

난백으로부터 리소짐 분리를 위한 이온교환 크로마토그래피와 침전법의 비교

김형원 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2002년 9월 5일 접수, 2003년 3월 24일 채택)

Comparison of Lysozyme Purification from Egg White Between Ion Exchange Chromatography and Precipitation

Hyoung Won Kim and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 5 September 2002; accepted 24 March 2003)

요 약

단백질을 분리하는 방법 중에서 이온교환 크로마토그래피와 침전법을 이용하여 난백으로부터 lysozyme을 분리하였다. 특히, 이온교환 크로마토그래피에서는 gradient system을 이용하여 용출용액의 농도변화와 유속에 따른 분리정도를 알아 보았다. 그 결과 농도는 0 M에서 1 M NaCl로 농도구배를 걸어주었을 때 lysozyme 분리에 충분하다는 것과 유속의 영향은 적다는 것을 SDS-PAGE를 통해 알 수 있었다. 크로마토그래피와 비교하기 위해 황산암모늄을 이용하여 난백 단백질을 침전시켰다. 황산암모늄의 농도를 변화시켜보았지만, lysozyme을 난백에 있는 다른 단백질과 선택적으로 분리시키지 못했다. 그리고 침전시간과 침전온도를 변화시켜서 lysozyme의 수율변화를 조사하였다.

Abstract – Ion exchange chromatography(IEC) with gradient and precipitation were used to purify lysozyme from egg white. In IEC, elution of lysozyme from 0 M to 1 M NaCl gradient was performed and SDS-PAGE showed that lysozyme was selectively purified from other egg white proteins. In addition to IEC, egg white proteins were salted out with ammonium sulfate to compare the effectiveness of precipitation method with IEC. The concentrations of ammonium sulfate were varied from 25% to 85%. Precipitation was not able to purify solely lysozyme from egg white. Recovery of lysozyme in the precipitation was improved by changing precipitation temperature and aging time.

Key word: Chromatography, Precipitation, Lysozyme

1. 서 론

Lysozyme은 세균 세포벽의 peptidoglycan에 작용하여 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4-muramidic bond를 가수분해하는 효소로서, *micrococcus lysodeikticus*같은 세균이나 다른 그람양성 세균과 음성세균 등을 용균시키는 특성을 갖는다[1]. 이런 특성 때문에 lysozyme은 항염증 작용, 항출혈작용, 항세균 작용 등의 특성을 지니고 있어 소염효소제로 사용되거나 궤양, 감염, 상처의 치료에도 사용된다. 또한 lysozyme은 통조림 제조시에 멸균온도를 감소시키고 소시지, 치즈 등에 첨가되는 등 식품 보존제로 사용되기도 한다. 그 밖에도 화장품에 lysozyme이 사용되고, 펩신에 의한 우유 단백질의 분해를 촉진시키는 기능을 갖고 있어 분유에 첨가되기도 한다[2]. 이와 같이 유용한 천연물질인 lysozyme은 동물의 조직, 체액, 식물 및 미생물 등에 널리

분포되어 있지만 난백 중에 함량이 약 0.3%로 가장 높다. 난백은 다른 lysozyme 함유물질에 비하여 생산량이 풍부하며, 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 추출원료로 가장 적합한 것으로 알려져 있다[3,4].

단백질을 분리하는 방법은 여러 가지가 있다. 그 중 값이 싼 계란 흰자에서 lysozyme을 추출하여 효과적으로 활용하기 위한 분리 및 정제에 관한 연구가 단백질 침전법을 중심으로 연구되었는데, 고전적인 침전으로 Alderton과 Fevold[5]가 pH 9.5에서 5% NaCl을 첨가하여 난백으로부터 lysozyme을 직접 결정화 시켰다. 그러나 이 방법은 나머지 단백을 활용할 수 없고 수율과 순도가 낮기 때문에 효과적이지 못했다. 수율과 순도의 단점을 보완하기 위해서 Junowicz와 Charm[6]은 sepharose 유도체를 친화성 수지로 사용하였고 크로마토그래피를 이용하여 난백과 인간의 침 그리고 모유로부터 lysozyme을 분리하였다. 비활성도가 침전에 의해 얻은 것보다 두 배 높았고 수율도 거의 100%에 달했지만, 특별한 수지를 필요로 하기 때문에 가격 면에서나 산업적인 이용도 면에서나 부적절하였다. 그래서 시도된 방법이 이온교환수지를 이용한 크로마토그래피이다. Li-Chan 등[7]은 여러 가지 양이온 교환수지를 가지

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

고 난백으로부터 lysozyme을 분리하는 실험을 했다. 여기서 주목할 것은 회분식이 갖고 있는 수지의 재생문제 등을 극복하기 위해서 column으로 실험을 했다는 것이다. 그 결과 더 높은 수율과 연속작업의 편의성에 큰 진전을 보였다. 이 외에도 최근에는 Chiang 등[8]이 한외여과와 친화성 크로마토그래피, 두 단계로 하여 lysozyme을 분리한 결과, 비활성도는 70,400 U/mg으로 매우 높았지만 공정이 너무 복잡하다는 단점이 있었다. 한외여과는 비용이 저렴하고 비용에 비해 생산성과 순도가 높고 다른 크로마토그래피 등과 비교하여 scale-up이 유리하기 때문에 Ghosh 등[9]은 증공사막을 이용하여 한외여과로서 lysozyme을 분리했다. Gu 등[10]은 scale-up시 변성된 단백질을 재접힘시켜야 하는 문제점을 해결하기 위해 크기배제 크로마토그래피에 요소농도의 구배를 주어 실험한 결과 90% 이상의 activity 회수율을 보였다. 이상의 문헌을 검토한 결과 lysozyme의 분리함에 있어 여러 정제방법의 비교에 대한 연구가 부족하였다. 그 중에서 크로마토그래피와 침전법을 비교하였는데, 크로마토그래피는 알려진 바와 같이 정제효율이 좋지만 침전법에 비해 방법이 복잡하고 장비가 많이 필요하다. 만약 침전법으로도 난백에서 lysozyme을 선택적으로 분리해 낼 수 있다면 크로마토그래피보다 간단히 정제할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이온교환 크로마토그래피와 침전법을 실험 및 비교하였고 어느 방법이 더 효과적인 방법인지 수율과 활성도 측면에서 연구하였다.

2. 실험

2-1. 난백의 제조

난백은 점도가 너무 높기 때문에 작업성이 좋지 않다. 따라서 계란을 난백과 난황으로 분리한 후에 난백에 증류수를 이용하여 무게비 10배 희석하였다. 그리고 고형물을 제거하기 위해 3,000 rpm, 4 °C에서 30분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 불용성인 침전물은 버리고 상등액만을 이용하였다. 시료의 pH는 0.1 M HCl을 이용하여 7로 조절하였다.

2-2. 실험재료

이온교환 크로마토그래피는 양이온교환 수지(Bio-*rex* 70 gel, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)와 유리 column(330 mm L×25 mm ID, Spectra/chrom co., U.S.A.)을 사용하였다. 세척용액과 평형용액은 pH 7로 맞춰진 0.02 M 인산완충용액을 사용하였고, 용출용액으로는 NaCl(동양화학)을 평형에 사용된 완충용액에 녹여 사용하였다. 침전에 사용된 황산암모늄은 식품화학에서 구입하였다. 투석막(MWCO : 6,000-8,000)은 Spectrum Medical Industry(U.S.A.)에서 구입하여 사용했다.

2-3. 이온교환 크로마토그래피

사용한 젤은 건조된 무게로 6 g씩 사용하였다. 0.02 M 인산완충용액(pH 7)에 젤을 부풀린 후에 30분 동안 탈기시켜 column에 부었고, 30분 정도 젤이 중력에 의해 자유 침강될 때까지 방치해 두었다. 그 후에 column을 충전하고 평형시켰는데, 평형 완충용액은 0.02 M 인산완충용액(pH 7.0)으로 22.0 cm/min로 빠르게 하였다. 20분 정도 흘리면 평형이 되었고, 이때의 흡광도 값을 0으로 했다. 평형 후에 희석시켜 준비한 난백을 주입하였는데, 7.37 cm/min로 30분 동안 흘려주어 젤에 lysozyme이 충분히 불도록 하였다. 시료주입 후에는 0.02 M 인산완충용액(pH 7)으로 22.0 cm/min로 빠르게 세척하여 젤에 부착되지 않은 불순물을 제거하였다. 약 15분 정도 세척을 하면 흡광도 값이 다시 0으로 떨어져서 완전히 세척되었다는 것을 알 수 있었다.

이온교환 크로마토그래피의 실험조건변화는 lysozyme의 용출시 NaCl의 농도구배와 따른 영향과 유속변화였다. 농도구배는 NaCl 0 M부터 1 M까지, 0 M에서 2 M까지 농도변화를 주었고 이때 유속은 4.91 cm/min, 7.37 cm/min으로 각각 바꾸었다. 총 3가지의 실험조건변화가 있었

는데, 경우 1에서 농도구배는 0 M에서 1 M로, 용출속도는 7.37 cm/min으로 하였고, 경우 2는 0 M에서 2 M의 농도구배 그리고 용출속도는 7.37 cm/min였다. 마지막으로 경우 3은 0 M에서 1 M의 농도와 용출속도는 4.91 cm/min으로 했다. 농도구배와 유속은 달라지지만 들어간 NaCl의 절대량은 같도록 하였다. NaCl은 평형시킬 때 쓰인 0.02 M 인산완충용액(pH 7)에 녹여 사용하였다. 용출시간은 경우 1에서는 60분 동안 흘려주었고 경우 2에서는 30분간 그리고 경우 3에서는 90분간 흘려주어 용출시간을 변화시켰다. 경우 1과 3에서는 매 2분 간격으로 분취하였고 경우 2에서는 용출시간이 짧으므로 1분 간격으로 분취하였다. NaCl 용출액을 분취한 후에 강하게 결합되어서 용출되지 않은 단백질을 제거하기 위해 0.5 M NaOH와 0.1 M HCl을 주입하였고 용액의 pH를 관찰하여 산 및 알칼리 주입 시간을 정하였고 시료분취도 수행하였다.

2-4. 염 침전법의 실험방법

염의 농도, 온도 및 침전시간의 변화가 lysozyme의 침전에 주는 영향을 실험하였다. 침전에 쓰인 난백시료는 계란을 난백과 난황으로 분리한 후에 난백을 증류수를 이용하여 무게비로 10배 희석하였다. 그리고 고형물을 제거하기 위해 3,000 rpm, 4 °C에서 30분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 불용성인 침전물은 버리고 상등액만을 이용하였다. 시료 50 ml에 0.2 M 인산완충용액(pH 7)을 15 ml 더하여 pH를 유지하였다. 얼음물 욕조에서 비커에 완충용액과 섞인 시료를 넣고 황산암모늄을 투입하여 교반하였다. 농도를 각 25%, 40%, 60% 그리고 85%로 하였다. 주입은 6분 동안 모든 양을 가했고 모두 주입한 후에 30분 동안 교반시켜 난백 단백질을 침전시켰다. 그리고 침전에 염의 농도 외에 다른 중요한 요인인 침전시 온도와 침전시간을 변화시켜 실험했다. 공통적으로 염의 농도는 85%로 하였고, 침전시 온도는 낮은 온도인 얼음물에서 실험한 것과 실온에서 실험한 것을 비교하였고, 침전시간은 3시간 한 것과 12시간 한 것을 비교했다. 이 용액을 3,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 상등액과 침전물을 각 분리하였다. 상등액은 버리고 침전물만을 취했는데, 침전물을 다시 0.2 M 인산완충용액(pH 7)에 녹였다. 염을 제거하기 위해 MWCO(molecular weight cut off)가 6,000-8,000 투석막을 이용하였다. 투석은 0.2 M 인산완충용액(pH 7) 250 ml을 투석액으로 4시간 정도 상온에서 하였다.

2-5. 분석방법

각 시료의 활성도를 측정하였는데 *M. luteus*를 이용하여 Li-Chan 등[7]의 측정법을 이용하였다. 파장이 450 nm에서 0.066 M 인산완충용액(pH 6.24)을 기준으로 했을 때 앞에 사용된 인산완충용액에 *M. luteus*를 넣은 현탁액의 초기 흡광도가 0.6에서 0.7 사이 값을 갖도록 했다. 이 현탁액 2.5 ml에 시료 0.1 ml을 넣어 2분간 흡광도 값의 변화를 측정했다. 활성도의 단위는 unit로 흡광도 값이 0.001이 변할 때 1 unit로 하였다. 비활성도는 분취한 시료의 부피로 나누어 계산하였다. 난백의 활성도를 측정해 여러 정제단계에서 분취한 시료의 회수율 및 정제도를 계산하였다. 이온교환 크로마토그래피와 침전에 의해 얻은 시료에 lysozyme의 유무를 확인하기 위해 또, 선택적으로 분리되었는지 정성적으로 알아보기 위해 전기영동(15% SDS-PAGE)[11]을 이용해 분석하였다. 위 모든 실험은 실온에서 하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 이온교환 크로마토그래피

먼저 NaCl의 농도구배에 따른 분리능을 알아보기 위해서 경우 1과 경우 2를 비교하였다. 경우 1의 크로마토그램은 Fig. 1(a)와 같다. 45분부터 105분까지 약 60분간 용출시켰고, 시료는 2분 간격으로 총 30개를 분취하였다. 크로마토그램을 보면 피크가 두 개로 나뉘어져 있다는 것

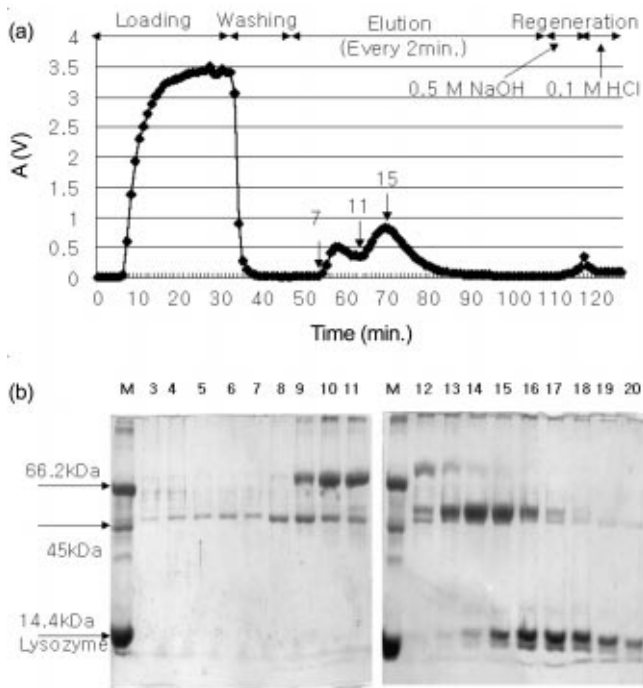


Fig. 1. (a) Ion exchange chromatography of egg white solution (from 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate: 7.37 cm/min.), (b) 15% SDS-PAGE of collected samples (from 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate: 7.37 cm/min.).

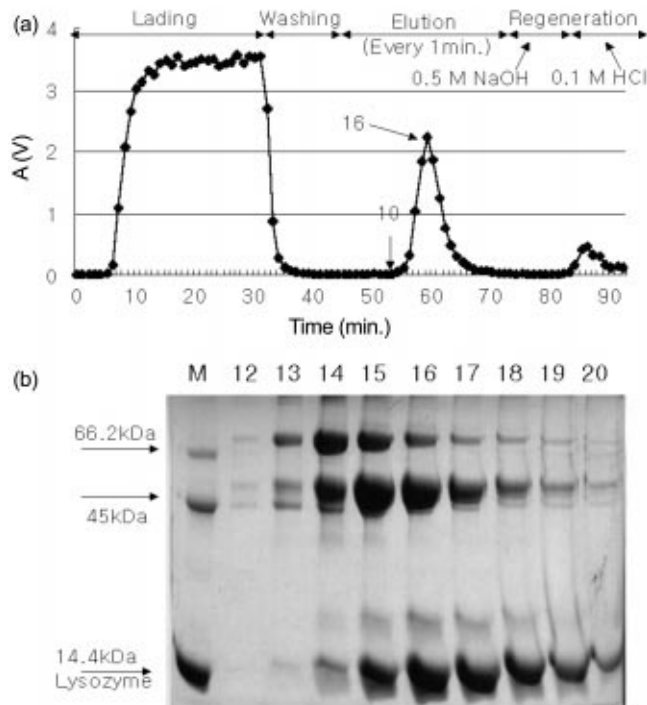


Fig. 2. (a) Ion exchange chromatography of egg white solution (from 0 M to 2 M NaCl, elution flow rate: 7.37 cm/min.), (b) 15% SDS-PAGE of collected samples (from 0 M to 2 M NaCl, elution flow rate: 7.37 cm/min.).

을 알 수 있었고, lysozyme이 선택적으로 분리되었는지 알기 위해서 SDS-PAGE(Fig. 1(b))의 결과를 보면 다른 단백질과 lysozyme이 분리되어 서로 다른 시간에 용출된다는 것을 알 수 있었다. 시료번호 15번 이

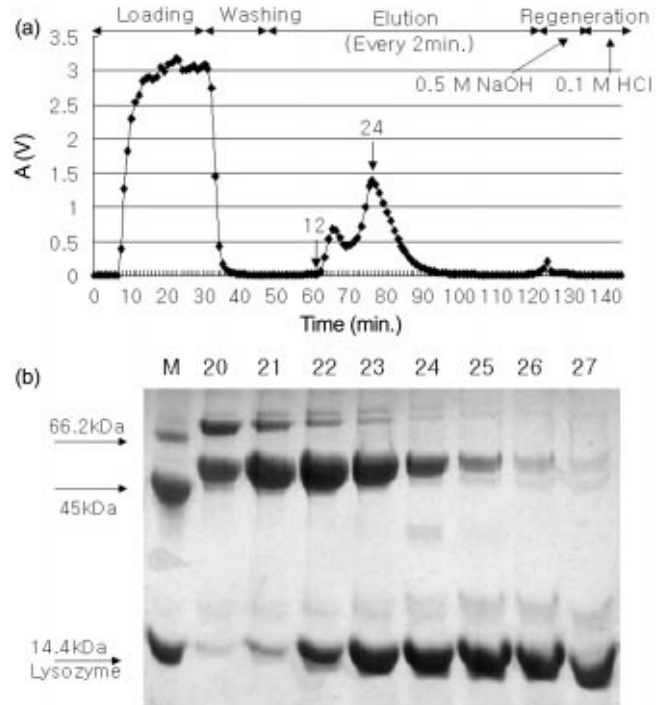


Fig. 3. (a) Ion exchange chromatography of egg white solution (from 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate: 4.91 cm/min.), (b) 15% SDS-PAGE of collected samples (from 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate: 4.91 cm/min.).

후부터 lysozyme의 띠가 확실하고 두꺼웠다. 이는 젤과 난백의 여러 종류의 단백질간의 이온결합 세기가 틀려 용출되는 시간의 차이가 생기기 때문이다. 경우 2(Fig. 2(a))에서는 하나의 단일 피크가 생겼다. 시료의 성분을 분석한 결과, Fig. 2(b)에서 보듯이 경우 1과는 달리 단백질이 분리되지 않고 동시에 용출되어 선택성이 없었다. 용출용액의 NaCl 농도가 너무 진하여 여러 단백질과 젤과의 이온결합의 강도에 무관하게 동시에 탈착되었기 때문이다.

유속의 영향을 알아보기 위해서 농도구배는 같게 하고 용출유속을 변화시켰다. 7.37 cm/min(Fig. 1(a))과 4.91 cm/min(Fig. 3(a))의 경우를 비교하면, 두 경우 모두 두 개의 피크를 나타내고 SDS-PAGE(Fig. 3(b))를 보면 알 수 있듯이 서로 큰 차이가 없다. 오히려 유속을 늦게 하면 용출속도가 느려질 뿐 아니라 시료 분취시간도 늘어났다.

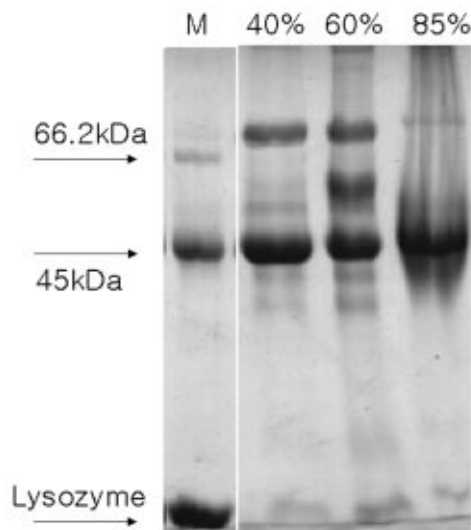
각 경우에서의 활성도와 수율 그리고 정제도를 Table 1에 나타내었다. 주입시료의 총 활성도를 분취된 시료의 총 활성도로 나누어 수율을 구했는데 분취 받은 모든 시료의 수율과 lysozyme을 정제하기 위해 분취한 시료의 수율을 각각 구했다. 정제도는 주입시료의 비활성도와 분취 시료의 비활성도의 비로 구했다. 경우 2는 수율 71.3%로 다른 두 경우에 비해 좋지 못했고 또한 lysozyme을 선택적으로 분리하지도 못했다. 경우 1과 3은 둘 다 선택적으로 lysozyme을 분리시켰고 수율이나 정제 정도가 비슷하였다. 경우 1에서 15번 시료부터 22번 시료까지 분취하면 수율 82.7%의 1.1배 정제된 그리고 경우 3에서는 24번 시료부터 37번 시료까지 분취하여 수율 81.6%, 1.2배 정제된 lysozyme을 얻었다. 분취한 모든 시료의 수율도 두 경우다 93.2%, 94%로 비슷했다.

3-2. 황산암모늄에 의한 침전

염의 농도가 lysozyme의 분리에 미치는 영향을 실험한 결과 25%의 염의 농도에서는 lysozyme의 침전이 일어나지 않았고 40% 이상부터 침

Table 1. Recovery and purification fold in ion exchange chromatography

	Case 1 (from 0 M to 1 M, 7.37 cm/min)	Case 2 (from 0 M to 2 M, 7.37 cm/min)	Case 3 (from 0 M to 1 M, 4.91 cm/min)
Total activity (U, loading sample)	81,000	80,000	87,000
Specific activity (U/ml, loading sample)	2,480	2,130	2,410
Total activity (U, all collected samples)	76,000	57,000	82,000
Recovery (% , all collected samples)	93.2	71.3	94.3
Total activity (U, fractioned samples)	67,000 (No.15-No.22)		71,000 (No.24-No.37)
Specific activity (U/ml, fractioned samples)	2,804 (No.15-No.22)		2,538 (No.24-No.37)
Recovery (% , fractioned samples)	82.7 (No.15-No.22)		81.6 (No.24-No.37)
Purification fold	1.1		1.2

**Fig. 4. 15% SDS-PAGE of precipitated samples.****Table 2. Recovery in ammonium sulfate precipitation [Specific activity (U/ml, loading sample): 1,950]**

	25%	40%	60%	85%
Total activity (U)	No ppt.	3,600	5,700	69,000
Recovery (%)	No ppt.	2.9	4.6	56.1

전물이 생긴다는 것을 SDS-PAGE(Fig. 4)에서 확인할 수 있었다. Fig. 4에 나타난 것처럼 염의 농도에 따라 침전되는 단백질의 종류가 달라졌다. 40%의 침전물에는 없거나 소량이었던 45 kDa 크기 단백질의 위, 아래 띠가 60%에서는 진해졌음을 알 수 있다. 그러나 우리가 분리하고자 하는 14.4 kDa의 lysozyme은 선택적으로 침전되지 않았다. 선택적으로 분리가 일어나지 않았지만, Table 2를 보면 가장 높은 염의 농도인 85%에서 lysozyme의 수율이 56%로 높았다. 이에 비해 농도가 40%와 60%에서는 수율이 5% 이내로 매우 낮아 큰 대조를 이루었다. 침전온도와 침전시간의 영향을 Table 3에 나타내었는데, 결과를 보면 저온보다는 상온에서, 침전시간이 짧은 것보다는 길 때 수율이 높았고 활성도도 좋았다. 온도가 높을 때 수율이 좋은 것은 용해도 차이 때문이라고 보고 된 바 있는데 대부분의 단백질이 높은 온도에서는 용해도가 감소하는데 이유가 있다[12]. 상온에서 침전시간을 12시간으로 하면 lysozyme의 수율을 81.3%까지 증가시킬 수 있었다. Forsythe 등의 실험에서는 직접 난백에서 lysozyme을 결정화시키지 않고 이미 난백에서 얻은 lysozyme으로 결정화시켰는데 여러 가지 실험조건을 변화시켜 최고 99.9%까지 침전시켰다는 보고가 있다[13].

Table 3. Recovery of lysozyme at various temperature and time from precipitation experiments [At 85% ammonium sulfate, specific activity (U/ml, egg white sample): 2,460]

	At ice-bath, 30 min	At room temperature, 30 min	At room temperature, 12h
Total activity (U)	69,000	82,000	100,000
Recovery (%)	56.1	66.7	81.3

3-3. 이온교환 크로마토그래피와 침전법에 의한 lysozyme의 비교

이온교환 크로마토그래피에서는 경우 2를 제외한 경우 1과 3에서 lysozyme을 선택적으로 분리하였다. 분리에 가장 중요한 인자는 용출유속보다는 용출용액의 NaCl 농도였고 0 M에서 1 M까지 용출용액의 농도에 변화를 주었을 때 lysozyme의 분리가 선택적으로 일어났으며 수율도 90% 이상으로 높았다. Lysozyme과 젤과의 이온결합 강도가 다른 단백질보다 강해 크로마토그램의 뒷부분에서 용출되었고 이 부분에서 lysozyme을 얻기 위하여 분취한 시료도 80% 이상의 높은 수율을 나타냈다.

침전법에 의한 분리에서 황산암모늄의 농도를 변화시켜 lysozyme을 선택적으로 분리하려 했으나 분리되지 않았고 수율도 염의 농도가 가장 높은 85%의 황산암모늄을 주입했을 때 이온교환 크로마토그래피의 절반정도인 56.1%이었다. 침전시간, 침전온도를 변화시켜 실험을 해보았는데 두 조건 모두 수율에 영향을 주었다. 결국 81.3%까지 수율을 높였지만 이온교환 크로마토그래피보다 10% 작았다. 그러나 실험방법 및 장치가 간편하였다.

4. 결 론

유용한 생리 활성물질인 lysozyme을 분리할 때 이온교환 크로마토그래피와 침전법을 통하여 어느 방법이 더 효과적인지 실험하였다. 특히 이온교환 크로마토그래피는 gradient system을 도입하여 용출농도의 변화를 주었다. 0 M에서 1 M까지 농도구배를 주었을 때 lysozyme이 선택적으로 분리가 잘 일어났으나 NaCl의 농도가 너무 높을 경우에는 다른 단백질과 함께 용출되어 선택성이 낮았다. 용출유속이 7.37 cm/min과 4.91 cm/min일 경우에 큰 차이가 없었고 오히려 후자의 경우 시간과 용액을 많이 사용하기 때문에 비효율적이었다. 침전법은 비교적 방법도 간단하였고, 염의 농도, 침전시간, 침전온도를 변화시켜 수율을 81.3%까지 증가시켰지만, 다른 단백질로부터 lysozyme을 선택적으로 분리하지는 못했다. 결과적으로 난백에서 lysozyme을 선택적으로 분리하기 위해서는 이온교환 크로마토그래피가 침전법보다 효과적임을 알 수 있다.

감 사

본 연구는 산업자원부 청정기술개발사업비와 인하대학교 초정밀생물 분리기술 연구센터의 지원에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Regel, R., Mantioli, S. R. and Terra, W. R., "Molecular Adaptation of *Drosophila Melanogaster* Lysozymes to a Digestive Function," *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **28**(5,6), 309-319(1998).
2. Kim, W. K. and Chung, B. H., "Optimization of Chromatographic Separation of Lysozyme from Homogenate of Hen Egg White by Comparison of Breakthrough Behavior," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(3), 279-283(1999).
3. Yoshitaka, M., "Lysozyme its Chemistry and Application," *J. Jap. Soc. Food and Nutr.*, **24**(6), 311-315(1971).
4. Awade, A. C. and Efstathiou, T., "Comparison of Three Liquid Chromatographic Methods for Egg-White Protein Analysis," *J. Chromatogr. B*, **723**(1), 69-74(1999).
5. Alderton, G. and Fevold, H. L., "Direct Crystallization of Lysozyme from Hen Egg White and Some Crystalline Salts of Lysozyme," *J. Biol. Chem.*, **164**, 1-5(1946).
6. Junowicz, E. and Charm, S. E., "Purification of Lysozyme by Affinity Chromatography," *FEBS Lett.*, **57**(2), 219-221(1975).
7. Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D. B. and Lo, K. V., "Lysozyme Separation from Hen Egg White by Cation Exchange Column Chromatography," *J. Food Science*, **51**(1), 1032-1036(1986).
8. Chiang, B. H., Su, C. K., Tsai, G. J. and Tsao, G. T., "Egg White Lysozyme Purification by Ultrafiltration and Affinity Chromatography," *J. Food Science*, **58**(2), 303-306(1993).
9. Ghosh, R., Silva, S. S. and Cui, Z., "Lysozyme Separation by Hollow-Fibre Ultrafiltration," *Biochem. Eng. Journal*, **6**, 19-24(2000).
10. Gu, Z., Su, Z. and Janson, J. C., "Urea Gradient Size-Exclusion Chromatography Enhanced the Yield of Lysozyme Refolding," *J. Chromatogr. A*, **918**, 311-318(2001).
11. Bollag, D. M. and Edestein, S. J., *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York, NY(1991).
12. Pak, D. H., Lee, H. J. and Lee, E. K., "Crystallization of Alkaline Protease as a Means of Purification Process," *Korean J. Chem. Eng.*, **14**(1), 64-68(1997).
13. Forsythe, E. L., Snell, E. H., Malone, C. C. and Pusey, M. L., "Crystallization of Chicken Egg White Lysozyme from Assorted Sulfate Salts," *J. Crystal Growth*, **196**, 332-343(1999).