مقاله پژوهشی

طراحی روشی ساده با راندمان بالا برای تخلیص پروتئین‌های عمده سفیده تخم مرغ با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون

شمسی ویسی * ، دکتر علی مصطفائی** ، دکتر زهیر محمد حسن***

دریافت : ۸۶/۵/۲۴ ، پذیرش : ۸۶/۱۲/۱۴

چکیده:

مقدمه و هدف: سفیده‌ی تخم مرغ حاوی چهار پروتئین پرمقدار است که استفاده‌های متعددی دارند. در مطالعه‌ی حاضر روشی ساده و مناسب برای تخلیص این پروتئین‌ها بر پایه‌ی کروماتوگرافی تعویض یون طراحی و اجرا گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی سفیده با تغییر pH از مواد نامحلول جدا گردید. عصاره‌ی حاصل طی دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یون به ترتیب در ستون‌های کربوکسی متیل سفارز و دی اتیل آمینو اتیل سفارز تفکیک گردید. خلوص و بازدهی هر پروتئین با کمک الکترفورز و تعیین درصد آن نسبت به پروتئین تام نیز تعیین گردید.

نتایج: این پژوهش نشان داد که خلوص اوآلبومین، اوترانسفرین، اوموکوئید و لیزوزیم به ترتیب ۹۷، ۹۷، ۸۵ و بیش از ۹۹ درصد و بازدهی آنها به ترتیب ۹۸، ۹۸، ۹۵ و ۹۹ درصد می‌باشد.

نتیجه نهائی: بازدهی و خلوص بالا، تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم یا زیاد از نکات مثبت این روش محسوب می شود.

کلید واژه ها : تخلیص / سفیده تخم مرغ / کروماتوگرافی تعویض یون

مقدمه :

حدود ده درصد وزن سفیده‌ی تخم مرغ را پروتئین تشکیل می دهد. اوآلبومین، اوترانسفرین، اوموکوئید و لیزوزیم چهار پروتئین پرمقدار سفیده هستند که بالغ بر ۹۰ درصد محتوای پروتئینی آن را به خود اختصاص می دهند (۱).

اوآلبومین بیش از نیمی (۵۴٪) از محتوای پروتئینی سفیده را تشکیل می‌دهد و مسئول بخش عمده‌ی ویژگی‌های عمومی سفیده است. وزن این پروتئین تک‌واحدی ۴۴/۵ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک (pI) آن ۴/۵ است. اوآلبومین یک پروتئین مرجع محسوب می‌شود، همچنین در زمینه‌ی بیوشیمی به عنوان پروتئین حامل، نگهدارنده، عامل مسدودکننده یا استاندارد، موارد استفاده متعدد دارد (۵-۲).

اوترانسفرین مهم‌ترین پروتئین انتقال دهنده آهن است و حدود ۱۳ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد. وزن این پروتئین ۷۷/۷ کیلودالتون و pI آن ۶/۱ است(۵-۲). اوترانسفرین به عنوان یک افزودنی غذایی در محصولات غنی شده‌ی آهن قابل استفاده است. بعلاوه نشان داده‌اند که این پروتئین حتی بدون حضور آهن در ساختمان خود نیز خاصیت باکتری‌کشی دارد (۶).

اوموکوئید که۱۱ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد، با اسپکتروسکوپی جرمی وزنی معادل ۲۸ کیلودالتون دارد و pI آن ۴/۱ است. در روش SDS-PAGE وزن این پروتئین در محدوده ۴۳-۳۰ کیلودالتون دیده می شود. وزن بالا و متنوع اوموکوئید در روش SDS-PAGE

* کارشناس ارشد گروه بیوشیمی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

** دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه(amostafaie@kums.ac.ir)

*** استاد گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir

ناشی از اتصال کم SDS به این پروتئین به دلیل محتوای بالای کربوهیدرات آن است. بارزترین خصوصیت این پروتئین، قابلیت مهار ترپسین است. طبق گزارش، اوموکوئید مهم‌ترین آلرژن سفیده محسوب می شود (۵-۲).

لیزوزیم با وزن مولکولی ۱۴/۱ کیلودالتون و pI معادل ۱۰/۷ حدود ۳/۵ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد (۵-۲). این پروتئین که یک عامل ضدباکتریایی است، می‌تواند استفاده‌های متنوعی در علوم زیستی، یا در غذا به عنوان افزودنی بی‌ضرر داشته باشد (۷).

با توجه به کاربردهای فراوان پروتئین های پرمقدار سفیده تخم مرغ، روش های متنوعی مبتنی بر رسوب دهی با استفاده از نمک ها و حلال های آلی و انواع کروماتوگرافی، بخصوص کروماتوگرافی تعویض یون برای جداسازی این پروتئین ها بکار رفته است (۱۳-۸، ۵،۲). روش های رسوب دهی به رغم سادگی و سرعت، به تنهایی روش های مطلوبی در بدست آوردن پروتئین های با خلوص و راندمان بالا از سفیده نبوده و معمولاً برای جداسازی یک پروتئین قابل استفاده اند (۸). دراستفاده از روش های کروماتوگرافی نیز معمولاً امکان تخلیص دو یا سه نوع از پروتئین های پرمقدار سفیده با راندمان بالا فراهم شده و در مطالعات معدودی از این روش ها برای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده استفاده شده است (۱۴-۱۲). در چنین مطالعاتی نیز معمولاً درجه‌ی خلوص و راندمان دو پروتئین از پروتئین‌های سفیده مطلوب بوده ولی دسترسی به چهار پروتئین عمده با راندمان و خلوص بالا میسر نشده است. با توجه به اهمیت دست‌یابی به اشکال خالص پروتئین‌های پرمقدار سفیده، در این مطالعه سعی شد، روشی ساده و با بازدهی و خلوص بالا بر پایه کروماتوگرافی تعویض یون برای تخلیص این پروتئین‌ها طراحی و اجرا گردد.

روش کار:

تهیه عصاره‌ی خام سفیده تخم مرغ: در این مطالعه تجربی سفیده‌ی حداقل پنج تخم مرغ مخلوط گردید. یک حجم از سفیده با سه حجم آب نمک(۹ گرم نمک طعام در یک لیتر آب مقطر)حاوی EDTA چهار میلی‌مولار مخلوط شد. مخلوط به مدت نیم ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی بهم‌خورد. سپس pH آن با اسید کلریدریک نیم نرمال به ۴/۵ رسید و نیم ساعت در این شرایط بهم زده شد. مخلوط ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در ۱۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دور ریخته شد و مایع رویی جهت مراحل بعد نگهداری شد.

کروماتوگرافی تعویض کاتیون: کروماتوگرافی تعویض کاتیون در ستونی به ارتفاع ۱۴ و قطر داخلی دو سانتیمتر که با رزین کربوکسی متیل سفارز سی ال ـ۶ بی (فارماسیا) پر شده بود، انجام گرفت. ستون با حداقل ۱۰ حجم بافر تریس ـ HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸ شسته شد تا به تعادل بافری رسید. سپس عصاره‌ی سفیده که یک شب در مقابل بافر تریس دیالیز شده و غلظت پروتئین آن در دامنه ۲۵ـ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تنظیم شده بود، به کمک پمپ پریستالتیک(فارماسیا) با سرعت ۵۰ میلی‌لیتر در ساعت روی ستون برده شد. پس از ورود نمونه، جریان بافر با همان سرعت برقرار گردید و فراکسیون‌ها در حجم ۵ میلی لیتر با کمک دستگاه جمع‌کننده (فارماسیا) جمع‌آوری گردید. پس از اینکه جذب مایع خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به نزدیک صفر رسید، برای جداکردن پروتئین‌های چسبیده به ستون از شیب ۰/۵ ـ ۰ مولار کلرید سدیم در بافر استفاده شد.

کروماتوگرافی تعویض آنیون: کروماتوگرافی تعویض آنیون در ستون حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سفارز (فارماسیا) که طول آن ۱۳ و قطر داخلی آن دو سانتیمتر بود، انجام گرفت. ابتدا این ستون با حداقل ده حجم از بافر تریس-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸، حاوی کلرید سدیم ۳۰ میلی‌مولار شسته شد تا به تعادل بافری رسید. سپس نمونه‌ی پروتئین که در بافر تریس ـ HCl به تعادل رسیده بود، وارد ستون گردید. سرعت جریان بافر در طول آزمایش ۵۰ میلی‌لیتر در ساعت بود. پس از ورود نمونه، جریان بافر در ستون برقرار گردید تا خروجی ستون به صفر رسید (در طول موج ۲۸۰ نانومتر). برای جداسازی پروتئین‌های چسبیده به ستون، ابتدا از شیب خطی ۱۵۰ـ۳۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در بافر و سپس شیب غیر خطی (پله ای) ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در بافر استفاده شد. حجم فراکسیون‌ها در این آزمون ۵ میلی لیتر بود.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): آزمون SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۳ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد به روش لاملی (۱۵) در ولتاژ ۱۵۰ ولت انجام گرفت. برای انجام این کار، چهار حجم نمونه با یک حجم بافر نمونه مخلوط

Archive of SID
www.SID.ir

گردید و پنج دقیقه در ظرف آب جوش قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها و مارکرهای وزنی (فارماسیا) در چاهک‌های جداگانه اضافه و الکتروفورز گردید. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی R350 (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد و وزن مولکولی پروتئین‌ها براساس مارکرهای وزنی تخمین زده شد.

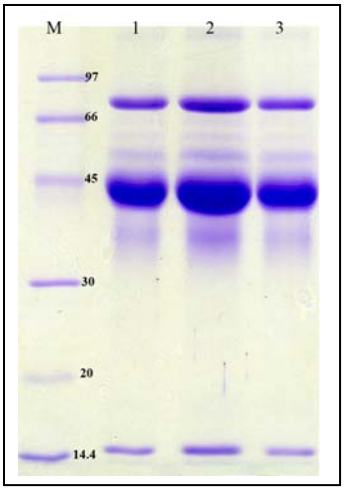
اندازه‌گیری غلظت پروتئین: اندازه‌گیری غلظت پروتئین بر اساس روش UV انجام گرفت (۱۶). برای این کار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر غلظت پروتئین در آنها محاسبه گردید.

(۰/۷۶ × جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر) – (۱/۴۴ × جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر) = (mg/ml) غلظت پروتئین

تعیین درصد خلوص و راندمان (بازدهی): پس از SDS-PAGE هر فراکسیون و رنگ آمیزی ژل، درصد نسبی هر باند پروتئین در ژل رنگ آمیزی شده که بیانگر درصد خلوص بود، با دانسیتومتر (هلنا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. سپس با توجه به پروتئین تام و درصد نسبی هر پروتئین در ژل، مقدار آن پروتئین در هر فراکسیون محاسبه گردید. با مقایسه مقدار هر پروتئین در محصول نهایی و عصاره اولیه، راندمان آن پروتئین تخمین زده شد.

نتایج :

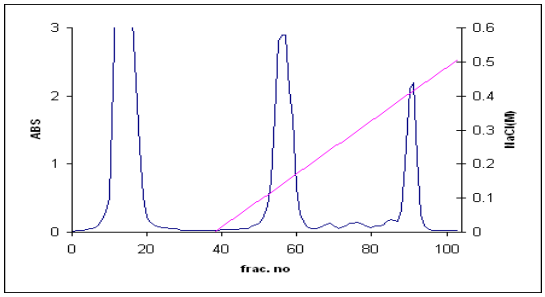
در SDS-PAGE عصاره اولیه سفیده که تحت شرایط pH اسیدی از مواد نامحلول جدا شده‌بود، چهار پروتئین پرمقدار دیده می‌شود (شکل۱).



شکل۱: SDS-PAGE پروتئین‌های سفیده تخم مرغ در غلظت‌های مختلف (ستون‌های ۳-۱). ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

این پروتئین‌ها که فراوانترین آنها اوآلبومین است، حدود ۹۵ درصد محتوای پروتئینی سفیده را تشکیل می‌دهند. رنگ‌پذیری ضعیف اوموکوئید که به‌صورت یک باند منتشره پایین‌تر از اوآلبومین دیده می‌شود، به‌دلیل محتوای بالای کربوهیدرات این پروتئین است که واکنش اتصالی ضعیفی با رنگ کوماسی R350 دارد. اوترانسفرین و لیزوزیم نیز در این الگو به‌ترتیب در بالا و پایین ژل به‌خوبی مشهود هستند.

نتیجه‌ی آزمون کروماتوگرافی تعویض کاتیون پروتئین‌های سفیده در شکل ۲ آمده است.

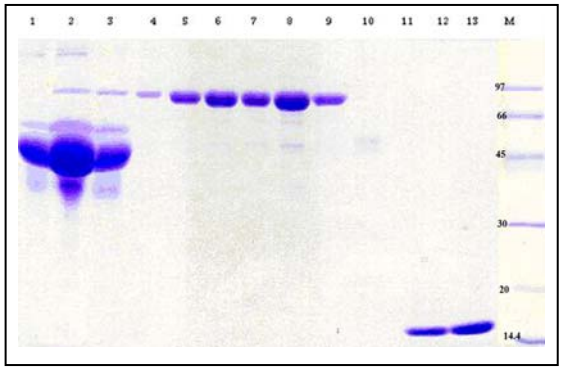


شکل ۲ : کرماتوگرافی تعویض یون پروتئین‌های سفیده در ستون کربوکسی متیل سفارز سی‌ال- ۶ بی

این کروماتوگرام شامل سه قله‌ی عمده پروتئینی کاملاً جدا و چند قله‌ی کم‌مقدار در حدفاصل قله‌های دوم و سوم است. نتایج الکتروفورز فراکسیون‌های مختلف این کروماتوگرام نشان داد که قله‌ی اول که بیش از نیمی از محتوای پروتئینی این کروماتوگرام را تشکیل می دهد، عمدتاً حاوی اوآلبومین و اوموکوئید به ترتیب با اوزان ۴۵ و ۴۰-۳۴ کیلودالتون است (ستون‌های ۳-۱ شکل ۳). در این قله چندین پروتئین کم‌مقدار در موقعیت‌های ۵۸-۵۵، ۸۰-۷۸ و بالاتر از ۱۰۰ کیلودالتون نیز دیده می‌شود. محتوای قله‌ی دوم تقریباً بطور کامل حاوی پروتئین ۷۸ کیلودالتونی اوترانسفرین است که بیش از ۹۷ درصد محتوای پروتئینی این قله را تشکیل می دهد (ستون‌های ۹-۴). در الکتروفورز محتوای این بخش، دو ناخالصی به‌صورت دو باند بسیار ضعیف با اوزان تقریبی۳۵ و ۵۰ کیلودالتون دیده می‌شود. این ناخالصی‌ها کمتر از ۳درصد محتوای پروتئینی این بخش را تشکیل می‌دهند. قله‌ی سوم کروماتوگرافی تعویض کاتیون حاوی لیزوزیم است. خلوص این بخش که در آزمون الکتروفورز به وضوح مشهود است (ستون‌های ۱۲و ۱۳ شکل۳) ، نزدیک به ۱۰۰ درصد تخمین زده شد.

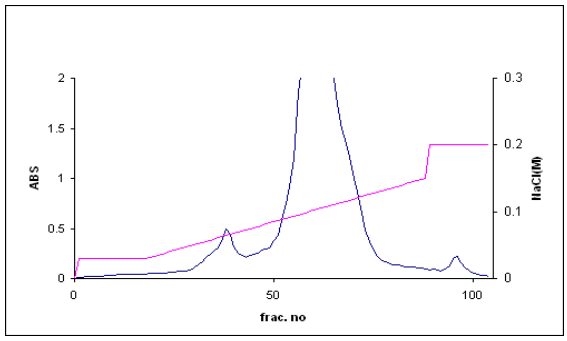
Archive of SID

www.SID.ir



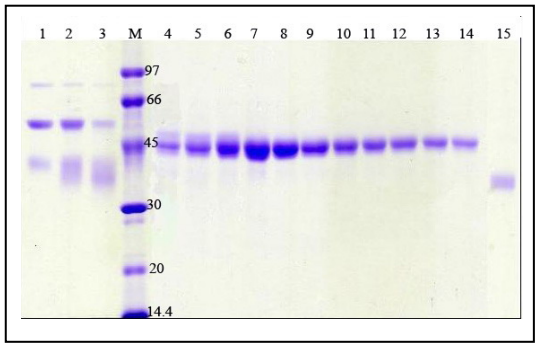
شکل ۳: DS-PAGE فراکسیون‌های تفکیک‌شده سفیده در کروماتوگرافی تعویض کاتیون. ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

برای جداسازی محتوای پروتئینی قله‌ی اول، لوله‌های مربوط به این قله مخلوط و روی ستون کروماتوگرافی تعویض آنیون برده شد. نتایج این مرحله از کروماتوگرافی در شکل۴ آمده است. این کروماتوگرام شامل یک قله‌ی عمده در بخش میانی شیب غلظت نمک طعام و دو قله‌ی کوچکتر، قبل و بعد از قله‌ی عمده می‌باشد.



شکل ۴: کرماتوگرافی تعویض یون محتوای پروتئینی قله اول حاصل از ستون تعویض کاتیون در ستون دی اتیل آمینو اتیل سفارز

الکتروفورز بخش های مختلف این کروماتوگرام نشان داد که قله‌ی اول اوموکوئید نوعa همراه دو پروتئین دیگر با اوزان ۵۸-۵۵ و ۸۰-۷۸ کیلودالتون است (ستون‌های ۳-۱ شکل۵). خلوص اوموکوئیدa در این بخش حدود ۷۰ درصد تخمین زده‌شد. قله‌ی دوم شکل ۴ که بخش عمده این کروماتوگرام را به خود اختصاص میدهد، اوآلبومین با درجه‌ی خلوص بیش از ۹۷ درصد است(ستون‌های ۱۴-۴ شکل۵). ناخالصی این بخش که تنها در چند لوله ابتدایی آن به‌میزان بسیار کم دیده می‌شود، اوموکوئیدa است. قله‌ی انتهایی شکل ۴ که محتوای پروتئین آن کمتر از بقیه بود، حاوی اوموکوئید نوعb است. نتیجه الکتروفورز این بخش حاکی از خلوص بالای این پروتئین و عدم ناخالصی محسوسی در آن است (ستون ۱۵ شکل۵).



شکل۵ : SDS-PAGE فراکسیون‌های تفکیک‌شده سفیده در کروماتوگرافی تعویض آنیون. ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

برآورد راندمان پروتئین‌های عمده‌ی سفیده بعد از تخلیص، با توجه به مقدار هر پروتئین بدست آمده نسبت به مقدار نسبی آن در عصاره اولیه نشان داد که در این مطالعه لیزوزیم، اوترانسفرین، اوآلبومین و اوموکوئید به‌ترتیب با راندمان بالغ بر ۹۹، ۹۸، ۹۸ و ۹۵ درصد (در مجموع هر دو نوع a و b) بدست آمده‌اند.

بحث:

بیش از سه دهه است که کروماتوگرافی تعویض یون به عنوان پراستفاده‌ترین روش تخلیص پروتئین برای جداسازی پروتئین‌های سفیده بکار میرود (۱۷،۱۴-۸، ۵). استفاده از این روش در اغلب مطالعات با هدف تخلیص یک یا دو پروتئین از پروتئین‌های سفیده بوده و در مطالعات معدودی از این روش برای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده استفاده شده است. در چنین مطالعاتی نیز معمولاً درجه‌ی خلوص و راندمان دو پروتئین از پروتئین‌های سفیده مطلوب بوده ولی دسترسی به چهار پروتئین عمده با راندمان و خلوص بالا میسر نشده است (۱۴-۱۲).

در مطالعه حاضر، پس از آزمایشات متعدد برای یافتن شرایط مطلوب از نظر ترتیب نوع ستون تعویض کاتیون و آنیون، نوع و قدرت یونی بافری، شیب کلرید سدیم و شرایط انجام کروماتوگرافی تعویض یون از نظر سرعت

Archive of SID
www.SID.ir

جریان بافر، حجم نمونه و حجم فراکسیون‌ها توانستیم به روشی دو مرحله‌ای با درجه خلوص و راندمان بالا برای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده دست یابیم . نتایج این مطالعه نشان داد که راندمان و درجه خلوص لیزوزیم بدست آمده نزدیک ۱۰۰ درصد است و ناخالصی محسوسی در این محصول دیده نمی‌شود. راندمان اوترانسفرین و اوآلبومین نیز بالغ بر ۹۸ و خلوص آنها به‌ترتیب بیش از ۹۷ و ۹۸ درصد است. اوموکوئید بصورت دو بخش جدا شامل نوعb با خلوص بیش از ۹۸ درصد و نوعa با خلوص نزدیک ۷۰ درصد در مجموع با راندمان نزدیک به ۹۵ درصد بدست آمد. در مقایسه با این مطالعه، واشیر و همکاران نیز با استفاده از رزین کیو ـ سفارز، لیزوزیم، اوترانسفرین و اوآلبومین را از عصاره‌ی سفیده جدا نمودند (۱۰). نتایج مطالعه آنها نشان داد که لیزوزیم به صورت دو قله پروتئینی با درجات خلوص ۸۸ و ۹۹ درصد و راندمان ۶۲ درصد بدست آمده است. اوترانسفرین نیز در این مطالعه با درجه خلوص ۷۵ درصد و راندمان ۹۹ درصد بدست آمد. اوآلبومین نیز به صورت دو قله با درجه خلوص ۵۴ و ۹۹ درصد و راندمان ۹۳ درصد بدست آمد. روی و همکاران نیز در مطالعه‌ای دیگر برای تخلیص این پروتئین‌ها، با عبور دادن عصاره‌ی سفیده از ستون treamline Sp فقط لیزوزیم را بطور خالص بدست آوردند. آنها سپس با استفاده از تری‌کلرو استیک اسید، اوآلبومین را رسوب دادند و اوموکوئید نیز توسط اتانول رسوب داده شد. در این روش اوترانسفرین جدا نگردید (۱۱). در مطالعه ای که در خصوص تخلیص آلرژن‌های سفیده (پروتئین های عمده‌ی سفیده) در ایران انجام گرفته، از تعویض کننده‌ی کاتیونی کربوکسی متیل سفادکس و دو بافر فسفات و بافر استات آمونیوم استفاده شده است (۱۷). نتایج این مطالعه که اصول انجام آن بر پایه مطالعات لانگ لند (۱۲) و رودز و همکاران (۱۳) انجام گرفت، حاکی از تخلیص دو پروتئین اوترانسفرین و اوآلبومین به‌ترتیب در دو بافر فسفات و استات آمونیوم بوده است. در خصوص راندمان و درجه خلوص پروتئین‌های حاصله اطلاعات دقیقی در این مطالعه نیامده است.

بطورکلی نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه در این زمینه نشان می‌دهد که روش طراحی‌شده، روشی ساده و بسیار کارآمد برای تخلیص همزمان چهار پروتئین عمده سفیده تخم مرغ است و در مقیاس کم یا زیاد قابل انجام می‌باشد. راندمان و درجه خلوص بالای محصولات بدست آمده در این روش که ظاهراً در مطالعات دیگر دیده نمی‌شود، از دیگر مزیت‌های این روش محسوب می‌گردد.

نتیجه نهایی :

بطور خلاصه در این مطالعه چهار پروتئین پرمقدار سفیده تخم مرغ طی دو مرحله متوالی کروماتوگرافی تعویض یون با راندمان و خلوص بسیار بالا بدست آمده است. تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم یا زیاد از نکات مثبت این روش محسوب می‌شود. محصولات پروتئینی بدست آمده به اهداف مختلف قابل استفاده هستند.

سپاسگزاری :

وظیفه خود می دانیم از خانم ها مریم چلبی و شهلا کرانی و آقایان امیر کیانی و شهرام پروانه و همچنین سایر همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی که در انجام این مطالعه از مساعدت و همکاری آنها بهره بردیم، مراتب سپاس و تشکر خود را اعلام نماییم.

منابع :

1. Powrie WD, Nakai S. Characteristics of edible fluids of animal origin: eggs. In: Fennema OR (ed). Food chemistry. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1985: 829-55.
2. Awade AC. On egg fractionation: Application of liquid chromatography to the isolation and purification of hen white and egg yolk proteins. Z lebensm Unters Forsch A 1996; 202: 1-14.
3. Ford RPK, Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. Arch Dis Child 1982;57: 649-652.
4. Paulsen K, Hansen TK, Nergard A. Allergen from fish and egg. Allergy 2001; 56 (Suppl 67): 39-42.
5. Li-chan E, Nakai S, Sim J, Bragg DB, Lok V. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. J Food Sci 1986; 51: 1032-1036.
6. Valenti P, Antonin G, VonHunolstein C, Visca P, Orisa N, Antonin E. Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. Int J Tissue React 1983; 1: 97-105.
7. Jonson EA. Egg-white lysozyme as a preservative for use in food. In: Sim JS, nakai S (eds). Egg Uses and processing Technologies, New Development. International Cab. Walling ford 1994: 77-93.
8. Fraenkel-Conrat H, Feeney RE. The metal-binding activity of conalbumin. Arch Biochem 1950; 29: 101-113.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Levison PR, Badger SE, Toom DW, Koscielny ML, Lane L, Butts ET. Economic consideration important in the scale-up of an ovalbumin separation from hen egg-white on the anion exchange cellulose DE92. J Chromatogr 1992; 590(1): 49-58.
10. Vachier MC, Piot M, Awade AC. Isolation of hen egg white lyozyme, ovotransferrin and ovalbumin using a quaternary ammonium bound to a highly cross-linked agarose matrix. J Chromatogr (B) 1995; 664: 201-210.
11. Roy I, Rao MV, Gupta MN. An integrated process for purification of lysozyme, ovalbumin and ovomucoid from Hen Egg White. Appl Biochem Biothecnol 2003;111(1):55-64.
12. Langeland T, Harbitz O. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. Allergy 1983; 38: 131-139.
13. Rhodes MB, Azari PR, Feeney RE. Analysis fraction and purification of egg white proteins with cellulose cation exchanger. J Biol Chem 1958; 23: 239-408.
14. Awade AC, Moreau S, Molle D, Brule G, Maubois JL. Two-step chromatographic procedure foe the purification of hen egg ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. J Chromatogr (A) 1994;677:279-288.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
16. Roe S. Protein Purification Techniques. 2nd ed. Oxford : Oxford university press , 2001: 28-32.
۱۷. دین‌محمدپور فروغه، پزشکی محمد. تفکیک و تخلیص آنتی‌ژنهای سفیده‌ی تخم مرغ. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان، سال هشتم، شماره ۴، ۱۳۸۰: ۱۹-۱۴.

Archive of SID
www.SID.ir