

다양한 HPLC Column에서의 IgY(Immunoglobulin Yolk) 분리특성

송성문 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2012년 1월 25일 접수, 2012년 3월 22일 채택)

Separation Characteristics of IgY (Immunoglobulin Yolk) in Various HPLC Columns

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 2012; accepted 22 March 2012)

요 약

동물 혈청 중의 IgG (Immunoglobulin G)에 해당하는 난황에 포함된 면역 단백질 IgY (Immunoglobulin Yolk)는 식품 단백질로 장내 면역 물질로 중요하다. IgY를 정제하기 위해 신선란의 노른자에 카리지난이나 아라빅검을 전처리 물질로 사용하였다. 전처리 후 FPLC (Fast Protein Liquid chromatography)의 DEAE (Diethylaminoethyl) Sepharose 칼럼에서 이온교환법에 의해 불순물을 제거하여 IgY를 얻고, GF HPLC (Gel Filtration High Performance Liquid Chromatography)로 IgY의 분자량을 측정하고 표준 IgY와 비교하여 IgY 단백질을 동정하였다. GF HPLC에서 IgY의 다양성을 발견하였고 IgY 단백질 군의 다양성을 IE HPLC (Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography)에서 AX, CX, SCX 칼럼을 사용하여 pH, NaCl 농도를 바꾸어 조사하였다. AX를 사용하여 0.5 M NaCl, pH=8 조건에서 3개의 IgY 피크를 분리하였고, SCX를 이용했을 때 0.5M NaCl, pH=5 조건에서도 3개의 IgY 피크를 분리할 수 있었다.

Abstract – IgY (Immunoglobulin Yolk) in egg yolk corresponds to IgG (Immunoglobulin G) in animal serum and plays an important role as immunological proteins in intestines. Carrageenan and Arabic gum were used as pretreatment agents to purify IgY from fresh egg yolk. DEAE (Diethylaminoethyl) Sepharose column in FPLC (Fast Protein Liquid chromatography) was an ion exchange tool to remove contaminants as well as to elute IgY from the column. GF HPLC (Gel Filtration High Performance Liquid Chromatography) enables to measure the molecular weights of IgY and to identify the purified IgY by comparing the molecular weight of standard IgY with the purified one. IgY is a heterogeneous group of different molecular weight and ionic properties, which was investigated with various IE HPLC (Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography) columns such as AX, CX and SCX. Three peaks of IgY were separated in the AX column under the conditions of 0.5 M NaCl and pH=8. The SCX column also gave the three peaks of IgY at 0.5 M NaCl and pH=5.

Key words: FPLC Chromatography, HPLC Chromatography, IgY (Immunoglobulin Y)

1. 서 론

난황 중의 항체는 포유류의 IgG 계통의 항체에 해당되고 물리화학적 성질이 약간 다르며, 난황유래의 항체이므로 비교 면역학 분야에서는 IgY (Immunoglobulin Y)라 부른다[1]. IgY 단백질의 분자량은 180,000 Da이고, 등전점(pI) 범위는 6.5~7.5이다[2]. 계란의 난황은 α -livetins, β -livetins, γ -livetins 이라는 수용성 단백질과 인지질 성분(LDL, HDL)으로 구성되어 있는데, 이 중 γ -livetins은 분자량 64 KDa인 heavy chain과 분자량 28 KDa의 light chain으로 이루어져 있고

[3]. IgG보다 등전점이 산성에 가까우며 닭의 혈액에서 분리한 IgG와 같은 전기 영동 경향을 보인다[4].

난황 중의 IgY 함량은 ml 당 9~25 mg으로 동량의 혈청 중의 IgG 함량과 유사하며[5], 난 1개 당 15 ml의 난황이 분리되고, 닭 마리 당 IgY의 연간 생산량은 40 g 정도 된다[6]. 일반적으로 토끼의 혈액 1 ml에서 얻을 수 있는 항체의 양이 8~12 mg인데 반하여 달걀 1개에서 얻을 수 있는 항체의 양은 60~200 mg이며 이중에서 특이 항체는 10~20% 정도 존재한다고 알려져 있다. 이에 따라 고면역성의 항원들에 대해 한 마리의 닭은 1년 기간 동안 120 마리의 토끼에 상응하는 생산을 한다[7].

항혈청 생산에 이용되는 동물 중에 닭은 소량의 항원으로도 양질의 항체 생산이 가능하며 어미 닭에서 생성된 항체는 난황에도 전달이

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

[‡]이 논문은 KAIST 후원회 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

된다[8]. 산란계 마리 당 난황으로부터 생산되는 항체(Specific IgY)의 생산량은 초유나 혈청의 경우보다 상대적으로 많고, 포유류의 혈청에서 얻은 항체에 비해 생산비가 저렴하게 많은 항체를 생산할 수 있으며, 사육관리와 계란생산이 용이하기 때문에 난황을 이용한 항체생산은 기술적 및 양적 측면에서 많은 이점을 갖고 있다[9]. 또한 난황 항체 IgY는 포유동물과의 계통학적 차이로 인해 포유류의 IgG와 교차반응을 하지 않아[10], 생화학적 또는 임상시약으로 개발 활용하는데 좋은 이점을 갖추고 있으며, 포유 동물을 면역시켜서 피를 채혈하거나 도살하지 않아도 되므로 사용된 많은 동물들을 상당히 줄일 수 있는 등 많은 장점이 있다[11]. 이처럼 난황은 항체생산 재원으로써 편이성과 경제성 측면에서 좋은 점이 인정되고 있고, 특히 항체의 생성 가능성과 생산량 및 효율적인 분리 정제 방법의 개발에 초점을 두고 연구개발을 진행해왔으며, 특정 항원에 대해서는 상당한 연구성과를 거두고 있다[12]. 효율적인 분리 방법으로는 이온교환 크로마토그래피와 겔 여과 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피 등의 방법이 이용되고 있다[13].

본 연구에서는 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)에서 IgY 시료를 분취하여 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)로 IgY를 분석하였다. FPLC에서 DEAE Sepharose gel 칼럼을 사용하여 IgY 단백질을 분리하였으며, 분리한 분획물 들을 모아 겔 여과 HPLC (Gel filtration, GF)로 난황 내 IgY의 분자량을 측정하였고, 이온 교환(Ion Exchange, IE) HPLC로 음이온 교환 칼럼(AX), 양이온 교환 칼럼(CX), 양이온 교환 칼럼(SCX)으로 분석하여 난황 내 IgY의 이온 분리 특성을 연구하였다. IgY는 면역 단백질로 분자량이 다양한 단백질의 집합이고 이온가가 복잡적이므로 GF HPLC와 IE HPLC로 분석하여 단백질 특징을 조사할 필요가 있다. IgG에 대한 보고는 Pharmacia 회사의 핸드북에 잘 설명되어 있으나[14], IgY 단백질 특성에 대한 연구 보고는 적으며 IE HPLC로 IgY의 이온 특성을 IgG와 비교하고자 한다.

2. 실험 재료와 방법

2-1. 시료 전처리

FPLC 주입시료로 난황 분말과 신선란 난황을 전처리하여 사용하였다. 난황 분말(Edentown F&B, Korea)은 증류수 1 L에 난황 분말을 각각 10 g, 15 g을 넣어 용해시켰다. 신선란 난황으로 시판 계란으로부터 난황을 분리하였고, 증류수로 2.5배 희석하여 점도를 감소시켰다. 시료의 pH를 5.0~5.3으로 맞추기 위해 1 N HCl을 첨가하였다. 난황 속 지질 단백질을 침전시키기 위하여 희석된 난황 부피 2배로 첨가물 0.01% carrageenan (Sigma, USA)을 넣고 혼합하여 24시간 동안 냉장보관 하였다. 24시간 자연침전 후, 상등액만 분리해서 15000 rpm으로 3분 간 원심분리하여 FPLC 주입시료를 만들었다.

HPLC 만으로 난황 IgY를 분리할 때의 전처리 방법으로 FPLC 전처리 방법을 사용하였고 침전 첨가물만 Arabic gum powder (Duksan, Korea)로 변경하였다.

2-2. 재료 및 시약

이동상 용매 조제용으로 무수 제일 인산 나트륨(98%, Samchun, Korea), 무수 제이 인산 나트륨(99%, Samchun, Korea), 구연산(99.5%, Duksan, Korea), 구연산 나트륨(99%, Duksan, Korea)을 사용하여 20 mM 인산완충 용액(pH=7, 8)과 20 mM 구연산 완충 용액(pH=4,

5)를 제조하였다. 용출용액 제조용으로 염화 나트륨(99%, Duksan, Korea)을 사용하였다. 분자량 측정용 시약으로 표준품 IgY, thyroglobulin, alcohol dehydrogenase, albumin, carbonic anhydrase를 사용하였다.

2-3. 기기 및 장치

FPLC 실험장치로 시료 주입 펌프(P-50, Pharmacia, USA)와 용리, 완충 용액을 흘리기 위한 펌프(P-500, Pharmacia, USA)를 사용하였고, 이 펌프를 liquid chromatography controller (LCC-500, Pharmacia, USA)로 유량을 조절하였다. 검출기는 UV 검출기(Optical unit UV-1, Pharmacia, USA)를 사용하였으며, 용출 단계에서 fraction collector (Model 2110 Fraction Collector, Bio-red, USA)를 이용해 용액을 모았다. 실험에 사용한 ion exchange chromatography (IEC) 칼럼으로 유리 칼럼(1.6 cm×5 cm, Spectrum, USA)을 사용하였고 음이온 교환 수지로는 DEAE Sepharose CL-6B (Sigma, USA) 겔을 사용하였다.

HPLC 실험장치로는 용매 이송 펌프(222C HPLC pump, SSI)와 UV 검출기(Spectroflow 757, Kratos analytical, Germany)를 사용하였고, HPLC 칼럼으로 AX 칼럼(2.1 mm×33 mm, Inertsil, GL Science, Japan), CX 칼럼(2.1 mm×33 mm, Inertsil, GL Science, Japan), SCX 칼럼(4.6 mm×250 mm, HP Genenchem), gel filtration 칼럼(7.8 mm×300 mm, Bio-rad, USA)을 사용하였다. Auto data module (Younglin, Korea)을 통해서 신호 변환을 거친 뒤, 데이터 수집 프로그램인 Autochro-2000 (Younglin, Korea)을 이용해 크로마토그램을 얻었다.

2-4. 실험 방법

FPLC에서의 ion exchange chromatography (IEC) 실험조건은 Table 1과 같다. IEC 단계는 평형, 샘플 주입, 세척, 용리이며 용리 단계에서 IgY를 얻는다. DEAE Sepharose 칼럼의 이동상은 20 mM 인산 나트륨 완충 용액으로 pH는 7이었고, 1.0 M NaCl을 첨가하여 용출 용액으로 사용하였다. 평형과 세척 유량은 5 ml/min로 하였고, 시료 주입과 용출 유량은 2 ml/min으로 하였으며, 자외선 검출기의 파장은 280 nm로 조정하였다.

HPLC에서의 AX 칼럼의 이동상은 20 mM 인산 나트륨 완충 용액으로 pH는 7, 8이었고, 여기에 0.5, 1.0 M NaCl을 첨가하여 용출 용액으로 사용하였다. CX 칼럼의 이동상은 20 mM 구연산 - 구연산 나트륨 완충 용액으로 pH는 4, 5이었고, 용출 용액으로 0.5, 1.0 M NaCl을 사용하였다. 이 용액이 완전히 섞이게 하기 위해 초음파기(Brason, USA)로 15분 간 혼합시켜준 후, 용액 속의 용존기체 등을 제거하기 위해 다시 한 번 초음파기로 10분 동안 탈기과정을 거쳤다. 펌프의 유량은 컬럼 길이에 따라 길이가 짧은 AX, CX 칼럼은 0.2

Table 1. Experimental conditions of ion exchange chromatography

Resin bed volume	10 ml
Flow rate and time	
equilibration	5 ml/min for 10 min (50ml)
sample loading	2 ml/min for 20min (40ml)
washing	5 ml/min for 15min (75ml)
elution	2 ml/min for 30min (60ml)
Equilibration and washing buffer	20 mM sodium phosphate buffer (pH 7)
Elution buffer	20 mM sodium phosphate buffer (pH 7) with 1.0 M Sodium chloride

ml/min, 길이가 긴 SCX 칼럼은 1 ml/min으로 하였으며, Sample loop로 20 μ l를 사용하였다. Gel filtration 칼럼(7.8 mm \times 300 mm, Bio-rad, USA)의 이동상은 20 mM 인산 나트륨 완충 용액으로 pH는 7 이었고, 유량은 1 ml/min로 하였으며 주입량은 5 μ l로 하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1의 FPLC 크로마토그램은 평형, 시료 주입, 세척, 용리 단계를 거쳐 음이온교환수지에 결합하는 단백질을 분리한 결과이다. 먼저 완충용액 20 mM 인산 나트륨 완충용액(pH 7)으로 평형화시킨 후, 시료를 주입하였다. 주입된 시료는 용출용매인 1 M NaCl에 의해 이온교환 겔에서 떨어져 IgY 단백질의 분리가 이루어졌고 음전하를 띄는 단백질 피크가 나왔다. Fig. 1(A) 크로마토그램은 난황 분말이 10 g 일 때 이고, Fig. 1(B) 크로마토그램은 난황 분말이 15 g일 때를 나타낸다. 각각의 용리 시간은 50.1, 50.4 분으로 같은 시간대에 IgY 피크가 나왔으며, Fig. 1(A), (B)를 비교해 봤을 때 난황 분말이 10 g일 때의 IgY 분획의 흡광도 값은 약 80 mV이고, 난황 분말이 15 g일 때 IgY 분획의 흡광도 값은 약 70 mV였다. 난황 분말의 양에 따라 난황 분말이 15 g일 때가 난황 분말이 10 g일 때 보다 IgY 분획의 흡광도 값이 1.5배 정도 증가되어야 하나 오히려 흡광도 값이 감소하였다. 이는 난황 분말에 포함된 IgY가 이온교환 겔에서의 흡착력이 작아 흡광도가 작은 것으로 생각된다. 난황에 포함된 IgY가 더 많은 신선 난황으로 실험하였으며, 난황 분말과 신선 난황의 농도는 Table 2에 비교하였다.

Fig. 2(A)에서도 Fig. 1과 같이 IgY 단백질의 분리가 이루어졌고 음전하를 띄는 단백질의 피크가 나왔으며, IgY 분획의 흡광도가 약 400 mV로 높게 나온 것을 알 수 있었다. 이 분획들의 채취는 1 분마다 이루어졌으며, IgY의 분자량을 측정하기 위해 단백질 피크가 나타난 50, 51, 52 분 일 때의 샘플들을 모아 GF HPLC를 이용하여 실

Table 2. Comparison of IgY contents in egg yolk

Yolk sample	Concentration
Egg yolk powder (=10 g)	3.3 g/L
Fresh egg yolk	36 g/L

험한 결과 Fig. 2(B)에서 보는 바와 같이 51 분일 때의 피크가 가장 높게 나왔으며, 51 분 분획의 크로마토그램에서 8 분대의 피크와 어깨피크 그리고 10 분대의 피크로 3개의 피크가 있음을 확인하였고, 3개의 피크 중 앞에 나오는 2개의 피크를 IgY 분획으로 가정하여 IgY의 분자량을 측정하였다.

Gel filtration 칼럼에 분자량을 알고 있는 단백질 표준 샘플과 표준 IgY를 주입하였다. 표준 IgY는 구입한 것과 FPLC에서 분리한 것을 둘 다 사용하였다. 표준 샘플로는 0.01 g/ml의 thyroglobulin, alcohol dehydrogenase, albumin, carbonic anhydrase이고 이들 각각의 분자량은 669, 150, 69, 29 kDa이다. 실험결과 단백질 샘플과 표준 IgY의 체류 시간은 Fig. 3(A)에서 보는 바와 같이 thyroglobulin 6.14 분, alcohol dehydrogenase 7.57 분, albumin 7.71 분, carbonic anhydrase 9.85 분, 표준 IgY 6.94 분의 체류시간을 갖는 것으로 나타났다. 분자의 크기에 따라 겔의 기공 속에 들어갈 수 없는 큰 분자는 그대로 통과하고 그보다 작은 분자는 크기에 따라서 겔의 내부에 들어감에 따라 용출이 늦게 되는 GFC 원리에 의해 분자량이 큰 thyroglobulin의 체류시간이 가장 빨랐고 그 다음은 표준 IgY, alcohol dehydrogenase, albumin, carbonic anhydrase 순이었다.

Fig. 3(B)에 GFC 실험 결과에 따른 단백질 샘플들과 표준 IgY의 체류시간과 log (M.W) (Molecular Weight)에 따른 회귀곡선을 나타내었다. 단백질 샘플과 표준 IgY의 log (M.W)는 thyroglobulin 2.83, alcohol dehydrogenase 2.18, albumin 1.84, carbonic anhydrase 1.46, IgY 2.5이며 IgY의 분자량은 약 300 kDa으로 추정되었다. IgY의 분자량은 24 kDa, 74 kDa, 109 kDa로 3가지이었고, 모두 합쳐 207 kDa

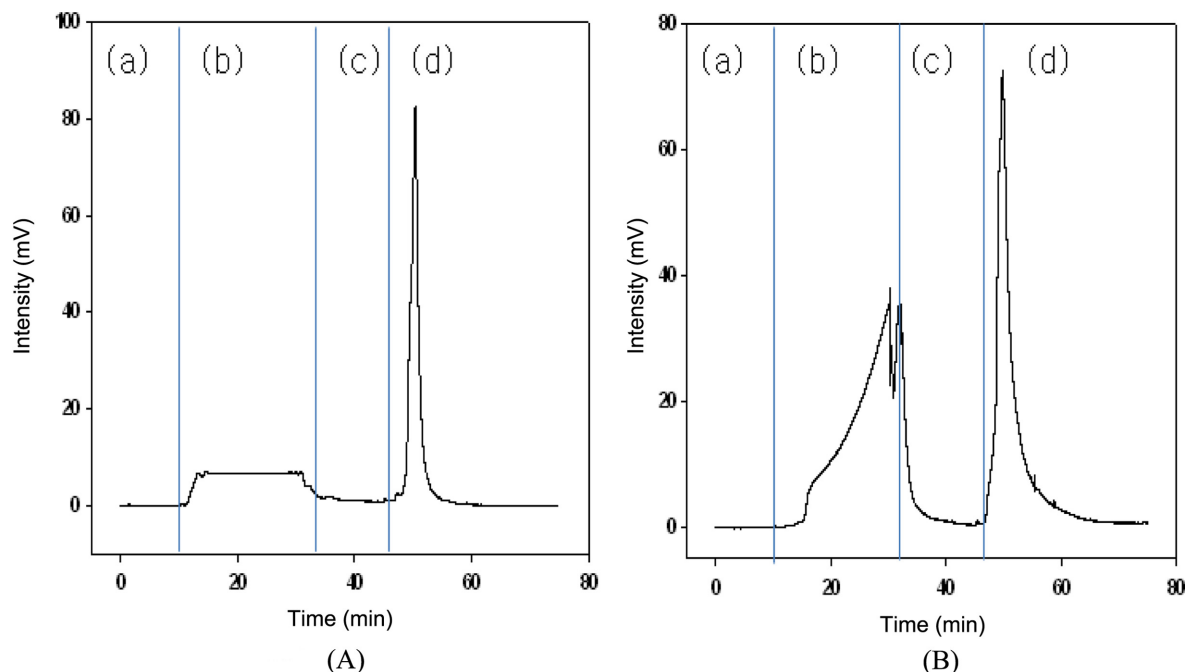


Fig. 1. Ion exchange chromatograms of DEAE Sepharose CL-6B FPLC column using egg yolk powder; (A) egg yolk powder=10 g, (B) egg yolk powder=15 g, IEC steps : (a) equilibrium (b) loading (c) washing (d) elution.

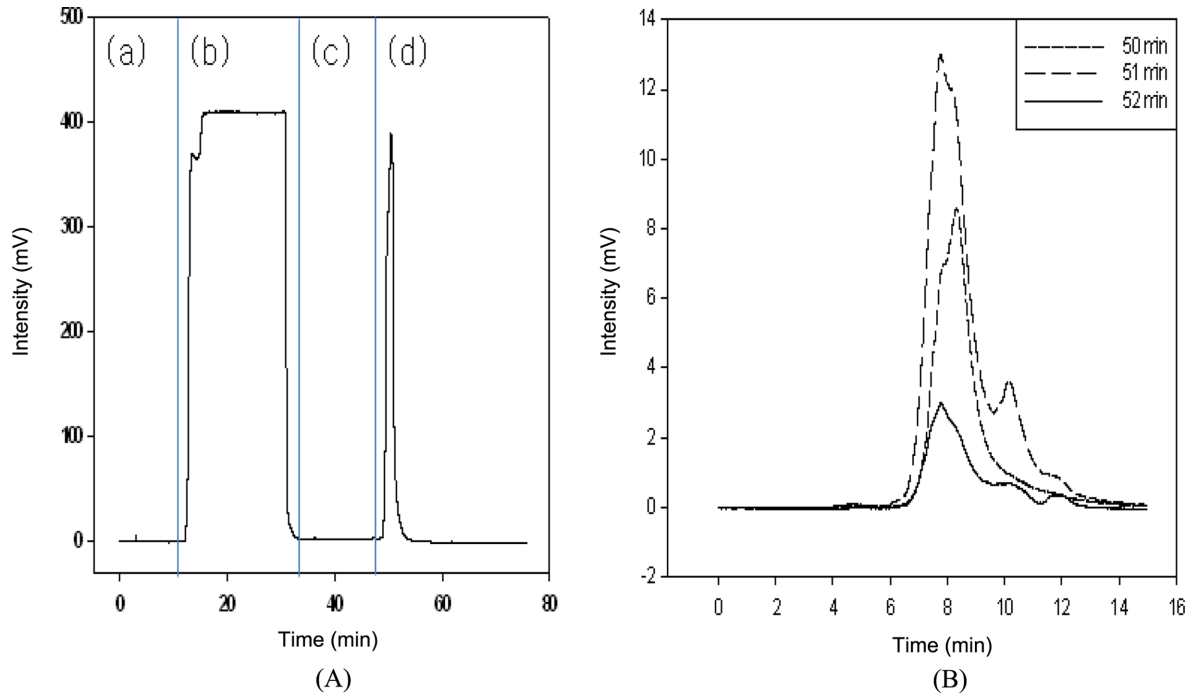


Fig. 2. (A) Ion exchange chromatograms of fresh egg yolk using DEAE Sepharose CL-6B FPLC column; IEC steps: (a) equilibrium (b) loading (c) washing (d) elution. (B) gel filtration chromatography of collected fractions from FPLC column.

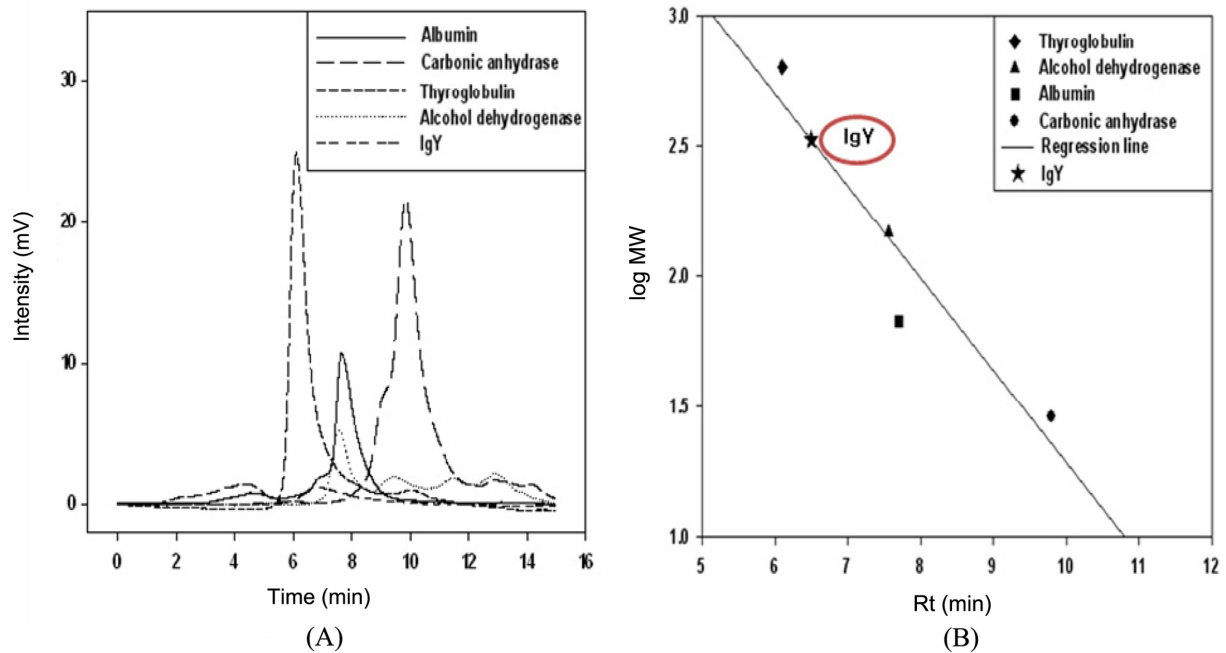


Fig. 3. Gel filtration chromatograms of standard IgY and protein samples, and regression equation for determining IgY MW.

으로 보고되었으며[15], 본 연구에서 실험한 IgY의 분자량이 더 크게 나왔다. 이는 IgY 단백질이 좀 더 모여 응집된 것으로 생각된다. GF HPLC 실험 결과 Fig. 4(B)에서 2개의 IgY 피크와 1개의 불순물이 존재한다는 걸 알았고, 좀 더 분리도를 증가시키기 위해 IE HPLC에서 실험하였다.

Fig. 4(A)는 AX 칼럼을 이용하여 이동상이 pH 7일 때의 NaCl 농도 변화에 따른 결과이며, Fig. 4(B)는 pH 8일 때의 NaCl 농도에 따

른 결과이다. Fig. 4(A)에서 0.5 M NaCl일 때에 불순물 단백질의 체류시간이 2 분대인 것에 비해 1 M NaCl에서는 불순물 단백질이 IgY 피크 뒷부분에 겹쳐서 나온 것으로 생각되어진다. Fig. 4(B)에서도 같은 결과이며, pH 8일 때에 불순물 단백질의 피크가 IgY 피크 보다 더 높다. pH가 클수록 등전점이 작은 불순물 단백질이 IgY 보다 IE gel에 더 많이 흡착 되었다고 보여진다. 난황 수용성 단백질은 3개의 subgroup (α -livetins, β -livetins, γ -livetins)으로 분리 되는데[16], 0.5 M

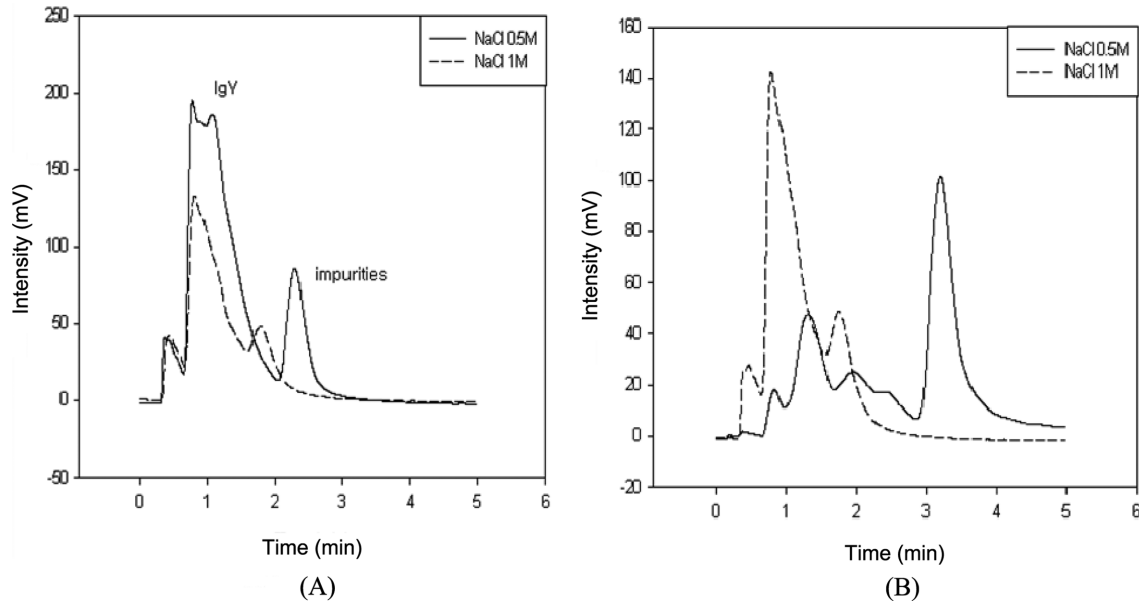


Fig. 4. Comparison of chromatograms according to NaCl concentration by using AX column; flow rate=0.2 ml/min, (A) pH=7, (B) pH=8.

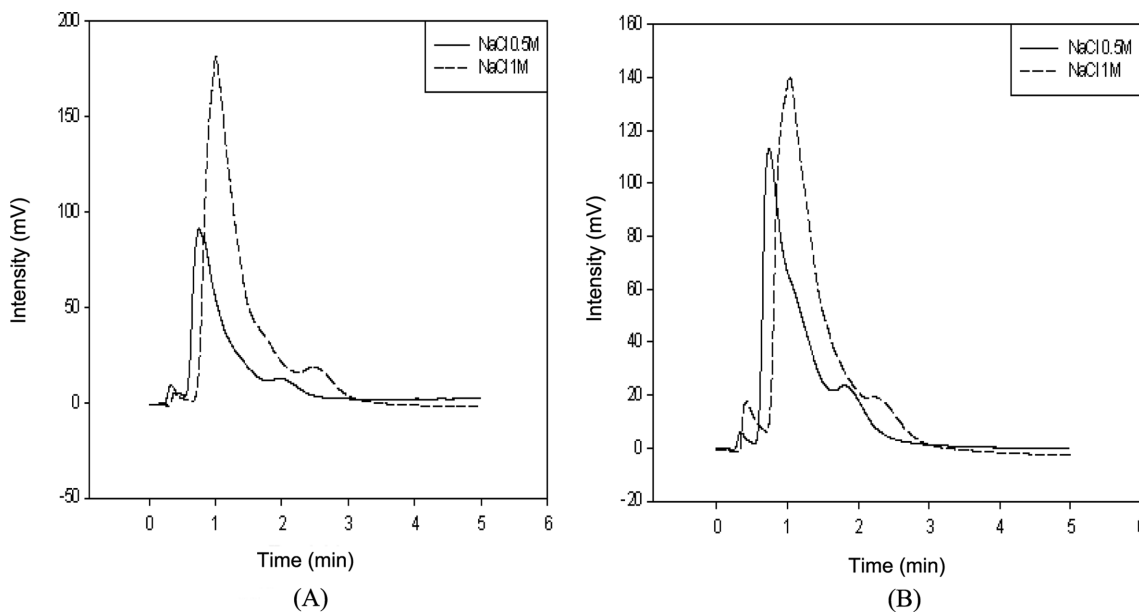


Fig. 5. Comparison of chromatograms according to NaCl concentration by using CX column; flow rate=0.2 ml/min, (A) pH=4, (B) pH=5.

NaCl의 크로마토그램에서 피크가 3개로 분리된 것을 볼 수 있고, 1 M NaCl일 때 보다 0.5 M NaCl일 때 피크 분리와 분리도 증가에 유리함을 알 수 있었다.

불순물 제거에 유리하다고 보고된 연구에 따라[14], CX 칼럼을 사용하여 크로마토그램의 마지막에 나온 불순물 피크의 크기를 줄이도록 실험했다. Fig. 5에서 불순물 제거에 효과적임을 확인하였으나 분리도가 높게 분리되지는 않았다. IgY의 등전점(pI) 값에 가까운 pH 5에서 NaCl 농도 변화에 따른 크로마토그램의 흡광도 차이가 작으나, pH 4에서는 IgY 흡착력이 NaCl 농도 변화에 따라 변하여 흡광도의 차이가 크게 나타났다. NaCl 농도가 클수록 IgY가 칼럼의 고정상에 잘 흡착되는데, 이는 IgY가 높은 이온 농도에서 즉 소수성이 강한 상태에서 고정상에 잘 흡착되는 것으로 사료되며, IgG의 분리

에서 소수성 크로마토그래피를 이용하여 혈청 내의 친수성 불순물 단백질을 제거한 보고가 있다[14].

다른 양이온 IE HPLC에서 IgY를 분리 실험하기 위해 길이가 긴 SCX 칼럼을 사용하였다. 칼럼의 길이가 길면 분리도가 증가하고 체류 시간이 길어지기 때문에 유량을 1 ml/min으로 증가시켰다. Fig. 6의 SCX 크로마토그램은 AX 칼럼의 크로마토그램과 같이 IgY 피크가 3개로 분리되었고, 길이가 긴 SCX 칼럼의 크로마토그램의 분리도가 CX 보다 좋을 수 있었으며, pH 5의 크로마토그램이 pH 4의 크로마토그램 보다 피크가 명확히 나타났다. CX 칼럼의 크로마토그램에서 나타난 NaCl의 소수성 효과가 SCX 칼럼 pH 5에서는 나타나지 않았고, pH 4에서 NaCl 농도가 증가하면 IgY 흡착력이 낮게 나타났다. 이는 CX HPLC 칼럼의 관능기는 약한 양이온 교환기

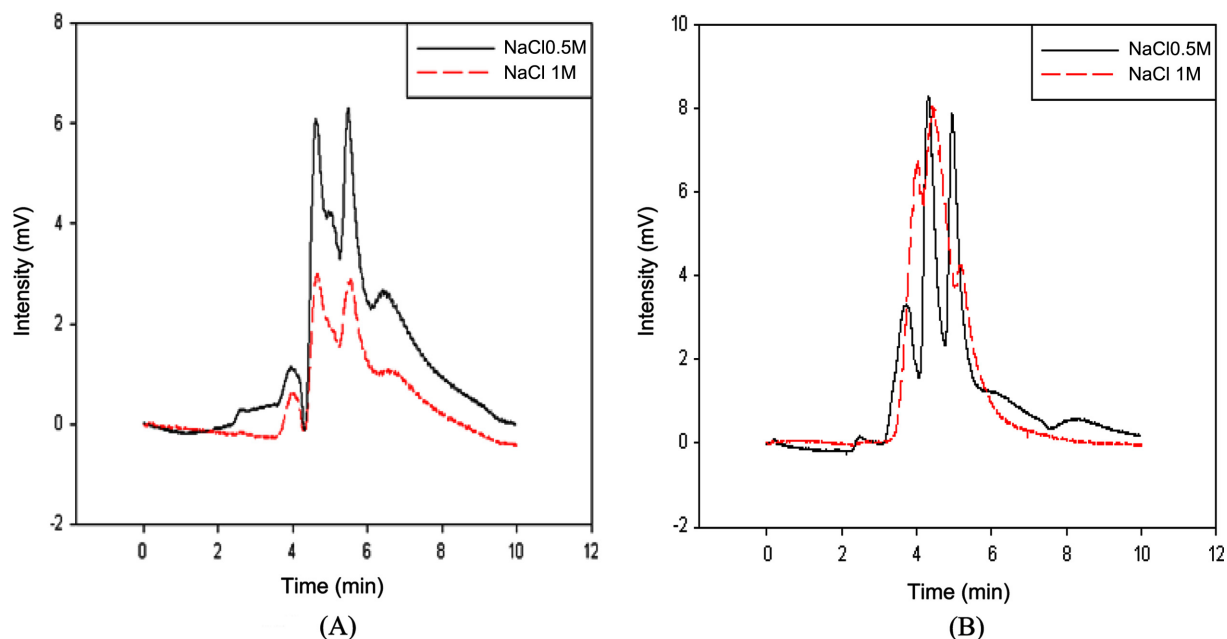


Fig. 6. Comparison of chromatograms according to NaCl concentration by using SCX column; flow rate=1 ml/min, (A) pH=4, (B) pH=5.

propyl benzenesulfone 기를 갖고 있고 SCX HPLC 칼럼은 강한 양이온 교환기를 가지고 있으므로 소수기의 영향이 이온기의 영향보다 작아져서 SCX 칼럼에서 NaCl의 농도가 높아질 때 IgY의 고정상 흡착력이 낮아진 것으로 보인다. 또한 Fig. 6(B)와는 달리 Fig. 6(A)에서 피크끼리 서로 붙어서 나오는 것을 볼 수가 있는데, 이는 IgY의 등전점인 7근처에서 멀어질수록 전하량이 더 커지므로 pH 4일 때가 5일 때보다 전하량이 더 커서 강하게 흡착되어 있다가 탈착이 되기 때문에 IgY 분자들의 분리도가 떨어진 것으로 생각된다.

4. 결 론

난황에 존재하는 IgY의 분자량과 이온특성을 알아보기 위하여 FPLC에서 시료를 분취하여 IEC, GFC로 분자량을 조사하였다. GF HPLC로 0.01 g/ml 표준 샘플인 thyroglobulin, alcohol dehydrogenase, albumin, carbonic anhydrase의 체류시간과 분자량을 표준 IgY와 비교하였다. 실험 결과 IgY의 분자량은 300 kDa이었다. HPLC 칼럼인 AX 칼럼, CX 칼럼 그리고 컬럼 길이가 긴 SCX 칼럼으로 이동상의 pH와 NaCl의 농도에 따른 이온특성을 연구하였다. AX 칼럼에서 pH 7일 때 보다 pH 8일 때에 불순물 단백질이 gel에 더 많이 흡착되며, 0.5 M NaCl일 때 피크의 분리도가 우수하였다. CX 칼럼은 불순물 제거에 효과적이었으나 분리도가 떨어졌다. AX 칼럼보다 SCX 칼럼에서 피크의 분리도가 더 좋았으며 pH 4일 때 보다 pH 5의 크로마토그램이 명확히 나타났으며, CX 칼럼에서 NaCl의 영향이 pH 5에 서는 작게 나타났다.

감 사

이 연구는 연구재단 기초 연구과제에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, K., Ametani, A., Shimizu, M., Hatta, H., Yamamoto, T. and Kaminogawa, S., "Production and Characterization of Anti-Human Insulin Antibodies in the Hen's Egg," *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2141-2143(1991).
2. Lim, S., Manus, H. P., Gooley, A. A., Williams, K. L. and Rylatt, D. B., "Purification of Monoclonal Antibodies from Ascitic Fluid using Preparative Electrophoresis," *J. Chromatogr.*, **827**, 329-335 (1998).
3. Shim, W. B., Kim, H. J., Park, S. J., Kang, D. H., Kang, J. S. and Chung, D. H., "Production and Specificity of Immunoglobulin Yolk (IgY) on *Vibrio Parahaemolyticus*," *J. Food Hyg. Safety*, **18**(2), 61-66(2003).
4. Shimizu, M., Robert, C., Fitzsimmons and Nakai, S., "Anti-E. Coli Immunoglobulin Y Isolated from Egg Yolk of Immunized Chickens as a Potential Food Ingredient," *J. Food Sci.*, **53**, 1360-1366(1988).
5. Wang, K., Hoppe, C. A., Datta, P. K., Fogelstrom, A. and Lee, Y. C., "Identification of the Major Mannose-Binding Proteins from Chicken Egg Yolk and Chicken Serum as Immunoglobulins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 9670-9674(1986).
6. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T., "A Novel Isolation Method for Hen Egg Yolk Antibody, "IgY"," *Agric. Biol. Chem.*, **54**(10), 2531-2535(1990).
7. Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T., "Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG," *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(3), 450-454(1993).
8. Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J., "Anti body Production and Transfer to Egg Yolk in Chickens," *J. Immunol.*, **89**(1), 272-278(1962).
9. Kim, J. W., "Production of Egg Yolk Antibodies against Flagella

- Antigen of *Salmonella Enteritidis*," *Kor. J. Poult. Sci.*, **25**(4), 161-167(1998).
10. Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D. and Gassmann, M., "Generation and Application of Chicken Egg-Yolk Antibodies," *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **131**(3), 569-574(2002).
 11. Larsson, A., Balow, R., Lindahl, T. L. and Forsberg, P., "Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution - a Review," *Poult. Sci.*, **72**, 1807-1812(1993).
 12. Fichtali, J., Charter, E. A., Lo, K. V. and Nakai, S., "Purification of Antibodies from Industrially Separated Egg Yolk," *J. Food Sci.*, **58**(6), 1282(1993).
 13. Kim, I. H., Lee, Y. T., Lee, C. H. and Chung, B. H., "Purification of Egg Immunoglobulin IgY," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(6), 677-681(1999).
 14. Pharmacia Biotech, "Monoclonal Antibody Purification Handbook," p28(1997).
 15. Takatoshi, I., Motoko, K. and Susumu, A., "Isolation and Characterization of Major Apoproteins from Hen's Egg Yolk Granule," *J. Food. Sci.*, **51**(5), 1115-1117(1986).
 16. Burley, R. W. and Vadehra, D. V., "Chromatographic Separation of Soluble Proteins of Hen's Egg Yolk an Analytical and Preparative Study," *Anal. Biochem.*, **94**, 53-59(1979).