Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017

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 کـه اسـتفاده‌هـای متعـددی دارنـد. در مطالعـه‌ی حـاضر روشـی سـاده و مناسب برای تـخلیص ایـن پـروتئین‌ها بر پایه‌ی کروماتوگرافی تـعویض یون طراحی و اجرا گردید.

روش کـار: در ایـن مطالعـه تجربـی سـفیده بـا تغییـر pH از مـواد نـامحلول جـدا گردیـد. عـصاره‌ی حاصـل طـی دو مرحلـه کروماتوگـرافی تعویض یون به تـرتیب در ستون‌های کربوکسی متیل سفـارز و دی اتیل آمینو اتیل سفارز تفکیک گردید. خلـوص 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 بـالا، تکـرارپـذیری و قابلیـت انجـام در مقیـاس کـم یـا زیـاد از نکـات مثبـت ایـن روش محـسوب می شود.

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

مقدمه :

حدود ده درصد وزن سفیده‌ی تخم مـرغ را پـروتئین تشکیل مـی دهـد. اوآلبـومین، اوترانـسفرین، اوموکوئیـد و لیزوزیم چـهار پروتئین پـرمقدار سفیده هستند کـه بـالغ بر ۹۰ درصد محتوای پروتئینی آن را به خـود اختـصاص می دهند (۱).

اوآلبومین بیش از نیمی (۵۴٪) از محتوای پروتئینـی سـفیده را تـشکیل مـی‌دهـد و مـسئول بخـش عمـده‌ی ویژگـی‌هـای عمـومی سـفیده اسـت. وزن ایـن پـروتئین تک‌واحدی ۴۴/۵ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریـک (pI) آن ۴/۵ است. اوآلبومین یک پروتئین مرجع محسوب می‌شود، همچنین در زمینه‌ی بیوشیمی به عنوان پـروتئین حامـل، نگهدارنده، عامل مسدودکننده یا استاندارد، موارد اسـتفاده متعدد دارد (۵-۲).

اوترانسفرین مهم‌ترین پـروتئین انتقـال دهنـده آهـن است و حدود ۱۳ درصد پروتئین‌هـای سـفیده را تـشکیل می‌دهد. وزن این پروتئین ۷۷/۷ کیلودالتـون و pI آن ۶/۱ است(۵-۲). اوترانسفرین به عنوان یک افزودنـی غـذایی در محصولات غنی شده‌ی آهن قابـل اسـتفاده اسـت. بعـلاوه نشان داده‌اند کـه این پروتئین حتی بدون حضور آهـن در ساختمان خود نیز خاصـیـت باکـتری‌کشی دارد (۶).

اوموکوئیـد کـه۱۱ درصـد پـروتئین‌هـای سـفیده را تشکیل می‌دهد، با اسپکتروسکوپی جرمی وزنی معادل ۲۸ کیلودالتون دارد و pI آن ۴/۱ است. در روش SDS-PAGE وزن این پـروتئین در محـدوده ۴۳-۳۰ کیلودالتـون دیـده 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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017

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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017

گردید و پنج دقیقـه در ظـرف آب جـوش قـرار داده شـد. سـپس ۱۰ میکـرولیتـر از نمونـه‌هـا و مارکرهـای وزنـی (فارماسیا) در چاهـک‌هـای جداگانـه اضـافه و الکتروفـورز گردیـد. پـس از الکتروفـورز، ژل بـا کوماسـی آبـی R350 (فارماسیا) رنگ‌آمیـزی شـد و وزن مولکـولی پـروتئین‌هـا براساس مارکرهای وزنی تخمین زده شد.

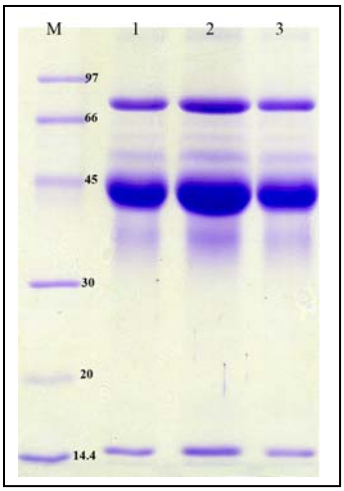
اندازه‌گیری غلظت پروتئین: اندازه‌گیری غلظت پـروتئین بـر اساس روش UV انجام گرفت (۱۶). برای ایـن کـار جـذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیـری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیـر غلظـت پـروتئین در آنهـا محاسبه گردید.

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

تعیین درصد خلوص و رانـدمان (بـازدهی): پـس از SDS-PAGE هر فراکسیون و رنگ آمیزی ژل، درصد نسبی هر باند پروتئین در ژل رنگ آمیزی شـده کـه بیـانگر در صـد 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 پـروتئین در هـر فراکـسیون محاسبه گردید. با مقایسه مقدار هر پـروتئین در محـصول نهایی و عصاره اولیه، راندمان آن پروتئین تخمین زده شد.

نتایج :

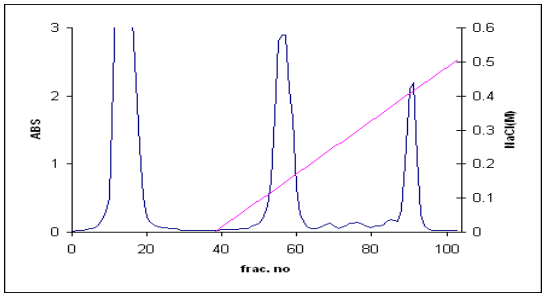
در SDS-PAGE عـصاره اولیـه سـفیده کـه تحـت شرایط pH اسیدی از مواد نامحلول جدا شـده‌بـود، چهـار پروتئین پرمقدار دیده می‌شود (شکل ۱).



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 اسـت، حـدود ۹۵ درصد محتوای پروتئینی سفیده را تشکیل مـی‌دهنـد. رنگ‌پذیری ضعیف اوموکوئید که به‌صورت یک باند منتشره پایین‌تر از اوآلبومین دیده می‌شود، به‌دلیل محتوای بـالای کربوهیدرات این پروتئین است که واکنش اتصالی ضعیفی با رنگ کوماسی R350 دارد. اوترانسفرین و لیزوزیم نیز در این الگو به‌ترتیـب در بـالا و پـایین ژل بـه‌خـوبی مـشهود هستند.

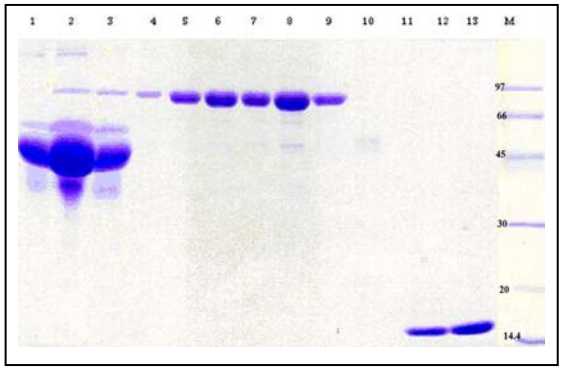
نتیجـه‌ی آزمـون کرومـاتوگرافی تعـویض کـاتیون پروتئین‌های سفیده در شکل ۲ آمده است.



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

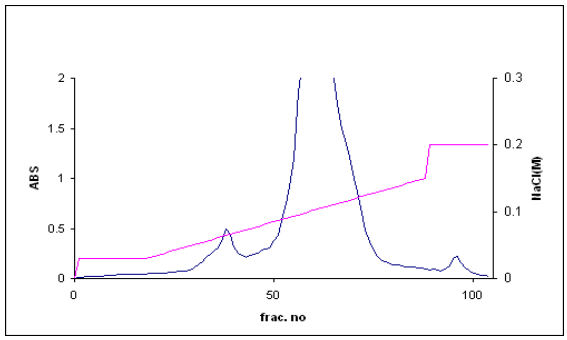
این کروماتوگرام شامل سه قلـه‌ی عمـده پروتئینـی کـاملاً جدا و چند قله‌ی کم‌مقـدار در حـدفاصـل قلـه‌هـای دوم و سوم است. نتایج الکتروفورز فراکـسیون‌هـای مختلـف ایـن کروماتوگرام نشان داد که قله‌ی اول کـه بـیش از نیمـی از محتوای پروتئینی این کروماتوگرام را تـشکیل مـی دهـد، عمدتاً حاوی اوآلبومین و اوموکوئید به ترتیب بـا اوزان ۴۵ و ۴۰-۳۴ کیلودالتـون است (ستون‌های ۳-۱ شکل ۳). در ایـن قلـه چنـدین پـروتئین کـم‌مقـدار در موقعیـت‌هـای ۵۸-۵۵، ۸۰-۷۸ و بالاتر از ۱۰۰ کیلودالتون نیز دیده‌می‌شود. محتوای قله‌ی دوم تقریباً بطور کامل حـاوی پـروتئین 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 ناخالـصی بـه‌صـورت دو باند بسیار ضعیف با اوزان تقریبی۳۵ و ۵۰ کیلودالتون دیده می‌شود. این ناخالصی‌ها کمتر از ۳درصد محتوای پروتئینی این‌بخش را تشکیل می‌دهند. قلـه‌ی سـوم کرومـاتوگرافی تعویض کاتیون حاوی لیزوزیم است. خلوص این بخش کـه در آزمون الکتروفورز به وضوح مشهود اسـت (سـتون‌هـای ۱۲و ۱۳ شکل۳) ، نزدیک به ۱۰۰ درصد تخمین زده شد.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017



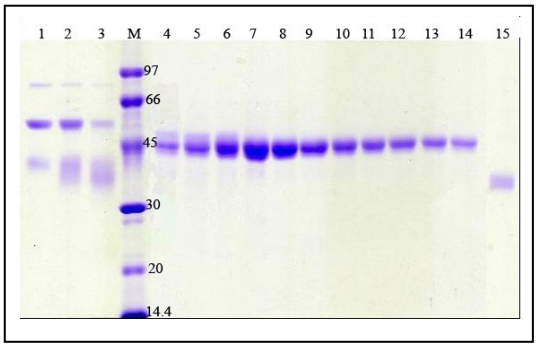
شکل ۳: DS-PAGE فراکسیون‌های تفکیک‌شده سفیده در کروماتوگرافی تعویض کاتیون. ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

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 حدود۷۰ 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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017

جریان بافر، حجم نمونه و حجم فراکسیون‌ها توانستیم بـه روشی دو مرحله‌ای با درجه خلـوص و رانـدمان بـالا بـرای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده دست یابیم . نتـایج این مطالعه نشان داد که راندمان و درجه خلوص لیـزوزیم بدست آمده نزدیک ۱۰۰ درصد است و ناخالصی محسوسی در این محصول دیـده نمـی‌شـود. رانـدمان اوترانـسفرین و اوآلبومین نیز بالغ بر ۹۸ و خلوص آنها بـه‌ترتیـب بـیش از ۹۷ و ۹۸ درصد است. اوموکوئیـد بـصورت دو بخـش جـدا شامل نوعb با خلوص بیش از ۹۸ درصد و نوعa با خلـوص نزدیک ۷۰ درصد در مجمـوع بـا رانـدمان نزدیـک بـه ۹۵ درصد بدست آمـد. در مقایـسه بـا ایـن مطالعـه، واشـیر و همکاران نیز با استفاده از رزین کیـو ـ سفـــارز، لیـزوزیم، اوترانسفرین و اوآلبومین را از عصاره‌ی سفیده جدا نمودنـد (۱۰). نتایج مطالعه آنها نشان داد که لیزوزیم بـه صـورت دو قلـه پروتئینـی بـا درجـات خلـوص ۸۸ و ۹۹ درصـد و راندمان ۶۲ درصد بدست آمده است. اوترانـسفرین نیـز 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 بدسـت آمـد. روی و همکاران نیز در مطالعه‌ای دیگر برای تخلیص این پروتئین‌ها، با عبور دادن عصاره‌ی سفیده از ستون treamline Sp فقـط لیزوزیم را بطـور خـالص بدسـت آوردنـد. آنهـا سـپس بـا استفاده از تری‌کلـرو اسـتیک اسـید، اوآلبـومین را رسـوب دادند و اوموکوئید نیز توسـط اتـانول رسـوب داده شـد. در این روش اوترانسفرین جدا نگردید (۱۱). در مطالعه ای که در خصوص تخلیص آلـرژن‌هـای سـفیده (پـروتئین هـای عمده‌ی سفیده) در ایران انجام گرفته، از تعویض کننـده‌ی کاتیونی کربوکسی متیل سـفادکس و دو بـــافر فـسفات و بافر استات آمونیوم استفاده شـده اسـت (۱۷). نتـایج ایـن مطالعه که اصول انجام آن بر پایه مطالعات لانگ لند (۱۲) و رودز و همکاران (۱۳) انجام گرفت، حاکی از تخلـیص دو پـروتئین اوترانـسفرین و اوآلبـومین بـه‌ترتیـب در دو بـافر فسفات و استات آمونیوم بوده است. در خصوص رانـدمان و درجه خلوص پروتئین‌های حاصله اطلاعات دقیقی در ایـن مطالعه نیامده است.

بطورکلی نتایج مطالعه حاضر در مقایسه بـا مطالعـات مشابه در این زمینه نشان می‌دهد که روش طراحـی‌شـده، روشی ساده و بسیار کارآمد برای تخلـیص همزمـان چهـار پروتئین عمده سفیده تخم مرغ است و در مقیاس کـــم یا زیاد قابل انجام می‌باشد. رانـدمان و درجـه خلـوص بـالای 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 چهـار پـروتئین پرمقـدار سفیده تخم مـرغ طـی دو مرحلـه متـوالی کرومـاتوگرافی تعویض یون با راندمان و خلوص بسیار بـالا بدسـت آمـده است. تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم یا زیـاد 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 شـهلا کرانی و آقایان امیر کیانی و شهرام پروانه و همچنین سایر همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی که در انجام ایـن مطالعه از مساعدت و همکـاری آنهـا بهـره بـردیم، مراتـب 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.

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.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 16:17 +0430 on Tuesday September 19th 2017