멤브레인(Membrane Journal)
Vol. 26 No. 4 August, 2016, 266-272

Print ISSN: 1226-0088
Online ISSN: 2288-7253
DOI: http://dx.doi.org/10.14579/MEMBRANE_JOURNAL.2016.26.4.266

한외여과에 의한 계란 난백으로부터 라이소자임의 분리 (1)
- 난백용액의 전량여과 -

박 혜 리 · 염 경 호†

충북대학교 공과대학 공업화학과
(2016년 7월 9일 접수, 2016년 7월 27일 수정, 2016년 7월 31일 채택)

Separation of *Lysozyme* from Chicken Egg White by Ultrafiltration (1)
- Dead-end Filtration of Egg White Solution -

Park Hye-Ri and Youm Kyung-Ho†

Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea
(Received July 9, 2016, Revised July 27, 2016, Accepted July 31, 2016)

요 약: 전량여과(dead-end filtration)를 사용하여 계란 난백용액으로부터 라이소자임 효소의 분리정제에 대한 연구를 수행하였다. 전량여과 시 사용된 한외여과 막의 분획분자량과 난백용액의 pH 변화에 따른 라이소자임의 난백에 존재하는 다른 종류의 단백질인 오발부민과 콘알부민에 대한 막을 통한 투과선택도(permselectivity)를 측정하여 투과선택도가 가장 큰 값을 나타내는 전량여과의 최적 운전조건을 결정하였다. 이 결과 난백용액으로 라이소자임을 효과적으로 투과 분리시키기 위한 최적 운전조건은 한외여과 막의 분획분자량 30 kDa, 난백용액의 pH 11이었다. 최적 운전조건에서 난백 내 총 단백질에 대한 라이소자임의 투과선택도가 약 83의 가장 큰 값을 나타내었다.

Abstract: The separation and purification of *lysozyme* enzyme from chicken egg white (CEW) solution was studied using the dead-end filtration. The optimum operation conditions of the dead-end filtration reveal that the maximum value of permselectivity of *lysozyme* to the other proteins of ovalbumin and conalbumin in the CEW solution was tested with change of molecular weight cut-off (MWCO) of ultrafitration membrane and pH of the CEW solution. The optimum operation conditions for the efficient permeable separation of *lysozyme* from the CEW solution are that the membrane MWCO is 30 kD and the pH of CEW solution is 11. At this optimum operation conditions, the maximum value of permselectivity of lysozyme to total proteins in CEW solution is about 83.

***Keywords**: ultrafiltration, dead-end flitration, chicken egg white, lysozyme, protein separation*

1. 서 론

최근 의약, 의료 및 식품산업의 발전에 따라 다양한 기능성 바이오 물질의 수요가 증가하면서 이들 물질을 식물 및 동물 등 생물체로부터 추출하거나 생물반응을 통한 제조가 일반화되고 있다. 그러나 기능성 바이오 물질은 대부분이 생물체에 소량 존재하며, 생물반응을 통해 생산하다고 해도 그 양이 매우 적고 다양한 화합물과 혼재되어 있어 이를 의약 및 의료산업에서 요구하는 순도로 정제하기 위해서는 고도의 분리정제 기술이 요구된다[1].

기능성 바이오 물질의 고순도 분리정제 요구에 적용이 가능한 기술의 하나가 막분리법이다. 특히 대표적인 기능성 바이오 물질인 효소, 단백질, 아미노산 등은 열에 의한 변성과 유기용매에 의한 성분 파괴가 일어나기 때문에 이들 물질의 고순도 분리정제에는 종래의 증류,

†Corresponding author(e-mail: khyoum@cbnu.ac.kr, http://orcid.org/0000-0002-1724-543X)

Table 1. Properties of Major Proteins in Chicken Egg White[17]

Proteins	Molecular weight (g/mol)	Isoelectric point (pH units)	Protein content (wt%)
Ovalbumin	45,000	4.5	54~57
Conalbumin	80,000	6.1	12~15
Lysozyme	14,300	11	3.4
Ovomucin	$5.5\sim8.3 \times 10^6$	4.7	3~4

용매추출 및 결정화법 보다 열과 유기용매의 사용이 없는 막분리법을 사용하는 것이 유리하다. 또한 막분리법은 에너지 소모가 적고, 조작과정이 단순하며, 물질의 신속한 분리 및 생산성이 커서 산업규모의 분리정제에 적합한 기술이다[2-4].

압력구동 막분리법 중 효소, 단백질 등의 바이오 물질 분리정제에 가장 적합한 막분리법은 한외여과(ultrafiltration)이다. 한외여과에 의해 배제(reject)되는 바이오 물질들의 삼투압은 이온성 물질들에 비해 상대적으로 낮기 때문에 통상 한외여과는 5 atm 이하의 낮은 구동압력 상태에서 운전된다. 그러나 한외여과는 분리막의 세공과 분리대상 물질과의 크기 차에 따른 체분리 기작(sieving mechanism)이 근본 원리이기 때문에 분자크기가 유사한 바이오 물질들의 선택적 분리에 적용하기 어렵다[5,6].

조류 알의 난백(卵白), 동물의 침, 눈물, 젖 및 조직액 등에서 발견되는 라이소자임(*lysozyme*; E.C. 3.2.1.17)은 박테리아(세균)의 세포벽 주성분인 점액 다당류(무코다당류, *N*-아세틸무라믹산 중합체)의 β-1,4-글리코시딕 결합을 가수분해 시켜 세균을 사멸시키는 기능을 갖고 있는 효소이다. 라이소자임은 항균 작용과 더불어 항염증, 항출혈 작용과 최근 암환자의 진정 작용도 있는 것으로 밝혀지면서 의약·의료 분야에서 소염제 및 항생제로서 궤양, 감염, 상처 등의 치료제로서 중요하게 활용되는 효소이다. 또한 라이소자임은 통조림, 소시지, 치즈, 가공 어육류 등에 첨가하여 식품의 천연 보존제로도 사용되고 있다. 특히 반고형 치즈의 부틸산 생산균의 번식을 억제하여 특유의 악취 발생을 막는데 사용되고, 우유 단백질의 분해를 촉진시키는 기능을 갖고 있어 유아용 분유에 첨가되기도 한다[7-10].

이처럼 의약, 의료 및 식품산업에서 치료제 또는 천연 보존제로서 중요하게 사용되고 있는 라이소자임은 인공적으로는 합성되지 않기 때문에 부득이 라이소자임을 함유한 동물의 체액으로부터 추출하여 사용할 수 밖에 없다. 라이소자임의 안정된 공급원은 계란 흰자(난백, chicken egg white; CEW)이다. 계란 난백에는 라이소자임이 비교적 높은 농도(약 3.4 wt%)로 함유되어 있고, 계란은 시중에서 쉽게 구할 수 있기 때문에 라이소자임의 공급원으로 주로 사용된다[9,10].

계란 난백으로부터 라이소자임을 분리정제하는 방법으로는 전통적으로 결정화 침강법, 원심분리법, 이온크로마토그래피법 등이 사용되어 왔다. 그러나 결정화 침강법과 원심분리법은 라이소자임의 신속한 분리는 가능하나 계란 난백에 존재하는 다른 단백질들이 동시에 석출되어 라이소자임만의 고순도 분리가 어려우며, 이온크로마토그래피법은 라이소자임의 고순도 분리는 가능하나 분리정제의 속도가 낮다는 문제가 있다[11,12].

본 연구의 목적은 한외여과 막분리법을 적용하여 계란 난백 내의 라이소자임을 고순도로 신속하게 분리정제 하는데 있다. 그러나 계란 난백에는 Table 1에 나타낸 것과 같이 라이소자임이 오발부민(ovalbumin), 콘알부민(conalbumin) 및 오보뮤신(ovomucin) 등의 단백질과 혼재되어 있고, 오발부민과 콘알부민의 분자량은 라이소자임의 분자량과 크게 차이가 나지 않기 때문에 체분리 기작을 기본 원리로 하는 한외여과법을 적용하여 계란 난백으로부터 라이소자임만을 선택적으로 분리정제하는 것은 상당히 까다로운 작업으로 알려져 있다[7,17]. Son 등[13]은 전량여과(dead-end filtration) 한외여과를 사용한 계란 난백용액으로부터 라이소자임의 분리정제 연구에 있어 난백용액 내 단백질 중 라이소자임과 알부민(오발부민과 콘알부민 모두를 포함)의 두 가지 종류 단백질만을 비교 대상으로 선택하여 한외여과 막에 대한 투과계수(permeable coefficient)를 측정하였으나, 보다 정확하게는 라이소자임과 오발부민 및 콘알부민의 세 가지 종류 단백질을 대상으로 각각의 단백질에 대한 정량 분석을 통해 투과계수를 측정하여 비교할 필요가 있다.

이에 본 연구에서는 회분식 전량여과 한외여과법을 사용하여 한외여과 막의 분획분자량(molecular weight cut-off; MWCO)과 계란 난백용액의 pH 변화에 따른

라이소자임, 오발부민 및 콘알부민의 투과계수를 측정하여 라이소자임의 투과선택도(permselectivity)가 가장 높은 최적의 분리막 분획분자량과 난백용액의 pH를 결정하여, 계란 난백으로부터 라이소자임을 분리정제하기 위한 최적의 한외여과 운전조건을 찾고자 한다.

2. 실 험

2.1. 실험재료 및 장치

2.1.1. 실험재료

계란 난백 내 단백질 분석용 표준용액 제조를 위해 정제된 순수한 상태의 라이소자임과 오발부민 및 콘알부민은 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 난백은 일반 식품점으로부터 구입한 신선한 계란에서 난황을 분리한 후 사용하였다. 계란으로부터 분리된 난백은 끈끈한 점액질 성분을 삼베 여과포로 걸러낸 후 universal 완충용액으로 희석하여 사용하였다. Universal 완충용액은 boric acid (H_3BO_3, Sigma-Aldrich Co.), citric acid ($C_6H_8O_7$, Sigma-Aldrich Co.), trisodium phosphate 수화물($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, Junsei Co.)을 사용하여 pH 4.5, 6.5, 8.5, 9.5, 11의 다섯 가지로 제조하였다. 분리막으로는 Millipore Co.의 polyether sulfone 소재의 분획분자량(MWCO)이 각각 10, 30, 50, 100 kDa인 네 가지 종류 PBGC® 한외여과 막을 사용하였다. 단백질 분석을 위한 HPLC의 이동상으로는 sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4, Sigma-Aldrich Co.)과 sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 제조된 pH 6.8의 인산염 완충용액을 사용하였다.

2.1.2. 실험장치

계란 난백으로부터 라이소자임의 분리정제 실험에 사용된 전량여과 한외여과 장치의 구성도를 Fig. 1에 나타내었다. 전량여과 장치는 난백용액 저장조, 전량여과 막모듈 및 막투과량 측정부(전자저울과 PC)로 구성되어 있다. 저장조에 난백용액을 넣은 후 압축 질소를 사용하여 일정한 구동 압력을 유지하면 난백용액이 저장조로부터 전량여과 막모듈로 이송되면서 막분리가 이루어진다. 막투과량은 전자저울로 측정하여 PC에 일정 시간 간격으로 기록 저장하였다. 전량여과 막모듈에 설치된 한외여과 막은 직경 47 mm로서 유효 막면적은 13.8 cm^2이다.

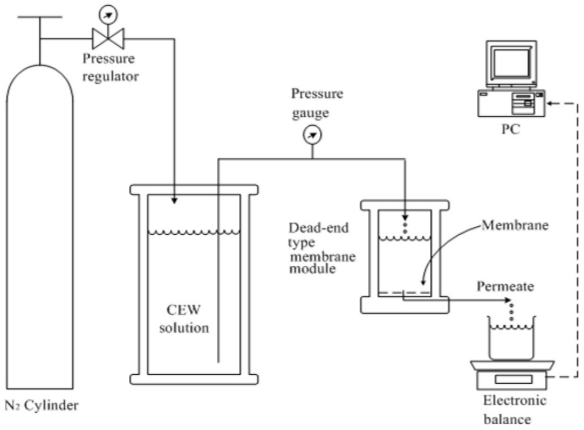


Fig. 1. Set-up of the dead-end ultrafiltration system.

2.2. 실험방법

전량여과 한외여과 실험에 사용된 계란 난백용액으로는 pH가 각각 4.5, 6.5, 8.5, 9.5, 11인 universal 완충용액에 여과포로 거른 난백을 10 wt%의 농도로 희석시킨 다섯 가지 난백용액을 사용하였다. 한외여과 막으로는 MWCO가 각각 10, 30, 50, 100 kDa인 네 가지 종류 막을 사용하였다.

전량여과 시 구동압력을 2 bar로 일정하게 유지시킨 상태에서 난백용액의 한외여과 실험을 100 min 동안 수행하고, 막투과량은 전자저울을 사용하여 2 min의 일정한 시간 간격으로 측정하여 PC에 저장하였다. 투과액의 단백질 분석을 위해 매 실험마다 투과액 2 mL를 채취하여 HPLC로 분석하였다. 난백용액과 투과액 중의 라이소자임, 오발부민 및 콘알부민 단백질의 조성은 HPLC (Agilent Technologies Co., Model 1100 series)로 분석하였다. HPLC 컬럼으로는 단백질 분석용 GPC 컬럼인 TSK-GEL G3000SW (Tosho Co.)을 사용하였고, 이동상은 pH 6.8의 0.1 M 인산염 완충용액을 사용하였다. 이동상 유량 0.5 mL/min, 컬럼 온도 25℃의 조건에서 UV detector (파장 200 nm)로 라이소자임, 오발부민 및 콘알부민의 조성을 측정하였다. 정제된 순수한 상태의 세 가지 종류 단백질이 0.5 wt%의 농도로 제조된 표준용액을 사용하여 개별 단백질의 검량선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 막투과 플럭스와 단백질의 투과선택도

MWCO가 다른 네 가지 종류 한외여과 막을 사용하여 구동압력 2 bar의 조건에서 농도 10 wt%, pH 8.5인

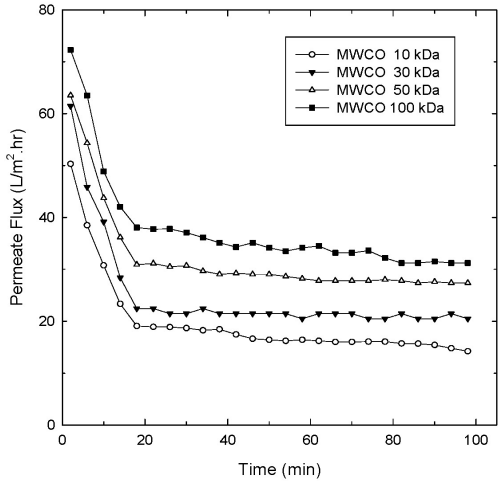


Fig. 2. Trends of permeate flux for the different membrane MWCO (△P = 2 bar, Feed = 10 wt% CEW, pH 8.5).

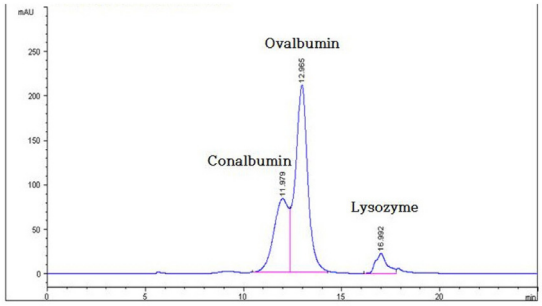
난백용액에 대한 전량여과 한외여과 실험을 100 min 동안 수행하여 측정된 투과 플럭스 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 결과 분리막의 MWCO가 클수록 막투과 플러스가 증가하였으며, 전량여과 초기에 난백용액 내 단백질의 막오염 발생으로 급격한 플럭스 감소가 일어난 후 약 70 min 경과 이후에는 거의 일정한 플럭스 값을 나타내었다. MWCO가 10 kDa인 한외여과 막을 사용한 경우의 플럭스 값은 약 15 L/m^2·hr이었으며, MWCO가 100 kDa인 경우에는 약 32 L/m^2·hr이었다. 따라서 단백질 분석을 위한 투과액 시료는 약 70 min 경과 후 일정한 플럭스 값에 도달한 시점에서 분석용 시료를 샘플링하였다.

HPLC를 사용하여 전량여과의 공급액인 난백용액과 막투과액 중의 라이소자임, 오발부민 및 콘알부민의 조성을 분석한 대표적인 크로마토그래피 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 결과 분자량이 큰 차례인 콘알부민, 오발부민, 라이소자임 순서로 peak 특성이 검출되었다.

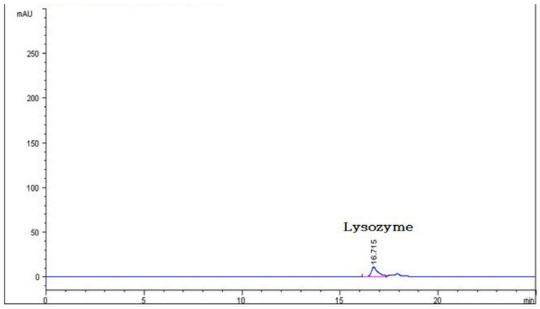
공급액과 투과액의 HPLC를 사용한 단백질 조성분석 결과로부터 단백질에 대한 투과계수(permeable coefficient, P)를 아래의 식으로 계산하였다[13].

$$P_A = \frac{C_{pA}}{C_{bA}} \tag{1}$$

여기서, C_{bA}와 C_{pA}는 각각 공급액과 투과액 중의 특정 단백질 A의 농도이며, 따라서 P_A 값이 클수록 단백질 A의 막투과가 용이함을 나타낸다. 또한 개별 단백질



(a) Feed solution



(b) Permeate solution

Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of (a) feed solution and (b) permeate solution (△P = 2 bar, Membrane MWCO = 30 kDa, Feed = 10 wt% CEW, pH 8.5).

들에 대한 투과계수로부터 투과선택도(permselectivity, ψ)를 아래의 식으로 계산하였다.

$$\psi_{A/B} = \frac{P_A}{P_B} \tag{2}$$

단백질 A와 B의 혼합물에 대해 분리막의 B 단백질에 대한 A 단백질의 투과선택도 $\psi_{A/B}$ 값이 클수록 분리막은 혼합물로부터 단백질 A를 더 잘 투과시키므로 보다 순수한 상태로의 단백질 A의 분리가 가능하다.

3.2. 분리막 분획분자량에 따른 라이소자임의 한외여과

MWCO가 다른 네 가지 종류 한외여과 막을 사용하여 구동압력 2 bar의 조건에서 농도 10 wt%, pH 8.5인 난백용액에 대해 전량여과 한외여과 실험으로 얻어진 투과액 중의 라이소자임, 콘알부민, 오발부민 단백질의 조성 분석 결과로부터 각 단백질의 투과계수와 콘알부민에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/co}[=P_{ly}/P_{co}]$, 오발부민에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/ov}[=P_{ly}/P_{ov}]$ 및 총 단백질에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/(co+ov)}[=P_{ly}/(P_{co}+P_{ov})]$

Table 2. Effects of Membrane MWCO on the Permeable Coefficient and Permselectivity of CEW Proteins (△P = 2 bar, Feed = 10 wt% CEW, pH = 8.5)

MWCO	P_{ly}	P_{co}	P_{ov}	$\psi_{ly/co}$	$\psi_{ly/ov}$	$\psi_{ly/(co+ov)}$
10 kDa	0.1729	0.0017	0.0007	101.71	247.00	72.04
30 kDa	0.1888	0.0017	0.0007	111.06	269.71	78.67
50 kDa	0.1481	0.0017	0.0007	87.12	211.57	61.71
100 kDa	0.2620	0.0195	0.0278	13.44	9.42	5.57

(주) *ly*: *lysozyme*, *co*: conabumin, *ov*; ovalbumin

Table 3. Effects of Feed Solution pH on the Permeable Coefficient and Permselectivity of CEW Proteins (△P = 2 bar, Feed = 10 wt% CEW, MWCO of membrane = 30 kDa)

pH	P_{ly}	P_{co}	P_{ov}	$\psi_{ly/co}$	$\psi_{ly/ov}$	$\psi_{ly/(co+ov)}$
4.5	0.0532	0.0017	0.0018	31.29	29.56	15.20
6.5	0.0967	0.0016	0.0009	60.44	107.44	38.68
8.5	0.1888	0.0017	0.0007	111.06	269.71	78.67
11	0.2003	0.0017	0.0007	117.82	286.14	83.46

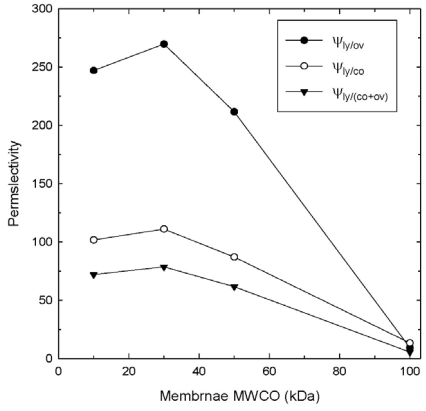


Fig. 4. Effects of Membrane MWCO on the lysozyme permselectivity (△P = 2 bar, Feed = 10 wt% CEW, pH = 8.5).

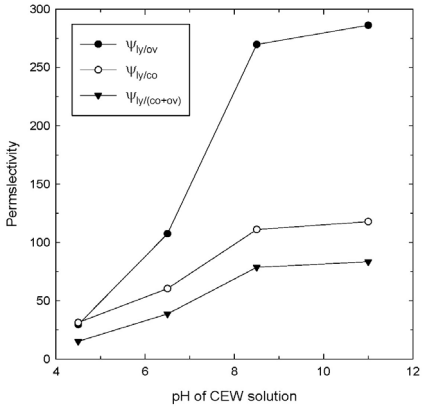


Fig. 5. Effects of feed solution pH on the lysozyme permselectivity (△P = 2 bar, Feed = 10 wt% CEW, MWCO of membrane = 30 kDa).

를 계산하여 그 결과를 Table 2와 Fig. 4에 나타내었다.

이 결과 Table 2와 Fig. 4에 나타낸 것과 같이 난백 내 분자량이 큰 콘알부민과 오발부민은 MWCO가 10, 30, 50 kDa인 한외여과 막을 거의 투과하지 못하고 MWCO 100 kDa의 경우에만 소량이 투과하였다. 한편 라이소자임에 대한 세 가지 투과선택도 모두는 Table 2와 Fig. 4에 나타낸 것과 같이 MWCO가 30 kD일 때 최대 값을 나타내었고, MWCO가 100 kDa일 때는 크게 낮아져 라이소자임의 투과선택성이 매우 작아졌다. 따라서 계란 난백용액으로부터 라이소자임을 효과적으로 분리정제하기 위해서는 MWCO 30 kDa의 한외여과 막을 사용하는 것이 유리함을 알 수 있었다[13].

3.3. 난백용액의 pH에 따른 라이소자임의 한외여과

분리막의 MWCO가 30 kDa인 막을 사용하여 구동압력 2 bar의 조건에서 농도 10 wt%이고 pH가 다른 네 가지 종류 난백용액에 대해 전량여과 한외여과 실험으로 얻어진 투과액 중의 라이소자임, 콘알부민, 오발부민 단백질의 조성 분석 결과로부터 각 단백질의 투과계수와 콘알부민에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/co}$, 오발부민에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/ov}$ 및 총 단백질에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/(co+ov)}$를 계산하여 그 결과를 Table 3과 Fig. 5에 나타내었다.

이 결과 Table 3과 Fig. 5에 나타낸 것과 같이 난백

용액의 pH가 증가하면 라이소자임의 투과계수 값은 점차 증가하나 콘알부민과 오발부민의 투과계수 값은 거의 변화가 없기 때문에 라이소자임에 대한 세 가지 투과선택도 모두는 난백용액의 pH가 증가하면 증가하고 라이소자임의 등전점인 pH 11일 때 최대값을 나타내었다.

난백용액의 pH가 증가할수록 라이소자임의 투과선택도가 증가하는 현상은 단백질의 정전기적 상호작용으로 설명할 수 있다. Table 1에 나타낸 것과 같이 오발부민, 콘알부민 및 라이소자임의 등전점(PI)은 각각 4.5, 6.1 및 11이다. 본 실험에서는 난백용액의 pH를 4.5, 6.5, 8.5, 9, 11로 채택하여 실험하였다. pH가 6.5, 8.5, 9, 11인 용액에서 오발부민은 음으로 하전 되며 pH가 증가할수록 하전량은 증가한다. 반면 pH가 4.5, 6.5, 8.5인 용액에서 라이소자임은 양으로 하전 되며 pH가 감소할수록 하전량은 증가한다. 한편, 실험에 사용된 polyether sulfone 한외여과 막의 표면부는 산성 용액에서는 양으로 하전 되고 중성과 염기성 용액에서는 음으로 하전 된다[6,18]. pH 4.5에서 오발부민은 등전점이므로 하전 되지 않아 분자 간의 뭉침이 일어나면서 막을 투과하는 양이 줄어들게 된다. pH가 점차 증가되면 오발부민과 콘알부민은 음으로 하전되고, 막의 표면부 또한 음으로 하전되어 오발부민과 콘알부민은 분리막과의 척력이 작용하고 라이소자임은 분리막과의 인력이 작용하게 되어 라이소자임의 투과선택도가 증가하게 된다[14-16]. 이러한 현상은 Son 등[13]의 결과와 일치하는 것으로서 라이소자임의 등전점인 pH 11까지 투과선택도 증가가 지속되어 본 실험의 경우 pH 11일 때 총 단백질에 대한 라이소자임의 투과선택도 $\psi_{ly/(co+ov)}$가 최대값인 83을 나타내었다. 또한 동일한 조건에서 콘알부민에 대한 라이소자임의 투과선택도는 118, 오발부민에 대한 라이소자임의 투과선택도는 286을 나타내었다.

4. 결 론

전량여과(dead-end filtration) 한외여과법을 사용하여 계란 난백용액으로부터 라이소자임 효소의 분리정제를 연구한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 전량여과 한외여과법으로 계란 난백으로부터 라이소자임을 분리정제하기 위한 최적의 조건은 난백용액의 pH 11, 한외여과 막의 분획분자량(MWCO) 30 kDa이었다.

2. 난백용액의 pH 11, 한외여과 막의 분획분자량(MWCO) 30 kDa일 때 총 단백질에 대한 라이소자임의 투과선택도는 83이었다.

3. 난백용액의 pH 11, 한외여과 막의 분획분자량(MWCO) 30 kDa일 때 콘알부민에 대한 라이소자임의 투과선택도는 118, 오발부민에 대한 라이소자임의 투과선택도는 286을 나타내었다.

감 사

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of Chungbuk National University in 2014).

Reference

1. P. A. Belter, E. L. Cussler, and W. S. Hu, “Bioseparations: Downstream processing for biotechnology”, Wiley, New York, NY (1988).
2. S. Brandt, R. A. Goffe, S. B. Kesseler, J. L. O’Conner, and S. E. Zale, “Membrane-based affinity technology for commercial scale purification”, *Biotechnol*., **6**, 779 (1988).
3. K. G. Brief and M. R. Kula, “Fast protein chromatography on analytical and preparative scale using modified macroporous membrane”, *Chem. Eng. Sci*., **47**, 141 (1992).
4. I. C. Kim, K. H. Lee, J. Y. Park, B. R. Jeong, J. Y. Kwon, and K. H. Lee, “Separation of protein from degumming solution by ultrafiltration membrane”, *Membr. J.*, **17**, 375 (2007).
5. M. Mulder, “Basic principles of membrane technology”, 2nd Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands (1996).
6. K. H. Youm, H. Y. Lee, and Y. C. Shin, “Water treatment using separation membranes”, Sin-A Publishing, Jeju, Korea (2011).
7. R. Ghosh and Z. F. Cui, “Purification of lysozyme using ultrafiltration”, *Biotech.. Bioeng.*, **68**, 191 (2000).

8. R. A. Muzzarelh, G. Baroontini, and R. Roccheth, “Isolation of lysozyme on chitosan”, *Biotech. Bioeng*., **20**, 87 (1978).
9. E. Y. Lee and G. J. Woo, “Separation of highly purified antimicrobial lysozyme using ultrafiltration and characteristics of membrane fouling”, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**, 458 (1999).
10. Y. Matsuoka, “Egg White Lysozyme”, *J. Japan Soc. Food Nat*., **24**, 311 (1971).
11. S. C. Lee, “Review of effective methods for extraction of lysozyme“, Masters Thesis, Dept. of Dental Science, School of Dentistry, Chonnam National Univ., Gwangju, Korea (2009).
12. W. S. Kim, “Separation of lysozyme protein with high purity by polyelectrolyte precipitation”, Research Report No. 951-1103-047-1, Korea Science and Engineering Foundation (1996).
13. D. H. Son, H. J. Jun, Y. H. Lee, and J. K. Koo, “Separation and purification of lysozyme from chicken eggwhite through ultrafiltration”, *Membr. J*., **15**, 121 (2005).
14. D. H. Son, Y. H. Lee, and J. K. Koo, “Effect of electrical field on ultrafiltration for protein separation”, *Membr. J*., **15**, 132 (2005).
15. A. W. Gordon, H. Ward, and H. L. Fevold, “Isoation of lysozyme from egg white”, *J. Biol. Chem.*, **157**, 43 (1945).
16. H. W. Kim and I. H. Kim, “Comparison of lysozyme purification from egg white between ion exchange chromatography and precipitation”, *HWAHAK KONGHAK*, **41**, 332 (2003).
17. R. Ghosh, S. S. Silva, and Z. Cui, “Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration”, *Biochem. Eng. J*., **6**, 19 (2000).
18. Y. Wan, J. Lu, and Z. Cui, “Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration”, *Sep. Purifi. Technol*., **48**, 133 (2006).