

HPLC에서 이동상 변화와 온도에 따른 난백의 분리

도진선 · 송신영 · 조기정 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-746 대전시 유성구 궁동 220
(2011년 3월 15일 접수, 2011년 4월 13일 채택)

Separation of Egg White Using HPLC with Change of Mobile Phase and Temperature

Jin Sun Do, Shin Young Song, Ki Jung Cho and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 15 March 2011; accepted 13 April 2011)

요 약

난백에 함유된 lysozyme은 용균작용을 하며 ovalbumin은 면역계에서 항원으로써 역할을 한다. 난백분석에는 일반적으로 전기영동, 겔 투과 크로마토그래피, reversed-phase HPLC(RP-HPLC)를 사용하는데 신속한 분석을 위해 RP-HPLC가 사용된다. HPLC 컬럼으로 C18 컬럼(Agilent, USA)을 사용하였다. 최적의 분리조건을 찾기 위해 이동상의 조성과 온도를 변화하였고 용량인자, 분리도를 계산하여 그 값을 비교하였다. 등용매 용리에서 acetonitrile(ACN), distilled water(DW), trifluoroacetic acid(TFA)의 이동상 부피비를 30/70/0.1~60/40/0.1로 ACN 부피비를 10%씩 증가시키며 실험하였고 이 때 온도는 20 °C이었다. 기울기 용리에서는 ACN과 증류수의 비율을 20분 동안 10/90~60/40으로 증가시켰고 20, 30, 40 °C의 온도변화를 주었다. 등용매 용리에서 이동상 조성이 50/50/0.1일 때 세 개의 피크로 분리되었고 세 개의 피크 중 첫 번째 피크가 lysozyme, 세 번째 피크가 ovalbumin임을 확인하였다. 기울기 용리에서는 온도가 30 °C 일 때 네 개의 피크가 나왔으며 네 개의 피크 중 첫 번째 피크가 lysozyme, 세 번째 피크가 ovalbumin임을 확인하였다.

Abstract – Lysozyme in egg white functions as bacteriolysis agent and ovalbumin plays a role as antigen in immune system. Egg white analysis methods usually include electrophoresis, gel permeation chromatography and reversed-phase HPLC(RP-HPLC). Among them, RP-HPLC was selected for rapid analysis and C18 column(Agilent, USA) was used as HPLC column. Optimum conditions were searched by changing mobile phase and temperature. Capacity factor and resolution were calculated and compared for various elution conditions. In the isocratic elution, mobile phase volume ratio was changed from 30/70/0.1 to 60/40/0.1(Acetonitrile(ACN)/Distilled water(DW)/Trifluoroacetic acid(TFA)). ACN composition was increased by 10% and temperature was set as 20 °C. In the gradient elution, ACN/DW ratio was changed from 10/90 to 60/40 during 20 minute and temperature was varied as 20, 30 and 40 °C. In the isocratic elution, three peaks were separated at 50/50/0.1. Lysozyme and ovalbumin were confirmed as first and third peak in three peaks respectively. In the gradient elution, four peaks were separated at 30 °C. Lysozyme and ovalbumin were confirmed as first peak and third peak in four peaks respectively.

Key words: Egg white, HPLC, C18, Temperature

1. 서 론

식품으로 유통되고 있는 조류의 알은 달걀, 메추리알, 오리알 등을 들 수 있다. 이 중에서 달걀이 대부분을 차지하고 있다. 달걀은 다른 동물성 식품에 비해 필수지방산인 불포화지방산이 많고, 비타민과 여러 무기질이 함유되어 있다. 특히 아미노산이 균형을 이루고 있어 완전식품이라 할 수 있다[1].

달걀은 크게 난백, 난황으로 구성되어 있다. 이 중 난백은 달걀무

게의 약 60%를 구성하고 주된 성분은 단백질로 난백의 약 10%를 차지한다. 난백에 포함된 단백질은 크게 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, lysozyme, ovomucin, ovoglobulin, ovotransferrin으로 분류할 수 있다[2]. 그 중 ovalbumin은 난백 단백질 중 57%로 가장 많은 비율을 차지하며, 분자량은 45 kDa로 인산기가 부착되어 있다. Lysozyme은 난백의 3.5%를 구성하는 효소로서 분자량은 15 kDa로 비교적 작은 단백질이다.

Ovalbumin은 강한 항원으로써 IgG나 IgE와 면역 반응을 일으켜 식품 알레르기를 유발한다[3]. 소화기에서의 ovalbumin은 알레르기 원으로써 가수분해 소화효소에 저항성이 있어 소화 후 알레르기를 일으키기 때문에 ovalbumin은 효소처리, 가열처리, 방사선처리 연구

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

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

등의 방법으로 알레르기성을 낮춘 식품제조에 이용되고 있다[4]. 그리고 항원으로 사용하여 천식과 기관지염 등 질병유발 인자로 사용하여 면역연구에 주로 활용되고 있다[5]. Lysozyme은 세균을 불활성화시키는 작용을 하는데[6], N-acetylmuramic acid(NAM)와 N-acetylglucosamine(NAG) 사이에 연결된 β -1,4 결합을 가수분해시키는 작용을 하여 세포벽을 용해시킨다. 따라서 lysozyme은 오래 전부터 소염제 또는 항생제로 의약품의 원료로 이용되어 왔다. 또한 lysozyme은 우유, 소시지 등 식품보존효과가 있어 식품산업에서 사용되고 있다[7]. 유전공학에서는 대장균에서 플라스미드를 추출할 때, 세포벽을 용해시키기 위해 사용한다. lysozyme은 눈물, 혈장, 이자, 모유 등의 동물조직이나 양배추와 같은 식물조직에도 널리 분포되어 있다. lysozyme과 ovalbumin은 자연계에서 직접 추출하기 때문에 일반 화학보존료나 방부제와 달리 친환경적이라 할 수 있다[8].

난백 분석방법에는 일반적으로 전기영동, 겔 투과 크로마토그래피, RP-HPLC이 있다. 이러한 연구방법 중 RP-HPLC 방법은 다른 방법에 비해 시료준비가 쉽고, 비교적 신속한 분리가 가능하다는 장점에 많이 사용되고 있다. 또한 극성 용매를 사용해 용리액의 세기를 조절할 수 있어 여러 분석 작업이 가능하다[9].

난백의 분리를 위해 RP-HPLC를 사용하여 난백 내의 ovalbumin과 lysozyme의 분석 특성을 알아보는 것을 목표로 실험을 수행하였다. 이동상의 조성을 등용매 용리로 변화를 주어 최적의 이동상 조건을 찾고 이 조건을 통해서 기울기 용리를 선택하여 난백을 분석하였다. 그리고 기울기 용리에서 컬럼의 온도변화를 주어 온도에 따른 영향을 확인하였다. 크로마토그램의 분리특성을 수치를 통해 분석하기 위해 용량인자(k')와 분리도(R)를 아래 식들을 사용하여 계산하였다.

용량인자는 시료와 컬럼간의 상호작용을 나타내는 값으로써 다음 식으로 정의된다.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

t_R 은 피크의 체류시간이며, t_0 는 시료가 고정상과 상호작용이 없고 UV 검출기에 도달하는 시간을 의미하며 불감시간(dead time)이라 한다. 분리도는 시료의 분리상태를 표시하는 지표로써 다음 식으로 나타낸다.

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)/2} = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

t_{R1} , t_{R2} 은 체류시간, w_1 , w_2 는 피크의 폭을 의미하며 시간단위로 나타낸다.

2. 실험

2-1. 실험재료 및 시약

시료는 시중에서 구입한 달걀과 무수 인산수소 나트륨(Sigma, S0751-1KG, USA), 무수 인산이수소 나트륨(Sigma, S-5136, USA)을 사용하였고 이동상으로 Acetonitrile(J.T. baker, USA), 증류수(Younglin, Korea), Trifluoroacetic acid(J.T. baker, USA)를 사용하였다. 그리고 시료를 여과하기 위해 0.22 μ m 주사기 필터(Advantec, Toyo, Japan), 이동상을 여과하기 위해 막 필터(GVPP, Millipore, USA)를 사용하였다. 표준품으로는 lysozyme(Sigma, L6876-5G, USA), ovalbumin(Sigma, A5378-5G, USA)을 사용하였다. 그리고 불

감시간을 측정하기 위해 Methyl tertiary butyl ether(J.T. baker, USA)를 사용하였다.

2-2. 기기 및 장치

시료 제작 시 불순물을 제거하기 위해 원심분리기(Centrifuge 5412, Eppendorf, Germany)를 사용하였다. 등용매 용리를 위한 HPLC로 펌프(Beckman 110B Solvent Delivery Module, Beckman, USA), 자외선 검출기(783A, Applied Biosystems, USA), 데이터 수집 장치(Autochro Data Module, Younglin, Korea), 데이터 수집 소프트웨어(Autochro 2000, Younglin, Korea), C18 column(4.6 \times 250 mm, Agilent, USA)을 사용하였고 기울기 용리에서는 등용매 용리의 펌프 대신 SP930D(Younglin, Korea) 2대와 gradient mixer(Gradient mixer, BIO-RAD, USA)가 사용되었다. 기울기 용리에서 온도변화를 주기위해 column heater(HPLC column heater, BIO-RAD, USA)를 사용하였다.

2-3. 실험 방법

계란의 노른자를 분리, 제거한 후 계란의 흰자를 0.05 M pH 8.3 인산 완충용액에 10배 희석한 후 냉장고에 12시간 보관하였다. 그 상등액을 채취하여 원심분리기(Centrifuge 5412, Eppendorf, Germany)로 3분간 15,000 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리 한 용액을 0.22 μ m 주사기 필터(Advantec, Toyo, Japan)로 여과하여 HPLC의 시료로 사용하였다.

ACN과 증류수를 각각 막 필터(GVPP, Millipore, USA)로 여과하여 이동상의 조성으로 사용하였다. 등용매 용리에서 ACN과 증류수, TFA의 부피조성을 30/70~60/40로 하고 각 조성에 TFA 0.1 vol.%를 첨가하여 혼합한 후 sonicator(Brason, USA)로 10분간 초음파처리, 10분간 탈기한 후 사용하였다. 기울기 용리에서는 master 펌프에 100% DW, slave 펌프에는 100% ACN을 연결하였다. 20 $^{\circ}$ C에서 등용매 용리를 통해 얻은 조건과 기울기 용리의 구배범위 실험(30/70~60/40, 20/80~60/40, 10/90~60/40)을 통해 이동상의 변화 조건을 Table 1로 하였다. Table 1의 조건에서 컬럼의 온도를 column heater(HPLC column heater, BIO-RAD, USA)를 사용하여 20, 30, 40 $^{\circ}$ C로 조절하였다.

펌프의 유량은 1 mL/min, 자외선 검출기의 파장은 280 nm으로 하였다. 시료의 주입량은 20 μ L를 주입하였고 lysozyme, ovalbumin을 분석하기 위해 사용한 lysozyme 표준품과 ovalbumin 표준품 농도는 5 g/L로 하였다.

3. 결과 및 고찰

등용매 용리에서 ACN과 증류수, TFA의 부피조성을 30/70/0.1, 40/60/0.1, 50/50/0.1, 60/40/0.1로 각각 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. (a)에서 두 개의 피크가 검출되었으며 피크가 끌려 분리가 잘 되지 않았다. (b)에서는 ACN이 증가함에 따라 개략적인 피크의 수가 세 개로 한 개 더 늘었지만 전체적으로 피크가 겹쳐있었다. (c)

Table 1. Mobile phase condition for gradient elution

Time (min)	ACN (vol.%)	Distilled water (vol.%)
0	10	90
10	60	40
20	60	40

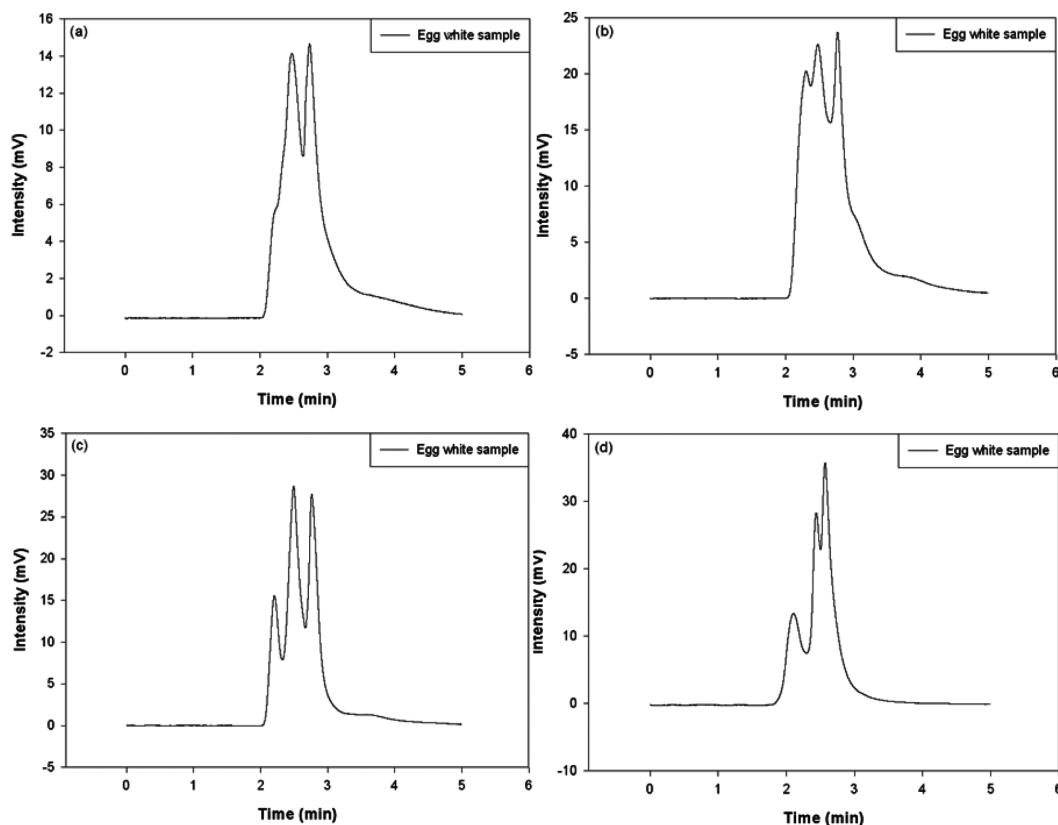


Fig. 1. Chromatograms of egg white sample. Mobile phase compositions are (a) 30/70/0.1, (b) 40/60/0.1, (c) 50/50/0.1, (d) 60/40/0.1.

에서는 세 개의 피크로 분리되었으며 끌림현상도 줄어들었다. (d)에서 첫 번째 피크는 잘 분리되었지만 두 번째, 세 번째 피크가 겹쳐 분리가 잘 되지 않았다. 이동상의 ACN 부피조성이 높아질수록 난백 시료의 피크위치가 앞쪽으로 이동되는 경향을 보였다. 등용매 용리 실험에서 50/50/0.1 부피조성 일때 난백시료의 분리도가 좋음을 알

수 있었다.

이동상 구배범위를 설정하기 위해 실시한 기울기 용리 실험의 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. (a)의 구배에서 난백시료의 분리도가 좋지 않아 (b), (c)순서로 초기 증류수의 양을 늘려가며 조성변화에 따른 분리도를 알아보았다. 그 결과 Fig. 2(c)에서 4개의 피크

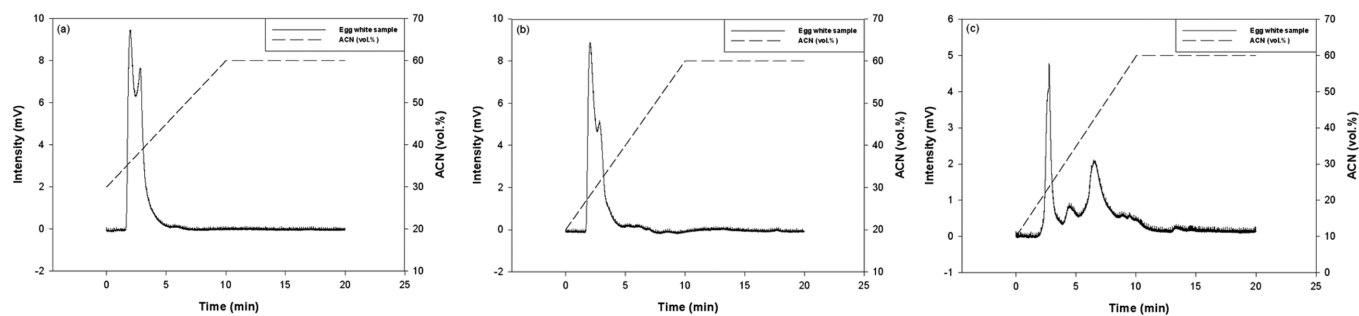


Fig. 2. Comparison of gradient elution conditions at 20 °C. ACN volume percent changes (a) 30~60, (b) 20~60, (c) 10~60.

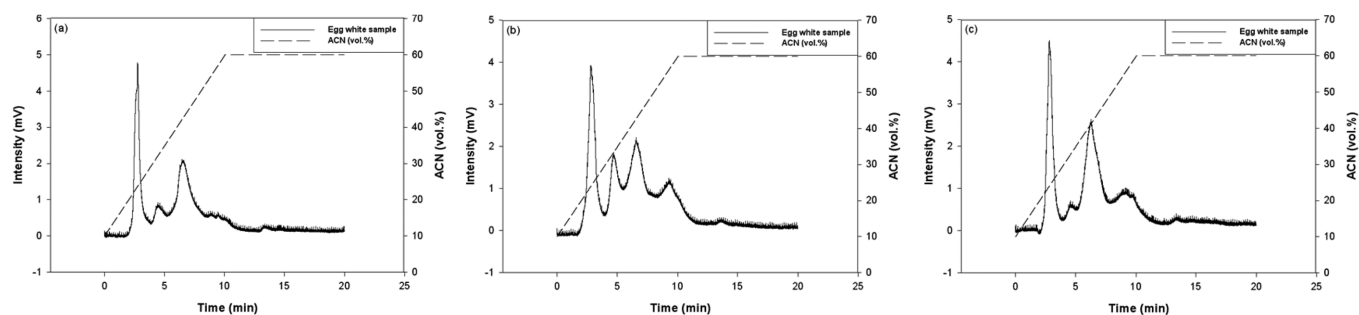


Fig. 3. Chromatograms of gradient elution experiment at (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C.

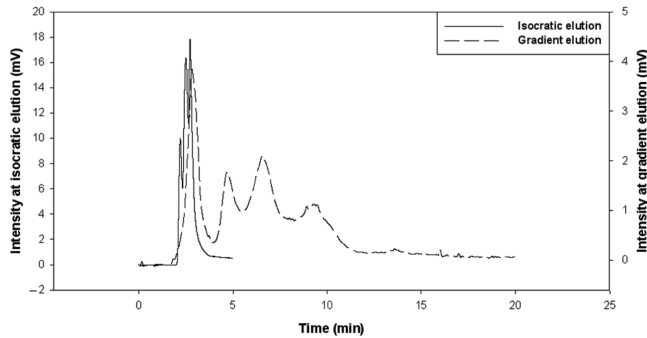


Fig. 4. Comparison of two elution methods at 30 °C. (a) isocratic elution (b) gradient elution.

가 분리되어 나타났다. 이를 바탕으로 기울기 용리의 이동상 설정을 Table 1로 하였으며 20, 30, 40 °C의 온도변화를 준 결과를 Fig. 3에 나타내었다. (a)에서 3개의 피크를 확인하였으며 (b)에서는 (a)의 두 번째 피크와 세 번째 이후에 끌린 부분이 선명해지며 전체적으로 4개의 피크가 확인되었으며 세 온도 조건 중 분리도가 가장 좋았다. (c)는 (b)의 그래프 개형과 비슷했지만 두 번째 피크와 네 번째 피크의 intensity가 감소하였으며 세 번째 피크의 intensity가 (c)의 세 번째 피크보다 증가하였다.

30 °C에서 용리방법에 따른 시료의 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. 등용매 용리에서는 세 개의 피크를 확인할 수 있었고 기울기 용리는 네 개의 피크를 확인하였다. 기울기 용리에서는 20분의 구배시간에 따라 이동상 조성이 서서히 변화되어 난백시료의 각 성분이 이동상에 따라 단계적으로 분리되었다. 그러므로 분석시간은 증가하였지만 등용매 용리에서 겹쳐졌던 피크가 기울기 용리에서는 추가적으로 분리되어 분리도가 높아졌음을 알 수 있었다.

두 가지 용리 방법에서 좋은 분리도를 나타낸 등용매 용리와 기울기 용리 조건에서 난백시료의 크로마토그램을 lysozyme과 ovalbumin 표준품과 비교해 보았다. Fig. 5(a)에서 난백시료의 각 피크의 체류시간이 2분 12초, 2분 30초, 2분 46초이었으며 표준품 lysozyme과 ovalbumin의 체류시간은 각각 2분 12초, 2분 50초이었다. 따라서 시료의 첫 번째 피크는 lysozyme, 세 번째 피크는 ovalbumin임을 확인할 수 있었다. Fig. 5(b)에서는 체류시간이 2분 54초, 4분 42초, 6분 36초, 9분 18초일 때 피크가 나타났다. 그리고 lysozyme 표준품과 ovalbumin 표준품의 체류시간은 각각 3분, 6분 36초이었다. 기울기 용리 실험도 마찬가지로 난백시료의 첫 번째 피크에서 lysozyme을 확인할 수 있었고 ovalbumin 표준품 피크는 시료의 세 번째 피크와 일치하였다. 그리고 크로마토그램을 피크별로 분석해보았다. Nau 등 [10]의 기울기 용리 실험에서는 C4 컬럼으로 난백시료의 농도 50 g/L, 유량 1 ml/min, 샘플 주입량 20 μ L, UV detector의 파장을 280 nm로 하고 ACN/DW/TFA 부피조성을 6분 동안 10/90/0.025~70/30/0.025로 변화시켜가며 시료를 분석하였다. 총 여섯 개의 피크가 나왔으며 ovalbumin, ovomucoid, ovoidinhibitor, ovoflavoprotein, avidin, lysozyme, ovotransferrin 표준품 피크와 비교 해본 결과 ovomucoid과 ovoidinhibitor, ovoglobulins, ovoflavoprotein, lysozyme과 avidin, ovotransferrin, ovalbumin 순서로 용출되었다. 그 중 네 번째가 lysozyme, 여섯 번째 피크가 ovalbumin이었다. Abalo 등[11]의 기울기 용리 실험에서는 C4 컬럼으로 난백시료의 농도 9 g/L, 유량 1 ml/min, 샘플 주입량 50 μ L, UV detector의 파장을 280 nm로 하고, ACN/DW/TFA 부피조성이 35분 동안 26/74/0.05~74/26/0.05로 변화시켜 가면서 시료를 분석하

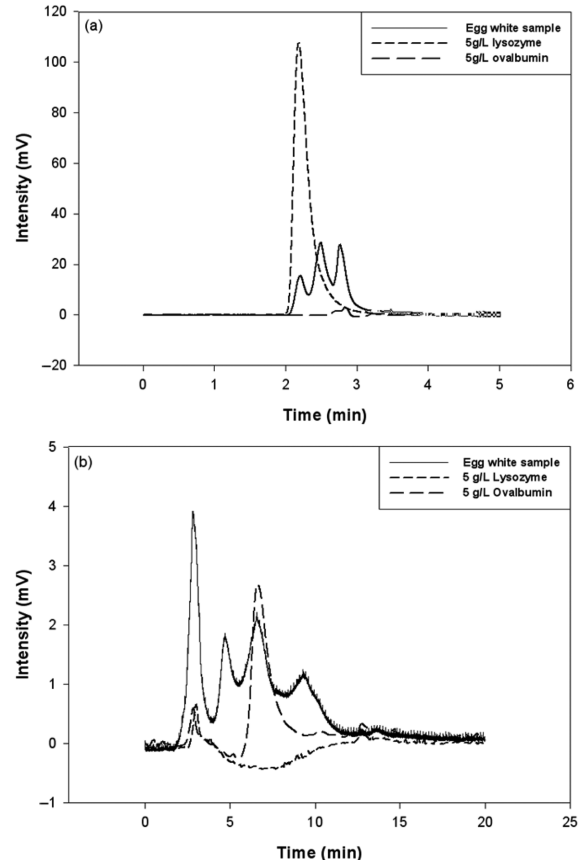


Fig. 5. Comparison of standard peaks in chromatogram of each elution. (a) isocratic elution (b) gradient elution.

였다. 크로마토그램에서 뚜렷한 일곱 개의 피크가 확인되었으며 lysozyme, ovotransferrin, ovalbumin, ovomucoid, avidin, ovoglobulins 표준품 피크와 비교해 본 결과 각 피크는 ovomucoid, ovoglobulins, lysozyme, avidin, ovotransferrin, ovalbumin, ovalbumin 순서로 확인되었다. 그 중 세 번째 피크가 lysozyme, 여섯 번째, 일곱 번째 피크가 ovalbumin이었다. 문헌[10,11]과 비교해 볼 때 기울기 용리실험에서는 첫 번째 피크에 lysozyme이 포함되어 있을 뿐만 아니라 lysozyme 이전에 검출되는 ovomucoid, ovoidinhibitor, ovoglobulins, ovoflavoprotein이 포함된 것으로 예상할 수 있었다. 그리고 세 번째 피크는 문헌 결과에서 마지막 피크에서 용출된 ovalbumin으로 예상된다. ovalbumin이 난백단백질의 약 60%를 차지함에도 불구하고 intensity가 낮게 나온 이유는 강한 소수성 락기 때문에 용출 후에도 컬럼에 남아있어 분리가 완벽하게 이뤄지지 않은 것으로 예상된다. 따라서 기울기 용리실험에서의 네 번째 피크도 세 번째 피크에서 완벽히 분리되지 않고 용출된 ovalbumin이며 두 번째 피크는 lysozyme과 ovalbumin 사이에서 검출된 avidin과 ovotransferrin이 포함된 것으로 예상된다. 기울기 용리 실험과 마찬가지로 등용매 용리 실험에서의 표준품 비교에서도 검출된 피크 세 개 중 첫 번째 피크가 lysozyme, 마지막 피크에서 ovalbumin을 확인한 결과와 크게 다르지 않았으며 두 번째 피크에 포함된 물질도 avidin, ovotransferrin일 것으로 예상된다.

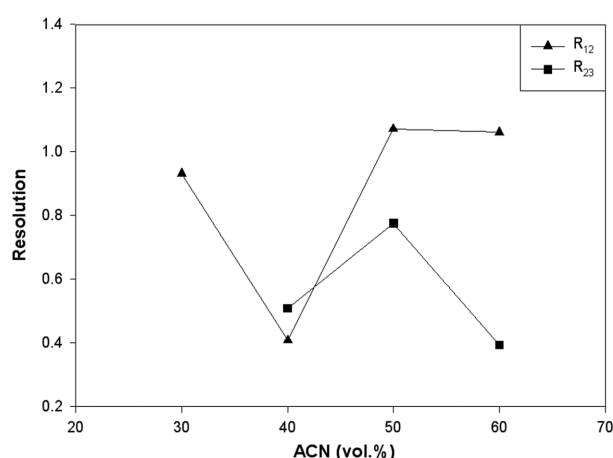
등용매 용리에서 ACN의 부피조성에 따른 용량인자 값과 기울기 용리에서 각 온도에 대한 용량인자 값을 구하기 위해 MTBE를 sample로 하여 t_0 를 구하였다. 등용매 용리에서 t_R , t_0 , k' , R 의 값을 계

Table 2. Capacity factors of lysozyme under isocratic elution conditions

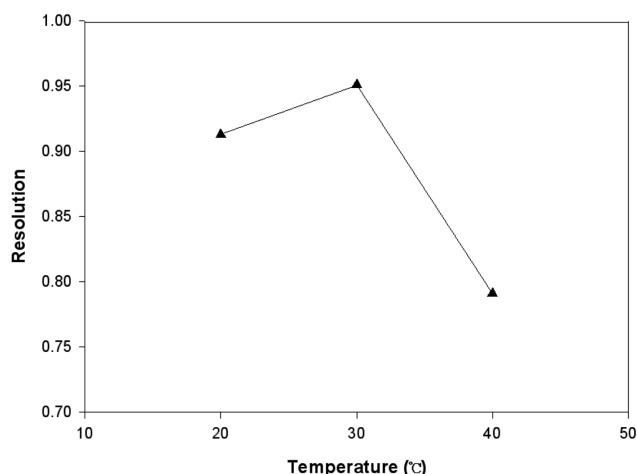
ACN : DW : TFA (vol.%)	t_R (min)	t_0 (min)	k'	R_{12}	R_{23}
30 : 70 : 0.1	2.47	2.02	0.223	0.931	-
40 : 60 : 0.1	2.38	1.83	0.261	0.408	0.509
50 : 50 : 0.1	2.21	1.77	0.249	1.072	0.776
60 : 40 : 0.1	2.11	1.70	0.241	1.061	0.394

Table 3. Capacity factors of lysozyme under gradient elution conditions

Mobile phase conditions	10/90 ~ 60/40 during 20 min		
	20 °C	30 °C	40 °C
t_R (min)	2.72	2.80	2.81
t_0 (min)	1.81	1.92	1.93
k'	0.502	0.458	0.456
$R (= \frac{R_{12} + R_{23} + R_{34}}{3})$	0.913	0.951	0.791

**Fig. 6. Effect of ACN volume percent on resolution in isocratic elution.**

산하여 Table 2에 나타내었고 기울기 용리에서 각 온도에 따른 t_R , t_0 , k' , R 의 값을 Table 3에 나타내었다. 등용매 용리의 경우 ACN이 40% 이상에서 ACN의 vol.%가 증가할수록 이동상의 용출력이 커져 t_R 과 t_0 의 차이가 작아져 용량인자 값이 감소하였다. Fig. 6의 분리도 비교에서는 R_{12} (첫 번째, 두 번째 피크에 대한 분리도)와 R_{23} (두 번째, 세

**Fig. 7. Effect of temperature conditions on resolution in gradient elution.**

번째 피크에 대한 분리도)이 50/50/0.1 이동상 조성에서 가장 큰 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 기울기 용리의 경우 Table 3에서 온도가 20 °C에서 40 °C로 증가함에 따라 용량인자의 값이 감소함을 알 수 있었다. 용량인자를 통해 용출력은 30 °C와 40 °C가 거의 차이가 없었으며 Fig. 7의 분리도 비교에서 30 °C가 분리도가 가장 큰 값을 나타내어 30 °C가 최적조건임을 알 수 있었다.

4. 결 론

HPLC를 이용하여 용리방법에 따라 난백을 분석하였다. 등용매 용리에서 ACN/DW/TFA의 조성이 50/50/0.1일 때 난백시료의 분리가 잘 되었다. 이 조성에서 lysozyme, ovalbumin 표준품을 비교하여 크로마토그램의 첫 번째 피크에서 lysozyme, 세 번째 피크에서 ovalbumin을 확인할 수 있었다. 기울기 용리에서는 10/90~60/40의 이동상 구배범위로 20, 30, 40 °C의 온도변화를 준 결과 온도 조건 중 30 °C에서 분리도가 좋았다. 이는 단백질의 활성온도인 35 °C와 비슷하여 적정온도에서 분리가 잘 된 것을 알 수 있다. 30 °C일 때 크로마토그램에서의 표준품 비교에서 첫 번째 피크는 lysozyme, 세 번째 피크가 ovalbumin임을 알 수 있었다.

등용매 용리의 경우 ACN 부피조성이 증가할수록 이동상의 용출력이 커져 용량인자 값이 감소하는 경향을 보였으며 50/50/0.1 이동상 조건에서 분리도가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다. 기울기 용리에서는 온도가 높을수록 이동상의 점성이 줄어들어 따라 용출력이 증가해 그 결과 용량인자 값이 감소함을 알 수 있었으며 온도조건 중 30 °C에서 분리도 값이 가장 크게 나타났다.

두 가지 용리방법에서 lysozyme과 ovalbumin을 확인할 수 있었다. 두 경우 모두 lysozyme 위치의 피크에서는 lysozyme뿐만 아니라 ovomucoid, ovomibitor, ovoglobulins, ovoflavoprotein의 난백 단백질들이 포함된 것을 예상할 수 있었고 ovalbumin은 강한 소수성으로 인하여 크로마토그램의 후반부에 용출됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Yang, J. S. and Oh, B. Y., "Feature of Egg White," *Food Sci. Ind.*, **32**(3), 42-55(1999).
2. Jung, E. J., "A Study on the Allergenicity of Egg Protein," *Kor. J. Food Nutr.*, **11**(2), 228-236(1998).
3. Byun, M. W., Kim, C. J., Kim, M. R., Cho, K. H., Yook, H. S. and Lee, J. W., "Effects of Heat Treatment on the Antigenicity of Gamma-Irradiated Egg White Albumin," *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**(5), 848-853(2001).
4. Byun, M. W., Lee, S. Y., Cho, K. H., Yook, H. S. and Lee, J. W., "The Changes of Allergenic and Antigenic Properties of Egg White Albumin (Gal d 1) by Gamma Irradiation," *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**(3), 500-504(2001).
5. Hong, S. J., Yu, J. H., Kim, B. J., Seo, J. H., Kwon, J. W., Kang,

- M. J., Kim, H. J. and Kim, Y. J., "Effects of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) Vaccination according to Time Point of Administration on Asthma in a Murine Model," *Kor. J. Asthma Allergy Clin. Immunol.*, **30**(4), 307-313(2010).
6. Huh, Y. S., Kim, H. W. and Kim, I. H., "Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**(2), 122-126(2003).
7. Lee, S. H., Cho, C. H., Ahn, Y. K. and Lee, J. S., "Characteristics of the Egg White Lysozymes from Ogor Fowl and Fowl for the Lysis of an Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11," *Kor. J. Food Nutr.*, **9**(4), 447-451(1996).
8. Yu, I. J., Lee, S. K., Kim, K. H. and Min, B. Y., "Effects of Egg White and Ion Exchange Resin Pretreatment on Separation of Egg White Lysozyme," *K. J. Poul. Sci.*, **16**(3), 157-167(1989).
9. Jeon, Y. J., Lee, E. and Kim I. H., "HPLC Study for Egg White Analysis," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **22**(2), 119-122(2007).
10. 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).
11. Abalo, C. A. and Efstathiou, T., "Comparison of Three Liquid Chromatographic Methods for Egg White Protein Analysis," *J. Chromatogr. B.*, **723**, 69-74(1999).