

SMB(Simulated Moving Bed)를 이용한 IgY(Immunoglobulin Yolk) 분리의 전산모사

송성문 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2011년 1월 25일 접수, 2011년 2월 20일 채택)

Simulation of IgY(Immunoglobulin Yolk) Purification by SMB(Simulated Moving Bed)

Sung-Moon Song and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 25 January 2011; accepted 20 February 2011)

요 약

난황에 포함된 IgY는 포유동물에 있는 바이러스나 항원에 반응하는 항체와 같은 역할을 한다. IgY 분리를 위해 난황을 전처리한 후 3-zone SMB를 이용하여 지질단백질들로 부터 분리하는 전산모사연구를 수행하였다. 회분식 크로마토그래피와 pulse input method(PIM) 실험을 이용하여 전산모사 매개변수와 흡착 등온식을 얻었다. Aspen simulator를 이용하여 전산모사를 수행하여 IgY를 분리할 수 있는 SMB 운전조건을 다음과 같이 제시할 수 있었다. 삼각형 이론의 m_2 와 m_3 값은 각각 0.18, 1.0이고 스위칭 타임은 419 초이었다. 전산모사 결과 raffinate의 IgY 순도가 98.39%이고 두번째 싸이클에서 순도가 정상상태에 도달하였다.

Abstract – IgY(Immunoglobulin Yolk) is a specific antibody in egg yolk, and it protects human body from virus and antigen. There are a lot of egg yolk components such as lipoprotein and protein. To separate IgY, HPLC(High Performance Liquid Chromatography) and precipitation were used in a batch mode and SMB(Simulated Moving Bed) was adopted for continuous purification of yolk proteins. IgY and other proteins in yolk were separated by using three-zone SMB chromatography. Before performing SMB experiments, batch chromatography and PIM(pulse input method) were performed to find operation parameters and adsorption isotherms. The results of batch chromatography were compared with simulated results using Aspen chromatography. To find the most suitable separation condition in SMB chromatography, simulations in m_2 - m_3 plane on the triangle theory were carried out. $m_2 = 0.18$, $m_3 = 1.0$ and $\Delta t = 419$ s are the best conditions for the highest purity of IgY. With this operating parameters(flow rate in three zone and switching time), the purity of raffinate results in 98.39% from Aspen chromatography simulation. Most of the simulation reached steady-state within second recycle.

Key words: SMB(Simulated Moving Bed), ASPEN Chromatography, IgY(Immunoglobulin Y)

1. 서 론

포유동물을 면역시킨 후 혈청으로부터 분리한 항원특이성 항체(IgG)가 생물학적 연구 및 진단 분야에 사용되어 왔다. 이런 특이성 항체를 얻기 위해서는 많은 양의 항체원료가 필요하나 포유동물로부터의 채혈을 통해 다량의 항체를 얻기는 어려움이 많다. 최근에 혈청으로부터 얻은 IgG를 대체할 특이성 항체로 암탉에 특이 항원을 면역시켜 계란으로부터 얻은 IgY(Immunoglobulin Yolk) 항체가 각광 받고 있다. 어미 닭의 혈청으로부터 특정항체가 난황에 전달되는데

이 면역항체를 IgY라고 부른다. 이것이 갖 부화한 병아리의 면역항체가 된다[1].

계란의 난황에 존재하는 IgY는 IgG 계열의 수용성 면역단백질로서 -livetina라고 불리며 분자량은 heavy chain(64 kDa)과 light chain(28 kDa)으로 다양하게 구성되어 있다. 난황 1개에 136~340 mg의 IgY가 들어 있고, 난황 ml당 8~20 mg의 IgY가 함유되어 있다[2,3]. 기존의 포유동물을 이용한 항체생산에 비해 닭을 항체생산에 이용하게 되면 몇 가지 장점이 있다. 암탉을 대규모로 사육하므로 수천 개의 계란을 생산할 수 있고 수천 kg 항체를 매일 생산가능하고 암탉을 죽일 필요가 없다. 또한 IgG 항체는 종이 다른 IgG와 교차반응을 하는데, IgY는 교차반응을 하지 않는다. 이런 특징들 때문에 IgY는 생화학 적 또는 임상시약으로 개발 활용하는데 좋은 장점을 가지고 있다.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 충남대학교 유승곤 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

IgY와 같은 의약품의 분리정제에 지금까지 많이 사용되어 온 방법은 크로마토그래피이다. 크로마토그래피 기술은 여러 분리 메커니즘을 이용할 수 있어 대상 물질에 따라 효율적인 분리를 할 수 있다. 크로마토그래피 운전의 주된 방식은 회분식 공정이다. 회분식 크로마토그래피는 컬럼에 고정상인 흡착제를 채워놓고 이동상을 흘려 배출되는 공정이다. 그 과정에서 이동상에 있는 여러 성분들이 흡착제와 상호작용을 하며 이동속도의 차이가 있고 이를 이용해 분리하는 공정이다. 하지만 회분식 크로마토그래피는 높은 생산성을 얻기 힘들고 이동상의 소비가 많다는 단점이 있다. 제품의 생산성과 수율을 동시에 높이고 이동상의 소비를 줄일 수 있는 대표적인 공정이 SMB 공정이다. SMB 공정은 1960년대 흐르는 이동상과 고정되어 있는 고정상의 위치를 주기적으로 변화를 주어 고정상과 이동상의 가상의 흐름을 만든 공정이다. SMB는 석유제품[4]을 정제하기 위해 개발한 공정으로 현재는 키랄 화합물 성분[5-7]과 같은 의약품 산업과 lactoperoxidase와 lactoferrin과 같은 단백질[8,9] 분리에 확장되어 사용되고 있다.

SMB를 이용해 난항 단백질인 IgY를 높은 순도로 분리하기 위해 분리 조건을 찾는 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 역상 C18 컬럼을 이용한 HPLC 시스템에서 IgY의 회분식 분리 특성을 실험하고 연속 크로마토그래피인 SMB의 최적 운전 조건을 찾기 위해 Aspen chromatography의 전산모사를 수행했다.

2. 이 론

HPLC에서 실험을 통해 얻은 체류시간 값들을 식 (1)과 (2)에 대입하여 분리 성분의 분리도와 선택도를 계산한다.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (1)$$

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (2)$$

식 (1)에서, α 는 선택도, t_{R2} , t_{R1} 는 성분 1, 2의 체류시간, t_0 는 dead time이다. 식 (2)에서, R_S 는 분리도, W_1 , W_2 는 성분 1, 2의 피크 너비이다.

흡착 분리에서 중요한 단계가 흡착평형식을 결정하는 것인데 흡착 공정을 설계하거나 분석하는데 중요한 역할을 한다. PIM(Pulse Input Method)을 통해 흡착평형식을 결정되는데 농도 증가에 따른 피크의 크기 변화를 관찰함으로써 얻은 체류시간으로부터 식 (3)을 이용해 헨리 평형상수를 추산하여 식 (4)와 같은 흡착등온식을 얻어낼 수 있다.

$$H = \frac{t_R - t_0}{t_0} \cdot \frac{\epsilon}{(1 - \epsilon)} \quad (3)$$

$$C_S = H \cdot C_M \quad (4)$$

이 식에서 H는 Henry's 상수, t_0 는 dead time, t_R 는 체류시간은 공극률, C_S 는 고정상의 농도, C_M 은 이동상의 농도이다.

IgY의 회분식 크로마토그래피를 통해 얻은 체류시간들로부터 SMB 크로마토그래피공정이 설계된다. SMB 크로마토그래피는 이동상과 고정상이 서로 반대방향으로 이동되는 TMB(True Moving Bed)와 달리 흡착제가 이동하지 않으면서 이동하는 것과 같은 효과를 얻을 수 있게 고안된 것이다. SMB 공정에서 각 zone에서의 흐름 속도와 switching time(Δt)을 결정하는 것이 중요하다[6,7]. Fig. 1과

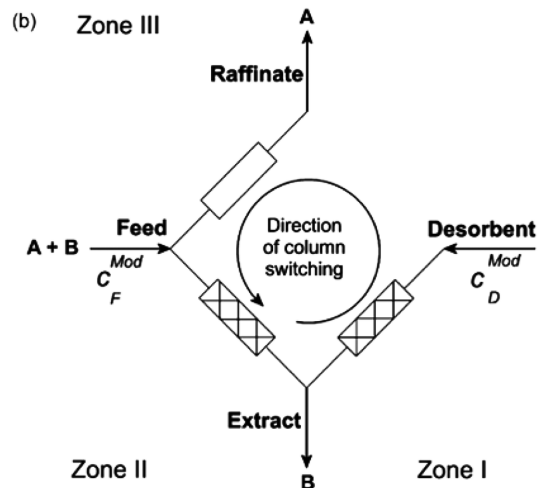


Fig. 1. Schematics of 3-zone SMB.

같은 3-zone SMB 공정에서 zone 1, 2, 3에서의 각 흐름속도와 eluent, extract, feed, raffinate의 흐름속도는 다음과 같은 식을 따른다.

$$Q_{Input} = Q_{Output} \quad (5)$$

$$Q_{Eluent} + Q_{Feed} = Q_{Extract} + Q_{Raffinate} \quad (6)$$

$$Q_1 = Q_{Eluent} \quad (7)$$

$$Q_2 = Q_1 - Q_{Extract} \quad (8)$$

$$Q_3 = Q_2 + Q_{Feed} = Q_{Raffinate} \quad (9)$$

평형이론을 이용한 triangle 이론은 공정설계에 기본이 되는 이론이며 각 zone j에서의 이동상과 고정상의 부피유속의 비 m_j 는 컬럼의 부피(V), 공극률(ϵ), switching time(Δt)에 의해 다음과 같이 정의된다.

$$m_j = \frac{Q_j \Delta t - V \epsilon}{V(1 - \epsilon)} \quad (10)$$

위의 변수들을 이용하고 SMB 실험을 수행하기 위한 Aspen-chromatography 전산모사 프로그램을 이용하며, 실험 전에 raffinate와 extract 흐름의 순도를 확인하고 생산성을 예측할 수 있다.

2. 실험 및 전산모사

2-1. 재료 및 장치

난항은 시판 계란에서 분리하였고 HPLC 실험에 쓰인 용매로 acetonitrile(ACN, 99.9% Duksan, Korea), 증류수 그리고 trifluoroacetic acid(TFA, 99% Sigma, USA)를 혼합하고 초음파기(Brason, USA)로 잔존하는 공기를 제거하기 위해 10분 동안 탈기 과정을 거쳤다.

HPLC 장치로 펌프(Beckman 110B, USA)와 검출기(Model-783A, Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, 데이터 모듈(Younglin, Korea)을 이용해 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환시켰다. 분리 컬럼으로 C18(4.6×250 mm, Agilent, USA) 역상 컬럼을 사용하였고 데이터 수집 시스템으로 Autochro-2000(Younglin, Korea)을 이용해 크로마토그램을 얻었다. 전산모사를 하기 위해서 Aspen Chromatography simulator(ver. 2006, Aspen Tech., USA)를 사용하였다.

Table 1. Data for batch chromatography simulation

Name	Value	Unit	Description
H_b	25	cm	Height of adsorbent layer
D_b	0.46	cm	Internal diameter of adsorbent layer
E_i	0.59	$m^3\text{void}/m^3\text{bed}$	Inter-particle voidage
MTC (IgY)	10	l/min	Mass transfer coefficient
MTC (Other proteins)	100	l/min	Mass transfer coefficient
IP (IgY)	0.18	n/a	Isotherm parameter
IP (Other protein)	1.37	n/a	Isotherm parameter

2-2. 실험과 전산모사 방법

대조군 IgY는 달걀의 난황을 분리하여 증류수로 10배 희석한 후 교반기로 150 rpm에서 5분간 균질화하여 제조했다. 농도 변화를 주기 위해 증류수의 양을 1/2, 1/4, 1/8으로 변화시켰다. 지질단백질을 제거하기 위해 1N의 HCl을 이용하여 pH를 5.0으로 맞추고 총 부피 2배의 증류수에 0.01% κ -carrageenan을 혼합하여 균질화한 용액에 혼합하여 24시간 동안 냉장 보관하여 침전시켰다. 자연 침전 후 상등액만을 분리하여 5,000 rpm으로 원심분리하여 상등액만을 모은 후 필터(Whatman No. 1, USA)를 이용하여 HPLC 시료를 만들었다.

이동상의 조성 변화에 따른 IgY의 최적 분리 조건을 찾기 위해 ACN, 증류수와 TFA의 조성을 20/80/0.1, 15/85/0.1, 10/90/0.1(v/v/v%)로 변화시켜 실험을 수행하였다. 펌프의 유량은 1 ml/min으로, sample loop는 5 μ l를 사용하였으며 검출기의 파장은 280 nm로 정하였다. 희석 증류수의 양을 변화시켜 얻은 시료의 농도는 3.79, 7.85, 16.9, 40.6 g/L이었고 IgY와 다른 단백질성분의 t_0 , t_R 값을 측정하여 식 (3)을 통해 흡착평형상수 H를 구하였다.

Aspen chromatography simulator를 사용하여 Table 1에 주어진 값을 이용하여 회분식 크로마토그래피를 전산모사 하였다. 전산모사는 회분식 크로마토그래피의 실험 결과와 비교하는데 목적이 있다. 회분식 크로마토그래피의 실험 결과를 바탕으로 얻은 IgY와 다른 난황 단백질의 H값을 이용하여 triangle 이론에 의한 m_2 - m_3 diagram을 작성한 후, 각 m값에서 각 zone 유량과 switching time 변수를 계산하였다. Table 2의 조건에서 feed의 유량을 0.2 ml/min으로 고정된 후 m_2 , m_3 의 값이 변화에 따라 결정되는 $Q_{\text{raffinate}}$, Q_{eluent} , Q_{extract} 와 Δt 의 값들로 m_2 - m_3 diagram안의 6개의 포인트에서 Aspen chromatography simulator를 이용하여 전산모사하여 extract와 raffinate의 순도 변화를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 회분식 크로마토그래피

Fig. 2는 이동상의 조성 변화에 따른 분리 특성을 나타낸다. ACN의 부피비가 작아질수록 t_{R2} 가 커지고 두 성분의 체류시간 차가 커

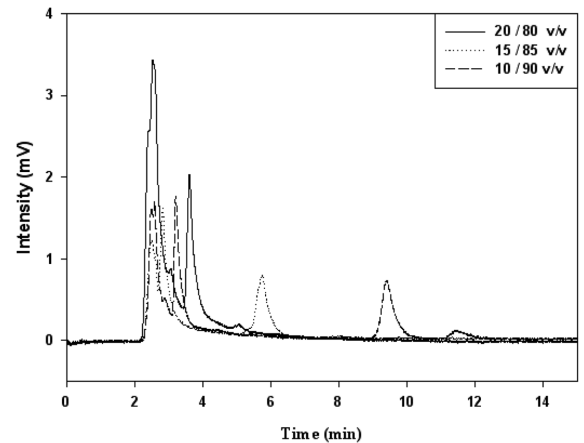


Fig. 2. Batch chromatograms with changing mobile phase composition.

Table 3. Resolution and selectivity by changing mobile phase composition

Mobile phase composition	Selectivity	Resolution
ACN / DW / TFA	(α)	(R_S)
20 / 80 / 0.1	11.0	1.22
15 / 85 / 0.1	10.8	2.94
10 / 90 / 0.1	11.3	8.86

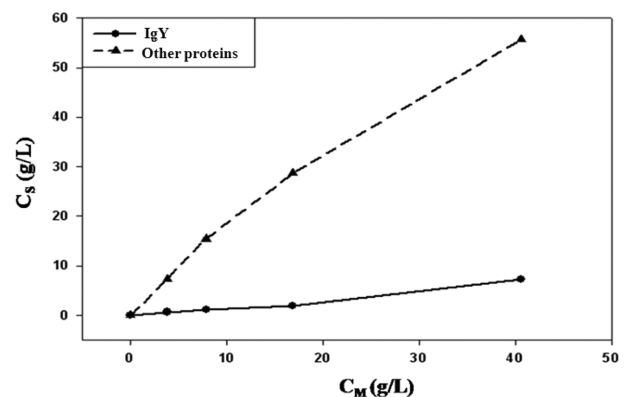


Fig. 3. Adsorption isotherms of IgY and other proteins by PIM.

Table 2. Operating parameters according to the change of m_2 and m_3 values

Point No.	m values		Internal flow rates(ml/min)				Flow rates of zones(ml/min)			Switching time(sec)	Purity(%)	
	m_2	m_3	Q_f	Q_{elu}	Q_{ex}	Q_{ra}	Q_1	Q_2	Q_3	Δt	Extract	Raffinate
1	0.05	1.00	0.2	0.59	0.28	0.51	0.59	0.31	0.51	485 s	49.62	98.36
2	0.50	2.00	0.2	0.37	0.12	0.46	0.37	0.26	0.46	766 s	98.62	93.37
3	0.18	1.37	0.2	0.47	0.20	0.47	0.47	0.27	0.47	608 s	91.95	92.45
4	0.18	1.00	0.2	0.69	0.29	0.59	0.69	0.39	0.59	419 s	76.91	98.39
5	0.50	1.37	0.2	0.65	0.20	0.65	0.65	0.45	0.65	444 s	99.53	90.18
6	0.50	1.00	0.2	1.12	0.35	0.98	1.12	0.78	0.98	255 s	92.82	96.98

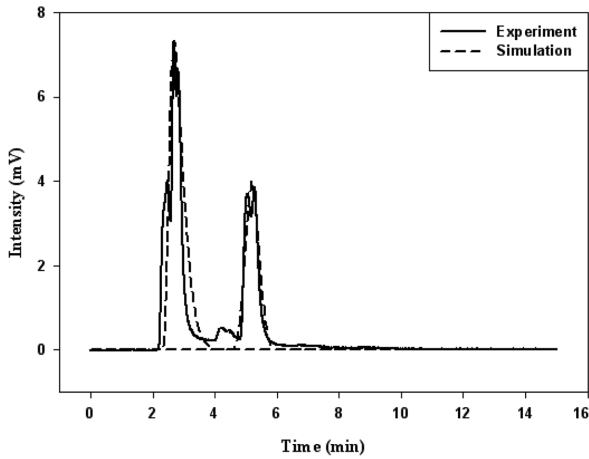


Fig. 4. Comparison of simulated and experimental batch chromatograms.

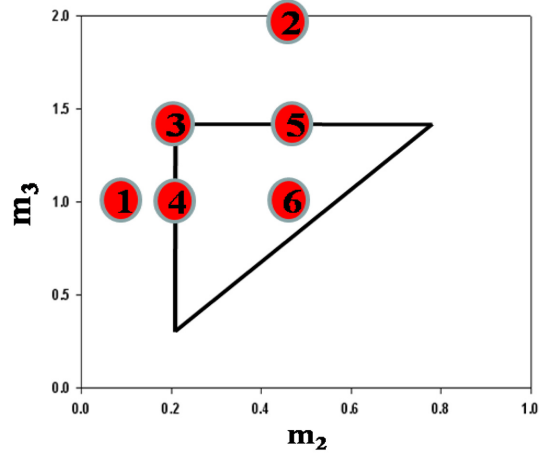


Fig. 5. The m_2 - m_3 diagram based on the triangle theory and six points selected for simulation.

침을 확인할 수 있다. Fig. 2에서 나온 체류시간과 피크를 통해 식 (1)과 식 (2)를 이용해 선택도(a)와 분리도(R_S)를 계산하였다(Table 3). 두 성분은 선택도와 분리도가 클수록 잘 분리 된다. 하지만 분리도가 커질수록 실험 시간이 길어져 이동상의 소비가 많아지고 비효

율적이다. 따라서 선택도, 분리도뿐만 아니라 분석시간까지 고려해 최적의 ACN, 증류수 그리고 TFA의 조성을 15/85/0.1의 부피분율로 선택했다.

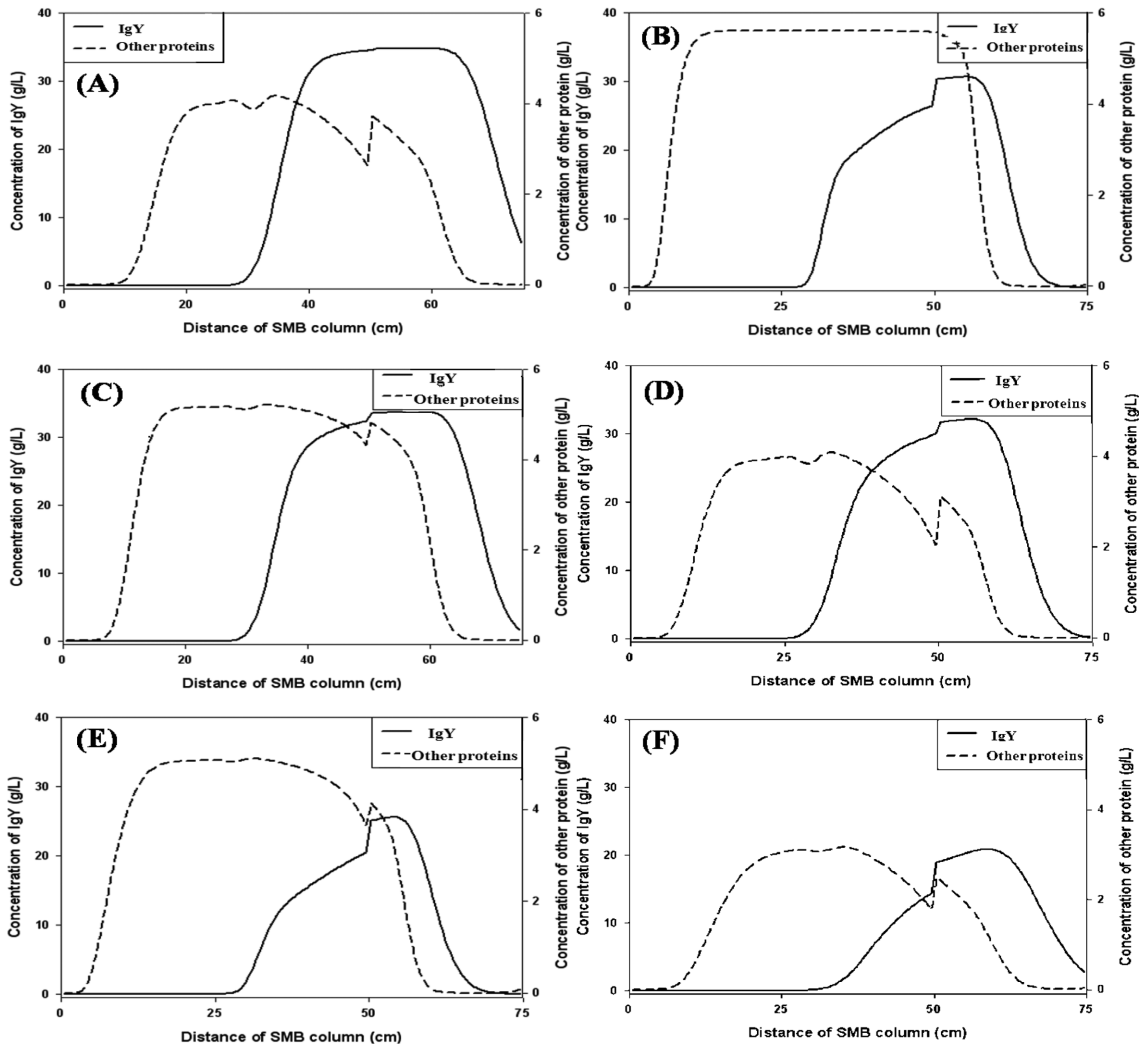


Fig. 6. Internal concentration profiles in SMB columns; (A) = Fig. 5①, (B) = ②, (C) = ③, (D) = ④, (E) = ⑤, (F) = ⑥.

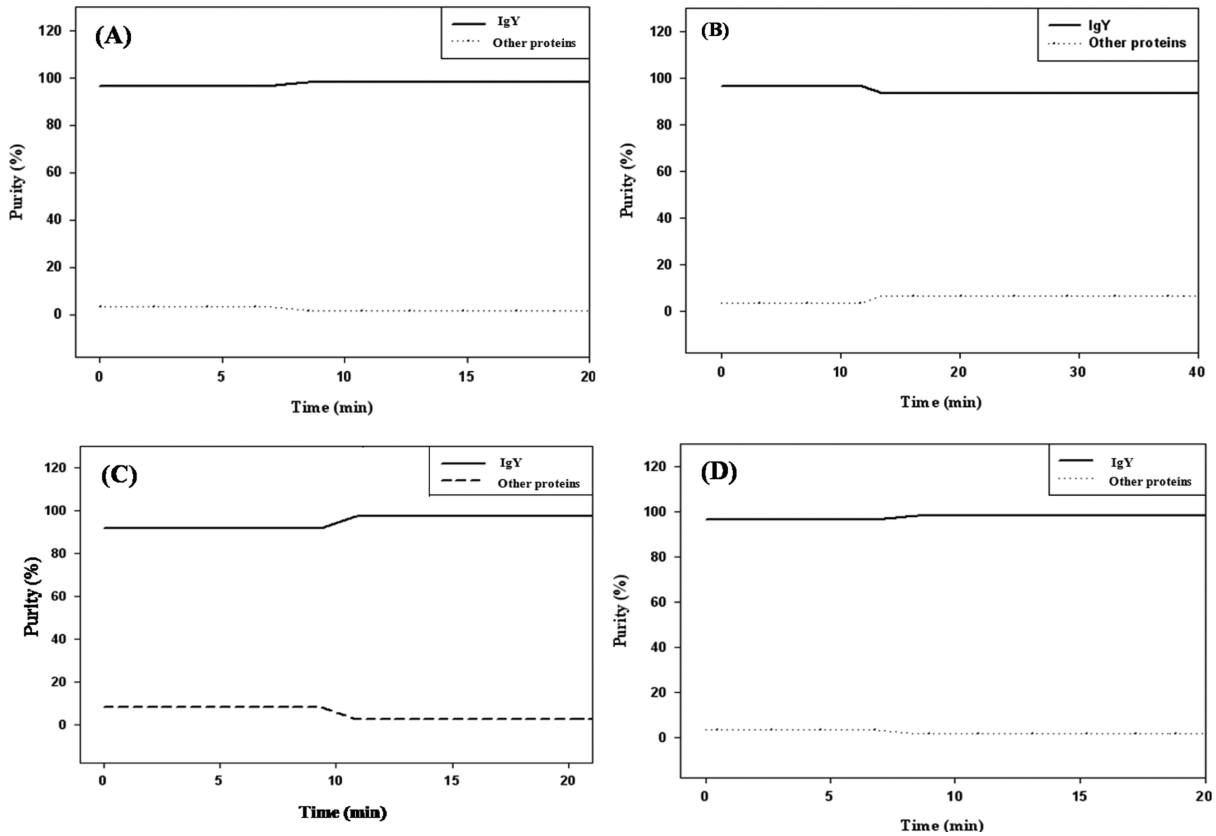


Fig. 7. Purities of raffinate stream with the change of switching time; (A) = Fig. 5 ①, (B) = ②, (C) = ③, (D) = ④.

3-2. PIM(Pulse Input Method)

Fig. 3은 IgY와 다른 단백질의 흡착 등온선이다. 시료의 농도가 3.79, 7.85, 16.9, 40.6 g/L일 때의 고정상에 흡착된 농도를 나타낸다. 흡착 등온선을 보아 두 성분이 선형의 흡착 등온식을 따르는 것으로 가정하였다. Fig. 2에서 $t_0 = 2.44$ 분, $t_{R,IgY} = 2.75$ 분, $t_{R,protein} = 4.76$ 분을 나타내며 식 (3)을 통해 헨리 상수인 0.18, 1.37을 계산하여 다음과 같은 등온 흡착식을 얻었다.

$$C_{S,IgY} = 0.18 \cdot C_{M,IgY}$$

$$C_{S,protein} = 1.37 \cdot C_{M,protein}$$

3-3. 전산모사

Fig. 4는 IgY와 다른 단백질의 분리에 대해 회분식 크로마토그래피를 전산모사한 결과로 전산 모사를 수행한 결과와 실험에서 얻은 크로마토그램을 비교한 것이다. 회분식 크로마토그래피 실험의 각 성분의 체류시간, 피크 높이 및 폭이 Table 1의 값을 입력한 전산모사와 일치함을 나타내었다. 이에 따라 헨리상수, 물질전달계수, 공극율을 SMB 전산모사에 이용하였다.

회분식 크로마토그래피의 실험에서 얻어진 H_{IgY} , $H_{protein}$ 값을 토대로 SMB 크로마토그래피의 최적의 분리 조건을 수립하였다. Triangle 이론을 바탕으로 한 m_2 - m_3 diagram을 Fig. 5에 나타냈다. 이를 기준으로 feed의 유량을 0.2 ml/min로 고정시키고 각 포인트에 따른 $Q_{raffinate}$, Q_{eluent} , $Q_{extract}$, Δt 값 그리고 raffinate와 extract의 순도의 변화를 Table 2에 보였다. 식 (5)~(9)를 통해 Q_1 은 eluent의 유량과의 관계, Q_3 은 raffinate의 유량과 관계함을 알 수 있다. Fig. 5

①에서 raffinate의 유량이 eluent의 유량보다 낮아 Q_3 가 Q_1 보다 낮다. $Q_{Extract}$ 가 증가하거나 $Q_{Raffinate}$ 가 감소하면 raffinate의 유량이 작아지게 되면서 느린 속도로 배출되기 때문에 컬럼 내부에 존재하는 농도가 높아 raffinate 순도가 증가한다. 반대로 Fig. 5②는 raffinate의 유량이 빨라져 Q_3 가 Q_1 보다 빨라진다. 따라서 extract의 유량은 작아지고 raffinate의 유량은 커지게 되어 raffinate의 순도가 낮아지고 extract의 순도는 높아졌다. 삼각형의 꼭지점 지점인 Fig. 5③에서는 Q_1 과 Q_3 가 같아 두 성분 모두 높은 순도로 분리되고 컬럼 내 농도수준도 같다(Fig. 6(C)). Fig. 5⑥에서는 두 성분의 순도가 높고 Fig. 6(F)에서 처럼 컬럼 내 농도가 비슷하지만 Fig. 5③에 비해 eluent 유량이 증가하므로 농도가 반으로 감소하였다. Fig. 7은 raffinate의 순도 변화를 SMB 내부에서의 농도 프로필을 토대로 시간진행에 따라 계산하였다. Raffinate인 IgY의 순도가 2번째 사이클 진행 중 정상상태에 도달했다. Fig. 7(B)에서는 raffinate 유량이 크기 때문에 정상상태에 도달했을 때 순도가 93.37%로 낮았다.

여러 운전조건에서 triangle 이론과 Aspen 전산모사 결과를 바탕으로 두 성분의 분리를 위한 운전조건을 잡았다. 난황으로부터 raffinate인 IgY를 분리하는 것이 목적이기 때문에 extract보다 raffinate의 순도에 관심을 두었다. Table 2에서 $m_2 = 0.18$, $m_3 = 1.0$, $\Delta t = 419$ s일 때 raffinate의 순도가 98.39%이므로 SMB 크로마토그래피의 최적 운전 조건으로 사료된다.

4. 결 론

IgY와 난황 단백질을 SMB 크로마토그래피로 연속 분리하기 위한

연구로 회분식 크로마토그래피에서 두 성분의 분리 특성을 확인하였다. 두 성분의 분리 최적 조건으로 ACN, 증류수와 TFA의 부피조성이 15/85/0.1이었다. PIM으로 두 성분이 선형 흡착 등온식을 따르는 것으로 생각되었고 흡착 등온식은 다음과 같다.

$$C_{S,IgY} = 0.18 \cdot C_{M,IgY}$$

$$C_{S,protein} = 1.37 \cdot C_{M,protein}$$

회분식 크로마토그래피부터 얻은 흡착 등온식들을 이용해 3-zone SMB 전산모사를 하였다. Triangle theory의 m_2 , m_3 의 값에 따라 변하는 SMB 각 zone의 유량을 변화시켜 raffinate와 extract의 순도를 계산하였다.

Raffinate인 IgY의 순도는 2번째 사이클 진행 중 정상상태에 도달하였고 $m_2 = 0.18$, $m_3 = 1.0$, $\Delta t = 419$ s일 때 순도가 98.39%이었다.

감 사

이 연구는 2010 한국연구재단 기초연구과제의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Akita, E. M. and Li Chan, E. C. Y., "Isolation of Bovine Immunoglobulin G Subclasses from Milk, Colostrum and Whey Using Immobilized Egg Yolk Antibodies," *J. Dairy Sci.*, **81**(1), 54-63 (1998).
2. Akita, E. M. and Nakai, S., "Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification," *J. Food Sci.*, **57**(3), 54-63(1992).
3. Al-Haddad, S. et al., "Psoriasis Expression and Invasive Breast Cancer," *American Journal of Pathology*, **155**(6), 2057-2066(1999).
4. Mark, C. B. and Robert, W. C., "The Simulated Countercurrent Moving Bed Chromatographic Reactor: a Catalytic and Separative Reactor," *J. Catal.*, **25**(2) 159-168(1995).
5. Nicoud, R. M., Fuchs, G., Adam, P., Kusters, E., Antia, F. D., Reuille, F. and Schmid, E., "Comparison of Liquid Chromatography and Simulated Moving Bed Adsorption Technology," *Chirality*, **5**(4), 267-271(1993).
6. Francotte, E. R. and Richert, P., "Applications of Simulated Moving Bed Chromatography to the Separation of the Enantiomers of Chiral Drugs," *J. Chromatogr. A*, **169**, 101-107(1997).
7. Pedferri, M., Zenoni, G., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., "Experimental Analysis of Chiral Separation Through Simulated Moving Bed Chromatography," *Chem. Eng. Sci.*, **54**(17), 3735-3748 (1999).
8. Andersson, J. and Mattiasson, B., "Simulated Moving Bed Technology with a Simplified Approach for Protein Purification: Separation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Whey Protein Concentrate," *J. Chromatogr. A*, **1107**, 88-95(2006).
9. Gottschlich, N., Weidgen, S. and Kasche, J., "Purification of Monoclonal Antibodies by Simulated Moving Bed Chromatography," *J. Chromatogr. A*, **765**(2), 201-206(1997).
10. Chung, B. H., Lee, C. H., Lee, Y. T. and Kim, I. H., "Purification of Egg Immunoglobulin IgY," *Korean J. Biotechnol.*, **14**(6), 677-681(1999).
11. Kim, W. K. and Chung, B. H., "Optimization of Chromatographic Separation of Lysozyme from Homogenate of Hen Egg White by Comparison of Breakthrough Behavior," *Biotechnol. Bioeng.*, **14**(3), 279-283(1999).
12. Huntington, J. A. and Stein, P., "Structure and Properties of Ovalbumin," *J. Chromatogr. B.*, **756**, 189-198(2001).
13. Nau, F., Mallard, A., Pages, J. and Brule, G., "Reversed-phase Liquid Chromatography of Egg White Proteins. Optimization of Ovalbumin Elution," *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **22**(8), 1129-1147(1999).
14. Awade, A. C. and Efstathiou, T., "Comparison of Three Liquid Chromatographic Methods for Egg-White Protein Analysis," *J. Chromatogr. B.*, **723**, 69-74(1999).
15. Hiroko, I., Noriyuki, N., Toshio, K. and Mitsugu, N., "Fast Protein Separation by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography on Octadecylsilyl-bonded Nonporous Silica Gel," *Anal. Biochem.*, **199**, 7-10(1991).