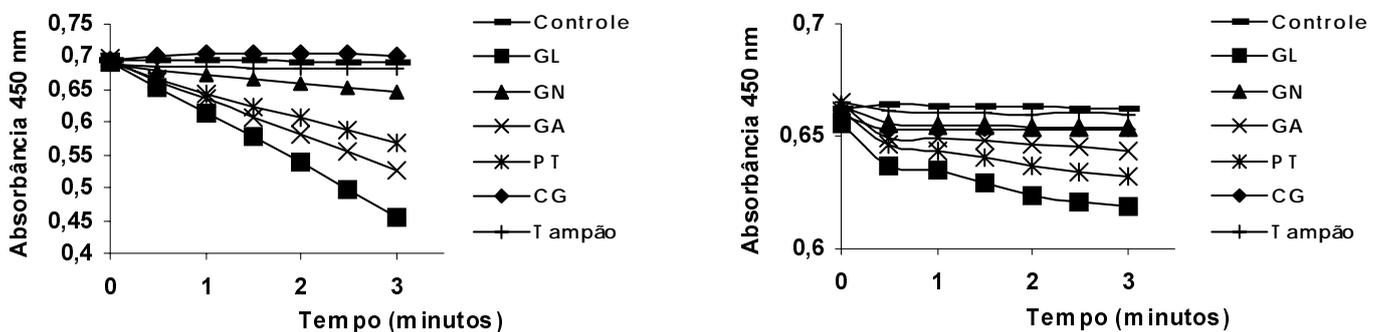


Figura 2: Atividade bacteriolítica das claras de ovos de galinha (GL), gansa (GN), galinha d'angola (GA) pata (PT), e cágado (CG) sobre *M. lysodeikticus*. A suspensão de bactérias foi diluída em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,0 (A) ou tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,0 (B) resultando em soluções de absorbância à 450 nm entre 0,65 a 0,70. O controle representou a observação da suspensão de bactérias na ausência do volume correspondente às amostras ou ao tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,2. Cada ensaio foi realizado com cerca de 50 mg de cada amostra. A atividade foi representada pela redução da turbidez da suspensão de bactérias incubada por 3 minutos.

Tabela 1. Atividade bacteriolítica específica apresentada pela clara de ovos de galinha (GL), gansa (GN), galinha d'angola (GA) e pata (PT) sobre *M. lysodeikticus*, obtida pelo método turbidimétrico, pHs 6,0 e 9,0.

Clara de ovos	Atividade bacteriolítica específica (U.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	
	pH 6,0	pH 9,0
GL	15,6	2,4
GN	2,8	0,6
GA	11,4	1,46
PT	8,2	1,94

O ensaio com o método turbidimétrico revelou-se menos sensível para detectar alguma atividade para a amostra CG. Gayen *et al.* (1977) demonstraram que a lisozima purificada da clara de ovos de *Tryonix gangeticus* revelou atividade bacteriolítica sobre *M. lysodeikticus*. Contudo, o mesmo não foi encontrado para duas outras espécies de tartarugas, uma marinha (*Caretta caretta*) e outra de água doce (*Geomyda trijuga trijuga*). De acordo com os resultados apresentados, principalmente na figura 1 B, foi possível identificar somente um componente protéico com atividade bacteriolítica após SDS-PAGE, provavelmente uma lisozima que constitui a clara de ovos de cágado, mas que é expressa em quantidades muito reduzidas, dificultando sua detecção pelo método turbidimétrico. Audy *et al.* (1989) enfatizaram que o método eletroforético tem como principal vantagem a alta eficiência de detecção, permitindo a visualização da lisozima da clara GL em quantidades inferiores a 0,1 µg, após um período de 16 horas de incubação em solução renaturante.

Assim com base nos resultados apresentados neste trabalho, as claras de ovos de aves e de cágado são constituídas por um componente protéico, que está relacionado à atividade catalisada pela lisozima. A clara GL por sua vez, constituiu a amostra com maior atividade específica sobre *M. lysodeikticus*, e esta alta atividade pode estar relacionada ao maior percentual de lisozima encontrada nesta amostra. A atividade bacteriolítica da clara CG só foi observada pelo método eletroforético em pH 9,0, cuja zona de lise principal corresponde a lisozima tipo c.

AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho vêm agradecer a inestimável contribuição das prof.^{as}, Dr.^a Vera Lúcia de Campos Brites do Instituto de Biologia e Dr.^a Deyse Aparecida Rossi do Instituto de Ciências Biomédicas, ambas da Universidade Federal de Uberlândia.

ABSTRACT: The aim of this work was to compare the bacteriolytic activity present's in the egg-whites from hen (GL), goose (GN), guinea fowl (GA), duck (PT) and freshwater turtle (CG). The hydrolysis zones observed in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis co-polymerized with *M. lysodeikticus*, on reducing conditions, revealed that all avian egg whites tested presented this activity. Egg-white from freshwater turtle presented only small amount of this activity in pH 9,0. Specific bacteriolytic activities (pH 6,0) by using turbidimetric method of egg-whites from GL, GN, GA and PT were 15,60; 2,80; 11,40 and 8,20 U.mg⁻¹.min⁻¹, respectively. Results this work suggest that GL egg white revealed higher bacteriolytic activity and those could be related to high percents of lysozyme on this sample. The bacteriolytic activity CG egg white was possible on electrophoretic method in pH 9,0, whose main lyses zone represents type-c lysozyme.

UNITERMS: Egg-whites, Bacteriolytic activity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNHEIM, N.; INOUE, M.; LAW, L.; LAUDIN, A. Chemical studies on the enzymatic specificity of goose egg white lysozyme. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, n. 1, p. 233-236, jan. 1973.
- AUDY, P.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Lysozyme activity in animal extracts after sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electroforesis. **Comp. Biochem. Physiol. B**, New York, v. 92B, n. 3, p. 523-527, 1989.
- CANFIELD, R. E.; MCMURRY, S. Purification and characterization of a lysozyme from goose egg white. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 26, n. 1, p. 38-42, jan. 1967.
- DESERT, C.; GUÉRIN-DUBLARD, C.; NAU, F.; JAN, G.; VAL, F.; MALLARD, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4553-4561, set. 2001.
- EVARD, C.; FASTREZ, J.; DECLERCQ, J. Crystal structure of the lysozyme of bacteriophage Lambda and its relationship with V and C-type lysozymes. **J. Mol. Biol.**, London, v. 276, n. 1, p. 151-164, fev. 1998.

- GAYEN, S. K.; SOM, S.; SINHA, S. K.; SEN, A. Lysozyme in egg-white of tortoise and turtle—Purification and properties of egg-white lysozyme of *Trionyx gangeticus* Curvier. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 183, n. 2, p. 432-442, out. 1977.
- GRUTTER, M. G.; WEAVER, L. H.; MATTHEWS, B. W. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? **Nature**, London, v. 303, n. 30, p. 828-830, jun. 1983.
- IBRAHIM, H. R.; HIGASHIGUCHI, S.; KOKETSU, M.; JUNEGA, L. R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Partially unfolded Lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 44, n. 12, p. 3799–3806, dez. 1996.
- IBRAHIM, H. R.; HATTA, H.; FUJIKI, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Enhanced antimicrobial action of lysozyme against gram-negative and gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 42, n. 8, p. 1813–1817, ago. 1994.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 9, n. 4, p. 401–410, 1964.
- JOLLÈS, J.; SEN, A.; PRAGER, E. M.; JOLLÈS, P. Structure data concerning reptilian (Tortoise) egg lysozyme. **J. Mol. Evol.**, New York, v. 10, n. 3, p. 261–264, dez. 1977.
- JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's the new in lysozyme research? **Mol. Cell Biochem.**, Norwell, v. 63, n. 2, p. 165-189, set. 1984.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 277, n. 259, p. 680-685, ago. 1970.
- MATTHEWS, B. W.; GRUTTER, M. G.; ANDERSON, W. F.; REMINGTON, S. J. Common precursor of lysozymes of hen egg-white and bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 290, n. 26, p. 334-335, mar. 1981.
- QASBA, P. K.; KUMAR, S. Molecular divergence of lysozymes and alfa-lactalbumin. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, Boca Raton, v. 32, n. 4, p. 255–306, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harber Laboratory, 1989.
- SCHOENTGEN, F.; JOLLÈS, J.; JOLLÈS, P. Complete amino acid sequence of ostrich (*Struthio camelus*) egg-white lysozyme a goose-type lysozyme. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 123, n. 3, p. 489-497, abr. 1982.
- SUN, Y.; HAYAKAWA, S. Heat-induced gels of egg-whites/ovoalbumins from five avian species: thermal aggregation molecular forces involved, and rheological properties. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 50, n. 6, p. 1636-1642, fev. 2002.
- VACHIER, M. C.; PIOT, M.; AWADÉ, A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **J. Chromatography B**, Amsterdam, v. 644, n. 1, p. 201–210, fev. 1995.
- WATANABE, K.; XU, J. Q.; SHIMOYAMADA, M. Inhibiting effects of egg white dry-heated at 120°C on heat aggregation and coagulation of egg white and characteristics of dry-heated egg white. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 47, n. 10, p. 4083-4088, out. 1999.
- WEISS, M. S.; PALM, G. J.; HILGENFELD, R. Crystallization, structure solution and refinement of hen egg-white lysozyme at pH 8,0 in the presence of MPD. **Acta Cryst.**, Copenhagen, v. D56, n. (pt – 8), p. 952-958, ago. 2000.