

난백 내 Ovotransferrin의 분리방법에 관한 연구

장애라*, 조운제**, 이무하**, 김재철***

한국식품연구원*, 서울대학교 동물생명공학전공**, 인제대학교 식품생명과학부***

Development of the Purification Method of Ovotransferrin in Egg White

A Jang*, Y. J. Jo**, M Lee** and J. C. Kim***

Korea Food Research Institute*, Department of Animal Science and biotechnology, Seoul National University**, Department of Food and Life Sciences, Inje University***

ABSTRACT

This study was carried out to separate ovotransferrin in chicken egg white by gel chromatography and heparin affinity chromatography. In gel filtration which was performed with 50 mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15M salt) at a flow rate of 2.0 ml/min, ovotransferrin and ovalbumin were eluted together in fraction number 11-16. In order to separate pure ovotransferrin, fraction No. 12~14 of them which have high concentration of ovotransferrin were concentrated and rechromatographed. However, the ovotransferrin did not separated clearly. In heparin affinity chromatography, the separation was performed with 50 mM ethylaminetetraacetic acid (EDTA, pH7.2) and 50 mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15 M salt contained) on ferrous and ferric ion saturated column at as same flow rate as gel filtration system's. Ovotransferrin and albumin were eluted together at 10~15 min (fraction No.3) and 15~20 min (fraction No.4), respectively. However, purified ovotransferrin was eluted at 156~165 min and 165~175 min (tube No.32~33) with 50 mM phosphate buffer (pH 7.2, 0.15 M salt free), respectively. Heparin affinity chromatography with ferric ion saturated column was resulted in the best separation of ovotransferrin rather than separation by gel chromatography and ferrous ion saturated heparin affinity chromatography.

(Key words : Ovotransferrin, Gel chromatography, Heparin affinity chromatography, SDS-PAGE)

I. 서 론

계란의 구조를 보면 미생물 성장에 좋은 배지가 되는 난황은 내난각막과의 접촉이 차단되어 있고 난백이 주로 접촉하는 형태로 되어 있다. 난백에는 효소억제제, 면역단백질, 비타민 결합단백질, 철분결합단백질, 라이소자임 등의 항균 특성을 갖는 단백질들이 함유되어 있어 세균성장에 불량한 환경을 제공한다(Burley 등,

1989). 다양한 난백 단백질들은 미생물의 성장이나 확산을 방해하는 항균력 또는 생리학적 기능을 가진다. 이러한 다양한 단백질 중에서 ovotransferrin은 난백의 항균 방어 시스템의 주된 성분이다(Garibaldi 등, 1960).

Ovotransferrin은 특정 이온 결합단백질로 조류의 난 난백부에서 발견되는데 다양한 종의 새의 난백의 3~16%를 차지하고 있다. 계란 난백부내의 이 단백질의 물리화학적 특성은 잘

Corresponding author : Mooha Lee, San 56-1, Sillim-Dong, Gwanak-Gu, Animal science and biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Tel : 02-880-4804, Fax : 02-873-4804, E-mail : moohalee@snu.ac.kr

확인되어 왔다 (Itoh 등, 1979).

일부 난단백질은 이미 염 또는 용매에 의해 침전시키거나, 이온강도 감소 또는 액체 크로마토그래피를 통하여 실험실적수준에서 분리되어 왔다. 하지만 염 또는 용매에 의해 침전시키는 방법은 단백질을 변성시킨다는 것과 상대적으로 낮은 순도가 문제가 된다. 하지만 이온강도를 감소시켜 분리하는 방법과 액체 크로마토그래피를 이용하는 방법은 이러한 문제점에서 자유롭기 때문에 유리하다(Vachier 등, 1995). 따라서 이러한 gel filtration과 affinity chromatography 방법은 마이오글로빈, 오브알부민, 헤모글로빈과 같은 많은 단백질 샘플의 분리 및 정제에 이용이 되고 있다(Shibusawa와 Ito, 1991).

사실, ovotransferrin은 transferrin의 family로서 성격이 비슷한데 transferrin의 분리에 관한 연구는 많이 이루어져 있다. Bartfeld와 Law(1990)는 transferrin의 분리를 위해 다섯 단계의 크로마토그래피 분획 분리를 시도하였다고 하였다. 이 과정은 상당히 복잡하고 힘든 과정으로 열처리나 proteinase K 처리 등이 사용되기도 하였다(Nichol와 Locke, 1989). 이렇듯이 Ovotransferrin은 난백 내에 두 번째로 많이 들어있는 단백질임에도 불구하고 이들의 특성을 이용한 국내의 관련 연구는 미약하고 같은 종류인 transferrin의 분리 방법은 복잡하고 까다롭다. 그러므로 이런 난백내 항균능력을 가지는 ovotransferrin을 신속하게 분리하는 방법의 탐색이 요구되므로 본 연구를 실시하였다. 이에 본 연구에서는 오보트랜스페린의 특성을 이용하여 gel filtration으로 size exclusion을 실시하고 affinity chromatography를 통해 철과의 결합력을 이용한 분리 방법을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료 및 처리

본 실험의 공시재료는 시중에서 구입한 신선한 계란에서 분리한 난백에 동량의 3차 증류수를 가한 후 저속으로 교반하여 준비하였다. Sonicator chamber에서 60분간 sonication, 5,000

rpm에서 25분간 원심분리한 뒤 상등액을 급속 동결하고 건조하여 분리에 이용하였다. 또한 Fig. 1의 순서로 gel filtration 및 heparin affinity chromatography를 이용하여 ovotransferrin의 분리를 시도하였다.

(1) Gel chromatography를 이용한 분획 수집

본 실험의 분리칼럼은 아머삼 바이오사이언스에서 구입한 Sephacryl S-200HR resin이 충전된 HiPrep 26/60 칼럼, Pharmacia biotech pump P-1 펌프를 사용하였다. 조정제 난백시료 20 mg/3 ml(증류수)을 칼럼에 loading 후 0.15 M salt가 함유된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 elution buffer로 이용하여 tube 당 5분(10 ml)씩 연속적으로 25개의 시험관에 분획물을 수집하였다. Buffer의 flow rate는 2 ml/min으로 하였다. 분리된 분획은 280 nm에서 분광광도계(UV-1601, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

그 후 투석을 실시하여 염을 제거하였는데 투석막은 스펙트라사의 고강도 cellulose계 Spectra/Por Membrane (MWCO:50,000)을 이용하였다.

(2) SDS-PAGE

투석한 분획을 용기에 모은 후 급속 동결하여 동결 건조하였으며, 적정농도로 희석한 후 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하여 분획물의 조성을 조사하였다. SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 10% acrylamide gel을 제조하여 전기영동을 실시하였다. 표준단백질은 high range protein marker (Amersiam Bioscience, UK)를 사용하였다. 각 밴드는 0.2% coomassie brilliant blue R-250(w/v)을 함유한 acetic acid/methanol/water (1:1:5,v/v/v) 용액을 이용하였다.

2. Heparin affinity chromatography를 이용한 분획의 수집

(1) 50 mM EDTA와 50 mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15M salt 함유)를 이용한 분리방법(칼럼에 Fe²⁺ ion을 고정)

본 실험에서는 아머삼 바이오사이언스에서

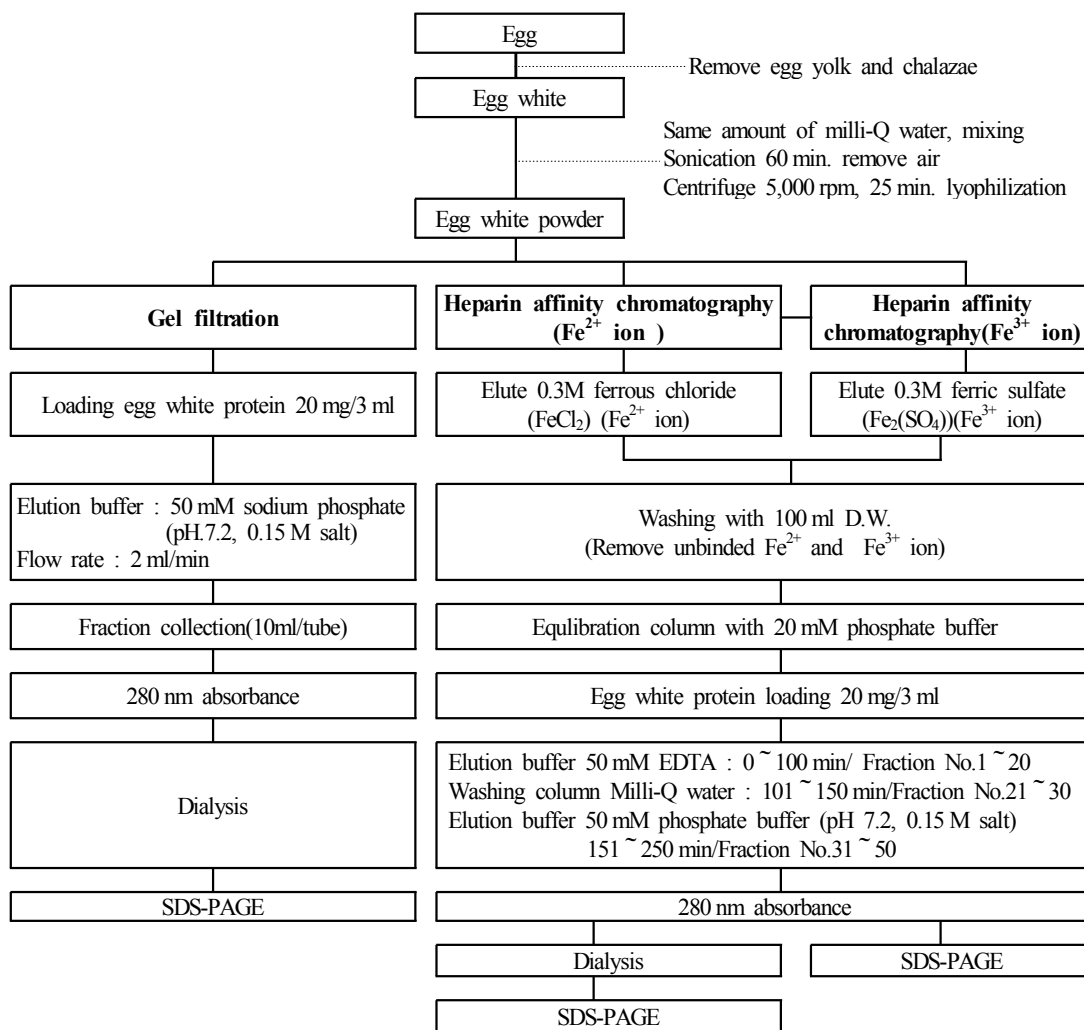


Fig. 1. Flow chart of separation of ovotransferrin from eggs.

구입한 Heparin sepharose 6 fast flow resin이 충전된 HiPrep 16/10 FF 칼럼을 이용하였다. 0.3M ferrous chloride (FeCl₂)과 100 ml의 증류수로 칼럼을 세척한 후 20 mM phosphate buffer로 칼럼을 평형화한다. 조난백시료 210 mg을 3 ml의 3차 증류수에 용해한 후 filtering 하여 칼럼에 loading 하였다. 시료의 용출은 50 mM의 EDTA buffer(pH 7.0)를 이용하여 2 ml/min의 속도로 5 분 간격으로 10 ml씩 0 ~ 100분(tube No.1 ~ 20) 수집하였다. 3차 증류수 100 ml(100 ~ 150분, fraction No.21 ~ 30)로 칼럼 세척과정을 거친뒤 50 mM Phosphate buffer(pH 7.2, 0.15M salt 함유)(150 ~ 250 분, fraction No.31 ~ 50)를 흘려주어 같은 수집방

법으로 실시했다. 분광광도계(UV-1601 SHIMADZU, Japan)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 시료별로 동결 건조하여 전기영동을 실시하였다.

(2) 50 mM EDTA와 50 mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15M salt free)를 이용한 분리방법(칼럼에 Fe³⁺ ion을 고정)

본 실험은 앞의 실험과 동일한 조건과 과정으로 시행하였다. 단, 0.3M ferrous chloride (FeCl₂) 대신 0.3M ferric sulfate (Fe₂(SO₄))를 칼럼에 흘려주어 Fe³⁺ ion을 고정시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. Gel filtration을 통한 ovotransferrin의 분리 및 SDS-PAGE를 통한 확인

(1) 1차 Gel filtration 및 SDS-PAGE 결과

신선난백을 분리하여 급속 동결하여 준비한 난백 단백질을 10%의 polyacrylamide 젤을 이용하여 분리한 결과는 Fig. 2와 같다. 난백을 이루고 있는 주요 단백질의 밴드가 뚜렷하게 보이며 170.0 kDa 크기의 α -macroglobulin이 보였으나 특히 ovotransferrin (76.0 kDa)과 ovalbumin (53.0 kDa 이하)이 거의 주를 이루고 있는 것을 나타내었다.

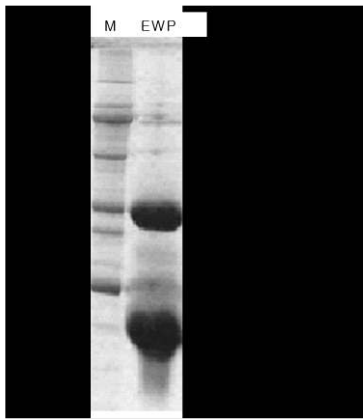


Fig. 2. SDS - PAGE profile of egg white protein (M: Marker as 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α 2-macroglobulin), 116 kDa (β - galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase ; EWP : Egg white protein).

Sephacryl S-200HR 수지가 충전된 HiPrep 26/60 컬럼에 0.15 M 염이 함유된 50 mM sodium phosphate buffer로 용출한 후 50분(fraction No. 10) 이후부터 100분(fraction No. 20) 사이에 하나의 단일 피크를 얻을 수 있었다(Fig. 3; 1st gel chromatogram). 이들 11~16번 분획물을 모두 분취해서 탈염하고 동결 건조하여 구성 단백질을 알아보기 위해 전기영동을 실시하였다. 샘플인젝션 후 60분(fraction No.12)부터 ovotransferrin이 분리되기 시작하였으나 ovalbumin이 혼입되

어 나타나면서 fraction No. 15번까지 시간이 지날수록 오히려 ovalbumin의 농도가 더 높아졌다는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이 후에 ovalbumin이 혼입되지 않은 ovotransferrin을 분리하기 위하여 분획물 12~14번을 다시 농축한 후 한 번 더 gel filtration을 동일조건에서 실시하였다.

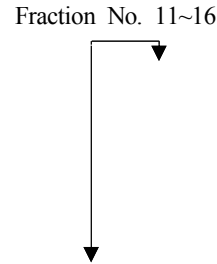


Fig. 3. Gel filtration chromatogram of crude egg white on HiPrep 26/60 column.

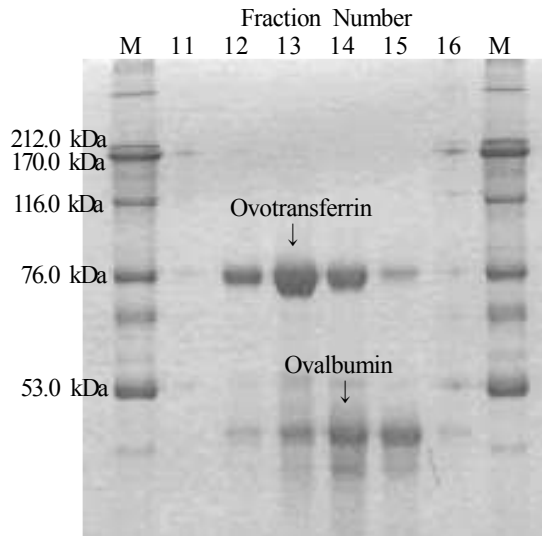


Fig. 4. SDS - PAGE profile of the gel chromatography fractions 11-16
Marker : 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α 2-macroglobulin), 116 kDa (β -galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

(2) 2차 gel filtration을 통한 분획물의 전기영동 분획물 12~14번 분획을 탈염하고 농축하여 다시 3 ml의 증류수에 용해하여 두 번째 gel filtration을 실시하였을 때의 크로마토그램은 Fig. 5(2nd chromatogram)와 같다. 가장 높은 농도를 보이는 분획물 24-26번과 36-38번을 분취한 후 농축하여 10% polyacrylamide gel을 이용하

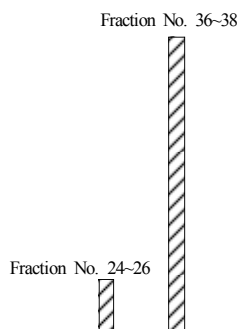


Fig. 5. Rechromatogram of the gel chromatography fractions No. 12~14 under same gel chromatography condition in Fig 3.

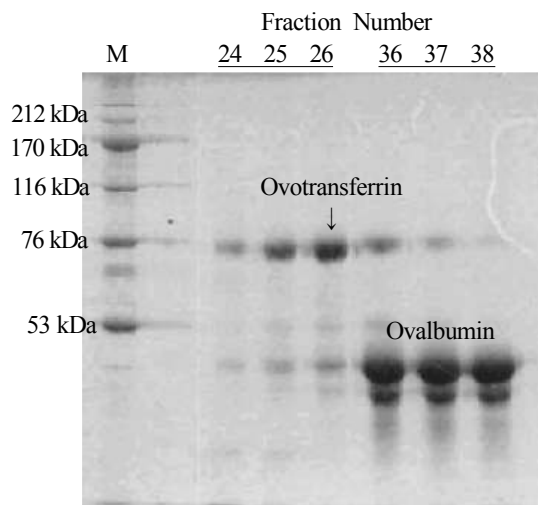


Fig. 6. SDS - PAGE profile of the fraction 24-26 and 36-38 obtained by the 2nd gel chromatography
 Marker : 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α 2-macroglobulin), 116 kDa (β -galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

여 확인한 결과 24~26번 분획물에서는 26번 분획물이 ovotransferrin의 농도가 가장 높았으나 순수 ovotransferrin이 분리되지 않고 ovalbumin도 혼입되어 있음이 전기영동 밴드를 통해 확인되었다(Fig. 6). 반면 36~38번 분획에서는 ovalbumin의 농도가 진해지고 있기는 하지만 역시 ovotransferrin의 약한 혼입을 보이고 있어서 순수한 ovalbumin의 분리가 이루어지지 않음을 확인하였다. 또한 이 결과는 gel filtration의 중복 사용도 순수한 ovalbumin의 분리효과에는 큰 영향을 미치지 않았음을 나타내었다.

2. Heparin affinity chromatography를 통한 ovotransferrin의 분리 및 SDS-PAGE를 통한 확인

(1) Ferrous ion을 이용한 분리 (Fe^{2+} 고정)

Gel filtration을 통한 ovotransferrin의 분리에는 해결되어야 할 문제가 많았으나 ovotransferrin의 철 이온에 대한 친화력(Williams 등, 1982)에 착안하여 heparin affinity chromatography를 실시하였다. 본 실험에서는 두 가지 철 이온 즉 ferrous ion과 ferric ion을 이용하여 ovotransferrin의 분리 방법을 모색하였다. 50 mM EDTA와 50mM Phosphate buffer(pH 7.2, 0.15 M salt)를 흘려주어 HiPrep 16/10 FF column을 이용하여 분리한 결과는 Fig. 7과 같다. 용출개시 후 100분(fraction

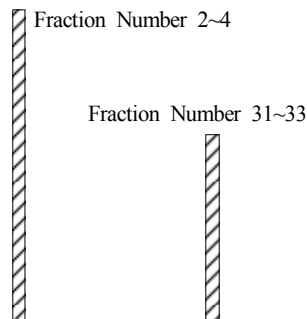


Fig. 7. Heparin affinity chromatography of egg white on a HiPrep 16/10 FF column saturated ferrous ion. Eluted 50 mM EDTA buffer (No.1~20), distilled water (No. 21~30) and 50 mM phosphate buffer (pH 7.2, 0.15 M salt)(No.31~50).

No. 1 ~ 20)까지 50 mM EDTA buffer를 흘려준 결과 용출개시 5분 이후에 하나의 피크를 확인하였다. 그 후 여분의 50 mM EDTA buffer를 제거하기 위하여 50분 동안 (fraction No. 21 ~ 30) 3차 증류수를 흘려주었다. 그 후 100분 동안 50 mM phosphate buffer(pH 7.2, 0.15M salt 포함)를 흘려준 결과 155-165분(fraction No.32-33)사이에서 또 하나의 피크를 확인하였다. 이들 피크에 해당하는 fraction을 분취하여 탈염하고 농축한 후 10% acrylamide gel을 사용하여 포함된 단백질을 확인한 결과 용출개시 후 처음 100분 동안 50 mM EDTA buffer를 흘려주었을 때 5-10분경(fraction No. 2)에 ovalbumin이 분리되었으나 10-15분경(fraction No. 3)에는 ovalbumin과 ovotransferrin의 혼합물이 용출된 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 8). Fraction 4에 해당하는 10-15분경에 약한 밴드를 보이는 ovotransferrin은 컬럼에 고정된 Fe²⁺ 이온과 결합하지 못하고 용출된 것으로 판단된다.

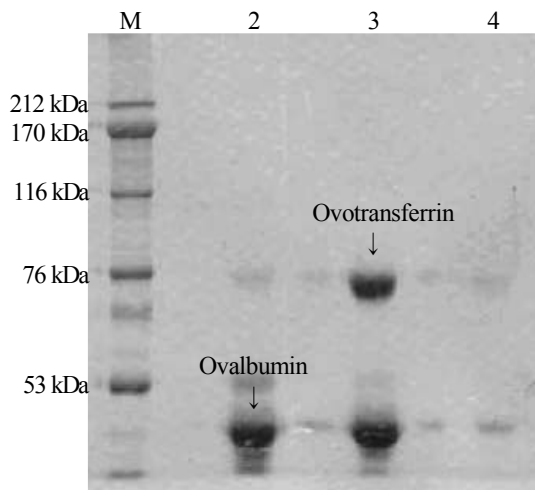


Fig. 8. SDS - PAGE profile of heparin affinity chromatography fractions 2-4 on ferrous ion (Fe²⁺) saturated column
Marker : 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α2-macroglobulin), 116 kDa (β-galactosidase), 76 kDa(Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

Fig. 7에서 제시된 fraction 32-34를 분취하여 탈염한 후 10% acrylamide gel을 사용하여 포함된 단백질을 확인한 결과(Fig. 9) 50 mM phosphate

buffer(pH 7.2, 0.15M salt 포함)을 이용하여 용출시킨 fraction 32-33에 ovalbumin이 혼입되지 않은 ovotransferrin이 분리되었음을 확인할 수 있었다.

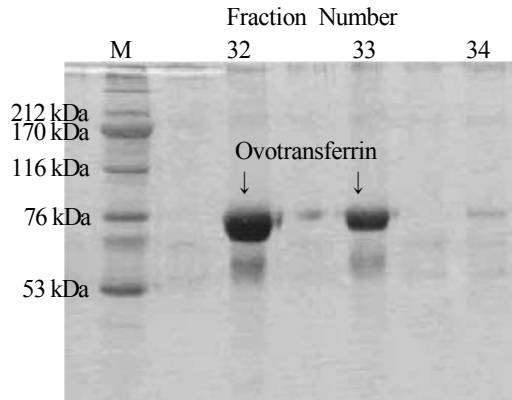


Fig. 9. SDS - PAGE profile of heparin affinity chromatography fractions 32-34 on ferrous ion (Fe²⁺) saturated column
Marker: 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α2-macroglobulin), 116 kDa (β-galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

(2) Ferric ion을 이용한 분리 (Fe³⁺ 고정)

Ovotransferrin이 3가 금속이온과 결합할 때 안정성이 높아진다는 실험보고(Cunningham 등, 1965)에 따라 50 mM EDTA와 50 mM Phosphate buffer(pH 7.2, 0.15 M salt 포함)을 흘려주어 Hiprep 16/10 FF column을 이용하여 분리한 결과는 Fig. 10과 같다. 분리 정도는 Ferrous ion을 이용하여 분리하였을 때(Fig. 7)와 유사함을 보여 첫 번째(fraction 3 ~ 5)와 두 번째(fraction 33 ~ 35) 피크가 거의 비슷한 시간대에 분리되어 용출되었다. 이 둘의 피크를 분취하여 농축한 후 10% acrylamide gel을 사용하여 각각의 포함단백질을 살펴본 결과 fraction 3에는(10 ~ 15분) ovalbumin만 분리되었음을 보였고 fraction 4에는 ovalbumin과 ovotransferrin의 혼합물이 용출되었음을 나타내었다(Fig. 11). 반면에 fraction 5에는 희미한 밴드만 보여 ovotransferrin과 ovalbumin이 거의 없는 것으로 보아 이는 컬럼에 고정된 철 이온과 결합하지 못하고 먼저 용출된 것으로 판단되며 이들 단백질은 그 전 fraction인

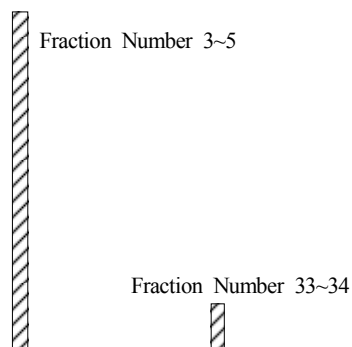


Fig. 10. Chromatogram of the egg protein of heparin affinity chromatography through column saturated ferric ion. Eluted 50 mM EDTA buffer (0~100 min), distilled water(100~150 min) and 50 mM phosphate buffer (pH 7.2, 0.15 M salt contained) (150~250 min).

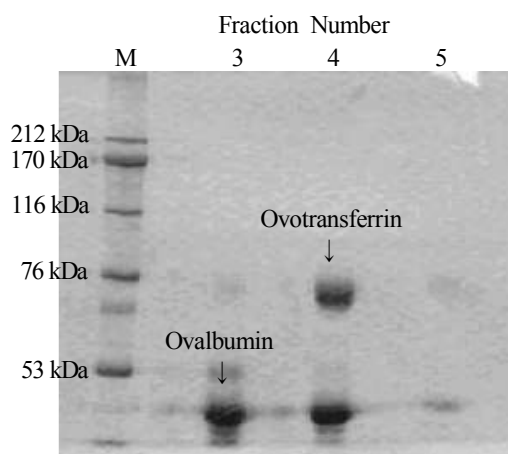


Fig. 11. SDS - PAGE profile of heparin affinity chromatography fractions 3-5 on ferric ion (Fe^{+3}) saturated column
 Marker : 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α 2-macroglobulin), 116 kDa (β -galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

3-4에 모두 포함된 것으로 확인되었다(Fig. 12).

본 결과에 의하면 gel filtration을 이용하여 단독분리나 중복분리는 ovotransferrin의 분리에

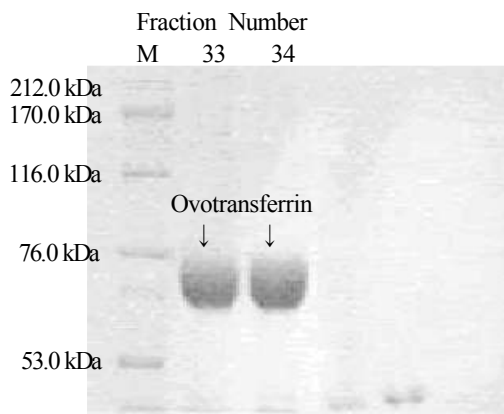


Fig. 12. SDS - PAGE profile of heparin affinity chromatography fractions 3-5 on ferric ion (Fe^{+3}) saturated column.
 Marker : 212 kDa (Myosin), 170 kDa (α 2-macroglobulin), 116 kDa (β -galactosidase), 76 kDa (Transferrin), 53 kDa (Bovine liver dehydrogenase).

효과적인 방법이 아닌 것으로 판단되었고 철이온 결합특성을 이용하여 ferrous ion과 ferric ion을 이용하여 친화력의 정도를 이용한 분리 방법 중 ferrous ion 보다는 ferric ion을 이용한 분리가 더욱 간단하고 편리하여 효과적인 것으로 생각된다. 특히 난백 단백질 중 다수를 차지하는 ovalbumin의 깨끗한 제거를 통해 더욱 순수한 ovotransferrin의 분리가 가능하여 간단하고 쉬우며 경제적인 ovotransferrin의 분리가 가능함을 확인하였다. Paviz(1966)는 ovotransferrin의 분리를 위해 결정화와 mucin-free white solution 제조과정을 첨가하여 실시하였고, Robert(1959)의 ovalbumin의 결정화와 mucin, globulin의 제거와 같은 전 처리 과정을 거쳐 분리하였으나 본 실험방법은 위의 전처리 방법을 거치지 않아서 간단하고 효과적이다. 하지만 Vachier 등 (1995)은 anaion-exchange column과 HPLC를 이용하여 75%의 ovotransferrin 분리수율을 보였다고 보고한 반면에 본 방법에 의해 분리한 수율은 69%에 그쳐 기존의 분리방법에 비해 다소 낮은 수율을 보였으나 본 실험에 이용된 방법은 다소 간단하여 추후 수율증진에 대한 보완을 거친다면 다른 단백질의 분리응용에도 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 요약

난백 단백질 중 ovotransferrin을 gel chromatography와 heparin affinity chromatography를 통하여 분리 하였다. 1차 gel filtration의 경우에 샘플인젝션 후 65~70 min(fraction No. 14) 이후에는 ovalbumin이 ovotransferrin과 혼입되어 분리되고 오히려 ovalbumin의 농도가 더 높은 분포를 보였다. 고순도의 ovotransferrin을 분리하기 위하여 다시 fraction No. 12~14을 농축한 뒤 gel filtration을 실시한 결과 ovotransferrin이 완전히 분리되지 않았는데 이는 gel filtration만의 반복을 통해서 순수한 ovotransferrin을 얻는 것이 비효과적임을 의미하는 것으로 판단된다. Ovotransferrin을 heparin affinity chromatography를 이용하여 분리한 경우 칼럼에 Fe^{2+} 를 고정시킨 후 50 mM EDTA를 흘려 주었는데 ovalbumin이 5~10분경에 용출이 되었고 10~15분경에 ovalbumin과 ovotransferrin이 같이 용출되었다. 그 후에 50mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15M salt)를 흘려주었는데 여전히 ovalbumin의 밴드가 보여 순수하지 않음을 확인하였다. Fe^{3+} 를 칼럼에 고정시킨 후 50mM EDTA를 흘려주었을 때 ovalbumin이 10~15분경에 용출이 되었고 15~20분경에 ovalbumin과 ovotransferrin이 같이 용출되었지만 50mM Phosphate buffer (pH 7.2, 0.15M salt free)를 흘려주었을 때 156~165분경에 ovalbumin이 혼입되지 않은 매우 순수한 ovotransferrin이 용출되는 것을 확인하였다. 위의 결과를 종합해볼 때 gel chromatography를 반복적으로 실시한 경우 보다는 heparin affinity chromatography를 이용하여 분리하고 칼럼에 Fe^{2+} 를 고정시킨 경우보다 Fe^{3+} 를 고정시켰을 때 더욱 순수한 ovotransferrin을 분리해낼 수 있었다.

V. 사 사

본 연구는 농림기술관리센터의 농림기술개발 과제에 수행된 “계란의 유효성분 분리, 정제를 위한 일관공정 개발 및 그 이용에 관한 연구” 결과의 일부이며 이에 감사를 드립니다.

VI. 인용 문헌

1. Bartfeld, N. S. and Law, H. J. 1990. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 265:21684-21691
 2. Burley, R. W. and Vadehra, D. V. 1989. *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
 3. Cunningham, F. E. and Lineqever, H. 1965. Stabilization of egg white proteins to pasteurizing temperatures above 60°C. *Food Technology*. 19: 1442-1446.
 4. Garibaldi, J. A. 1960. Factors in egg white which control growth of bacteria. *Food Res.* 25(3):337-344.
 5. Itoh, T., Sugawara, H. and Adachi, S. 1979. Comparative chemical studies on the quail (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) egg ovotransferrin. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B:41-44.
 6. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15; 227(5259):680-685.
 7. Nichol, H. and Locke, M. 1989. The characterization of ferritin in an insect. *Insect Biochem.* 19: 587-602.
 8. Parviz, A. and Baugh, R. F. 1966. A simple and rapid procedure for preparation of large quantities of pure ovotransferrin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 118:138-144.
 9. Shibusawa, Y. and Ito, Y. 1991. Protein separation with aqueous-aqueous polymer systems by two types of counter-current chromatographs. *J Chromatogr.* Jul 26; 550(1-2):695-704.
 10. Vachier, M. C., Piot, M. and Awade, A. C. 1995. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. *J. Chromatography B*, 664. 201-210.
 11. Williams, J. 1962. A comparison of conalbumin and transferrin in the domestic fowl. *Biochem. J.* 83:355-364.
 12. Woodworth, R. C. and Schade, A. L. 1959. Conalbumin: A rapid, High-Yield Preparation from Egg White, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 82:78-82.
- (접수일자 : 2005. 8. 12. / 채택일자 : 2005. 11. 30.)