



## 양이온 계면활성제로 형성된 역미셀을 이용한 초유 Immunoglobulin G의 분리

노 경 현 · 임 지 영\*  
국민대학교 식품영양학과

### Separation of Immunoglobulin G from Colostrum by Reverse Micelles of Cationic Surfactant

Kyung-Hyun Noh and Jee-Young Imm\*  
Department of Food and Nutrition, Kookmin University

#### Abstract

This study was carried out to separate immunoglobulin G(IgG) from colostrum using reverse micellar extraction of cationic surfactant and to suggest suitable extraction conditions. The reconstituted colostrum powder was solubilized into a reverse micellar phase containing CDAB(cetyldimethylethyl ammonium bromide) by mixing equal volume of the aqueous and organic phase with constant stirring. The solubilization of proteins from the aqueous to the organic phase was manipulated by pH and ionic strength of the aqueous phase and concentration of surfactant in the organic phase. Based on the SDS-PAGE and densitometry, about more than 90% of initial IgG was remained in the aqueous phase after reverse micellar extraction. Although the aqueous phase contained lactoferrin and bovine serum albumin as minor components, about 93% of the total protein was IgG. The efficient extraction was achieved by the reaction of sodium phosphate buffer(pH 8) containing 50 mM KCl and organic phase containing 100 mM CDAB. The separation of IgG using reverse micellar extraction was simple, highly efficient and easy to be scaled up.

**Key words :** immunoglobulin G, colostrum, cationic surfactant, reverse micelle

#### 서 론

초유(colostrum)는 새끼의 분만 직후 분비되는 포유동물의 젖으로서 태아의 면역기능과 밀접한 관계가 있는 immunoglobulin을 다량으로 함유하여 기능성 식품 소재로 관심을 모으고 있다. 소의 초유에 존재하는 대표적인 immunoglobulin은 IgG1으로서 분만 초기 48 g/L의 농도로 존재하며 상유에서는 0.6 g/L의 수준으로 감소하는 것으로 알려져 있다(Steijns, 2001). 따라서 초유나 상유의 유청은 immunoglobulin을 얻기 위한 원천으로 이용되고 있으며, immunoglobulin을 분리 정제하기 위한 방법으로는 주로 ion exchange chromatography (Gerberding and Byers, 1998), chelating chro-

matography(Al-Mashikhi, 1988), 고정화된 항체를 이용한 affinity chromatography(Akita and Li-chan, 1998)등의 chromatography 방법이 활용되고 있으며 이온교환수지와 막여과 방법을 조합하여 분리효율을 개선하려는 시도가 진행되어 왔다(Xu et al., 2000).

Chromatography에 의한 immunoglobulin의 분리 방법은 대부분의 경우 황산암모늄이나 에탄올 등에 의한 침전과정을 포함한 복잡한 전처리 과정이 요구되며 단백질의 분리과정에서 시간이 많이 소요되는 단점을 가지고 있다. 또한 대량생산을 위한 분리 방법으로는 적합하지 않은 제약요소 때문에 대량생산에 적합한 분리 방법의 개발은 산업적으로 중요한 의미를 가진다.

역미셀(Reverse micelle)은 유기용매와 같은 비극성 환경에 계면활성제가 존재하는 경우 계면활성제의 극성 부위가 비극성 환경으로부터 배제되어 서로 뭉치고, 비극성 부분은 유기용매층쪽으로 배열됨으로써 자발적으로 생성되는 응집체

\* Corresponding author : Jee-Young Imm, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, 861-1, Chongnung-dong, Songbuk-gu, Seoul 136-702, Korea. Tel: 82-2-910-4772, Fax: 82-2-911-4771, E-mail: jyimm@kookmin.ac.kr

이다. 역미셀 내부의 극성 core는 수용액층을 포함하며 계면활성제로 둘러싸여 외부의 유기용매층으로부터 보호되기 때문에 다양한 효소를 비롯한 생물학적인 활성을 보유하고 있는 물질이 용해되어 있는 경우 활성의 소실 없이 선택적인 추출이 가능하다(Dekker et al., 1989).

역미셀내 단백질의 용해과정은 매우 복잡하기 때문에 역미셀을 이용한 단백질 추출 기작은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 수용액상에 존재하는 단백질이 역미셀내로 용해되기 위해서는 일차적으로 단백질이 가진 전하와 계면활성제의 전하간의 정전기적 인력이 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있으며 단백질의 크기 및 등전점, 역미셀의 크기, 계면활성제의 특성, pH나 이온강도와 같은 단백질 수용액층의 환경이 이질적인 단백질의 선택적 용해과정에 영향을 미친다(Matzke et al., 1992).

역미셀을 이용한 단백질의 분리에 관한 연구의 대부분은 AOT/isooctane계를 이용한 음이온 계면활성제의 활용이 주를 이루고 있으며 국내외에서 lysozyme(Chou and Chiang, 1998),  $\alpha$ -chymotrypsin, pepsin(Chang et al., 1994), bovine serum albumin(노와 강, 2001) 등의 추출공정과 효율이 보고되었다. 한편 양이온 계면활성제의 이용 가능성에 대한 연구는 음이온 계면활성제에 비하여 매우 제한적으로서 김 등(1990)이 양이온 계면활성제의 종류에 따른 단백질의 용해과정을 보고한 바 있다.

역미셀을 이용한 단백질의 추출공정 중 본 연구에서 적용한 상점축법(phase transfer method)은 일반적으로 계면활성제가 포함된 유기용매층과 단백질이 용해된 수용액층의 접촉을 유도하여 단백질층을 용매층으로 이동시킨 후(정추출, forward extraction) 유기용매층의 역미셀내에 포집된 단백질을 과잉의 수용액으로 분리해내는 역추출 과정을 포함하는데 노와 강(2002)은 상점축법을 이용한 단백질 추출법은 많은 양의 단백질 추출이 가능한 반면 비교적 분자량이 큰 단백질의 경우에는 정추출이 용이하지 않다고 보고하였다. 이 같은 보고를 근거로 본 연구에서는 150,000 dalton의 분자량을 가진 immunoglobulin G(IgG)의 분리를 위하여 IgG를 제외한 초유에 존재하는 나머지 단백질을 용매층으로 이동시킨 후 역추출의 과정 없이 수용액에 남아있는 IgG를 회수하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 양이온 계면활성제인 CDAB(cetyltrimethyl ammonium bromide)를 이용하여 초유로부터 IgG의 분리 가능성을 조사하고자 하였으며 IgG의 분리에 적합한 추출 조건의 제시를 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 초유분말은 MG Nutritionals(Austria)의 제품을 사용하였으며 양이온 계면활성제인 cetyltrimethylammonium bromide(CDAB)는 Sigma(USA)사의 제품을, 비극성 용매인 isooctane과 hexanol은 각각 J. B. Baker(USA)와 Acros(USA)사의 제품을 사용하였다. 그 밖의 언급되지 않은 시약은 Sigma사의 분석용 등급 이상의 제품을 사용하였다.

### 초유용액으로부터 IgG의 분리

환원된 초유분말(0.1%, w/v)로부터 IgG의 분리는 역미셀에 의한 단백질 추출방법 중 상점축법을 이용하여 실시하였다(Matzke et al., 1992). 역미셀을 형성하기 위한 수용액상은 KCl(0~200 mM)이 포함된 다양한 조건의 buffer(pH 6~10)에 초유분말을 용해시켰으며 유기용매상은 CDAB(50~200 mM)를 isooctane과 hexanol(1:1)에 녹여 제조하였으며 유기용매상 10 mL에 동량의 수용액상을 첨가하며 교반하여 역미셀의 형성을 유도하였다. 역미셀 형성은 상온에서 30분간 진행하였으며 2800×g에서 5분간 원심분리하여 수용액상을 분리하였다.

### IgG의 분리조건 설정

수용액상의 pH가 IgG의 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50 mM의 KCl이 포함된 다양한 조건의 buffer(pH 6~10)에 초유분말을 용해시키고 50 mM CDAB를 포함한 유기용매상과 혼합하여 역미셀을 형성하였다. pH 조절은 sodium citrate buffer(50 mM, pH 6), sodium phosphate buffer(50 mM, pH 7~8), sodium borate buffer(50 mM, pH 9~10)를 이용하였다. 이온강도의 영향은 IgG의 분리의 최적 pH 조건(pH 8)에서 KCl의 농도(0~200 mM)를 변화시킨 수용액상과 동량의 유기용매상(50 mM CDAB)과 반응시켰으며 회수된 IgG의 상대적 비율을 조사하였다. 계면활성제의 농도가 미치는 영향은 50 mM의 KCl을 함유한 pH 8의 수용액상 조건에서 CDAB 농도(50~200 mM)를 변화시키며 위에 서술한 방법으로 조사하였다.

### 회수된 IgG의 수율 측정

역미셀의 형성 후 원심분리하여 회수된 수용액상으로부터 반응 전후의 IgG 및 기타 단백질 회수율을 조사하였다. 회수율은 반응 전후의 수용액상의 단백질 조성 및 함량의 변화를 비율로서 표현하였으며 단백질 함량변화는 SDS-PAGE 및 Image Analysis System(Kodak ID Analysis, Eastman Kodak Company, USA)으로 각 단백질 band의 강도를 측정하여 회수율을 계산하였다.

### SDS-PAGE 및 image analysis

SDS-PAGE는 Laemmli(1970) 방법에 따라 Mini-PROTEAN

3 Cell(Bio-Rad, USA)을 이용하여 실시하였다. 단백질 분리를 위한 gel의 조성은 4% stacking gel과 12% separating gel을 사용하였으며 분자량 측정을 위한 표준물질로는 SDS-PAGE molecular weight standards broad range marker(Bio-Rad, USA)를 이용하였다. 전기영동의 종료 후 30분간 coomassie brilliant blue로 염색한 후 탈색하였으며 각 band의 강도는 Image Analysis System을 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 수용액상의 pH가 IgG의 분리에 미치는 영향

각 pH에서 반응시킨 후 수용액상에 존재하는 단백질의 조성변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 환원초유의 전기영동 시 lactoferrin(LF), bovine serum albumin(BSA), IgG, casein(CN),  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -LA), casein(CN)의 band가 관찰되었으며 대부분의 초유단백질들은 반응 수용액의 pH가 증가함에 따라 유기용매상으로 이동이 증가하였다. pH에 따른 유기용매상으로의 단백질 용해과정은 단백질의 알짜전하(net charge)와 밀접한 연관을 가지며 pH가 증가함에 따라 양 전하를 가진 단백질들이 음전하를 나타내기 시작하면서 유기용매상의 양이온 계면활성제와 결합하여 역미셀 내부로 이동하게 된다. IgG와 LF를 제외한 주요 단백질들의 등전점(BSA: 4.7,  $\beta$ -LG: 5.2,  $\alpha$ -LA: 4.8, CN: 4.6)은 5.0 부근으로 IgG의 등전점(6.8)과 차이가 존재하며 따라서 유기용매상으로 용해되는 비율의 차이가 나타나는 것으로 생각된다. pH 9와 10의 반응조건에서는 IgG를 제외한 대부분의 단백질이

회수된 수용액상에서 관찰되지 않았으나 BSA와 LF과 같이 반응 전에도 매우 미량으로 존재하는 단백질의 경우에는 용매상으로 이동되는 정확한 비율을 측정하기는 어려운 것으로 판단된다.

역미셀을 이용한 단백질의 추출 시 단백질의 알짜전하 이외에 분자량도 큰 영향을 미치는데 pH 9와 10의 조건에서 IgG의 알짜전하는 음전하를 나타내지만 상당량의 IgG은 유기용매상으로 이동하지 못하고 수용액상에 존재하였다. 김 등(1990)의 보고에 의하면 본 실험과 유사한 양이온 계면활성제인 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)를 이용하여 단백질의 용해과정을 조사한 결과 BSA는 분자량이 작은 lysozyme 등의 단백질과는 달리 알짜전하가 음전하를 나타내는 경우에도 단백질의 용해는 다른 단백질에 비해 제한적으로 일어났다. 그러므로 분자량이 큰 IgG(150,000Da)의 경우에도 김 등(1990)의 보고와 같이 IgG이 역미셀로 이동하지 못한 것으로 생각된다.

pH 9의 조건에서 수용액상에 존재하는 IgG의 순도는 가장 높았으나 초기시료의 52%만이 회수된 반면 pH 8의 조건에서는 76%의 IgG가 회수되었다. pH 8의 조건에서 IgG외에 BSA와 LF이 남아 있었으나 반응전 함량이 매우 적었으므로 회수된 IgG의 순도에 실제적인 영향을 주지는 않았다. 한편 pH 6에서는 초기시료의 IgG의 함량 중 83%가 회수되었으나 약 46%와 14%에 해당하는  $\beta$ -LG과  $\alpha$ -LA이 회수된 단백질 수용액상에 포함되어 IgG의 선택적 분리를 위한 최적조건으로 적합하지 않았다. 그러므로 IgG의 분리를 위한 초유용액의 pH는 8로 설정하였다.

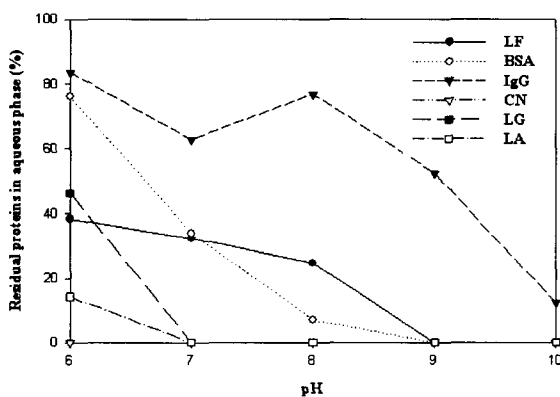


Fig. 1. Proteins remained in the aqueous phase after reverse micellar extraction of the reconstituted colostrum powder at various pHs.

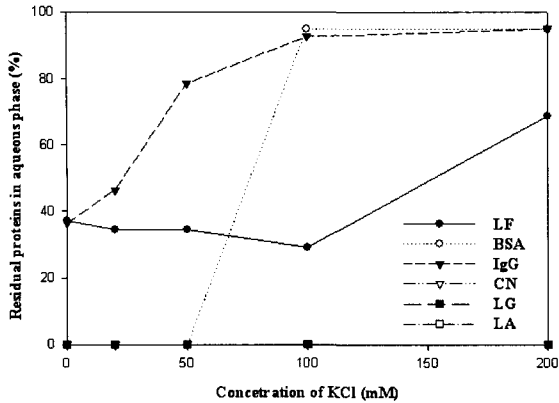
LF: lactoferrin, BSA: bovine serum albumin, IgG: immunoglobulin G, CN: caseins, LG:  $\beta$ -lactoglobulin, LA:  $\alpha$ -lactalbumin.

The extraction was performed with the aqueous phase containing 50 mM KCl at designated pHs and the organic phase containing 50 mM cetyltrimethylammonium bromide(CDAB). The extraction time was 30 min.

### 수용액상의 이온 강도가 IgG의 분리에 미치는 영향

KCl 농도에 따른 IgG 및 기타 초유단백질의 회수율은 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 반응 수용액상의 KCl 농도가 50 mM 이하의 조건(0, 20 mM)에서는 IgG의 회수율이 50% 이하로 매우 낮았으며 KCl 농도의 증가에 따라 IgG의 회수율은 증가하는 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과는 단백질들이 상호간에 분리되지 못한 상태로 유기용매상과 반응하여 대부분의 IgG가 역미셀 내부로 이동하지 못한 채 다른 단백질들과 함께 유기용매상과 수용액상의 계면에 침전하는 응집물(aggregate)을 형성하기 때문인 것으로 생각된다. 실제적으로 수용액상에 KCl이 존재하지 않은 경우 다량의 응집물이 관찰되었으며 응집물의 양은 KCl의 첨가에 따라 현저히 감소하였다.

KCl의 농도가 50 mM에서 100 mM로 증가함에 따라 IgG의 회수율은 78%에서 92%로 증가하였으나 더 이상의 KCl 농도 증가는 IgG의 회수율에 영향을 미치지 않았다. 단백질과 계면활성제간의 정전기적 결합은 이온강도에 의해서 차이를



**Fig. 2. Proteins remained in the aqueous phase after reverse micellar extraction of the reconstituted colostrum powder at various KCl concentrations.**

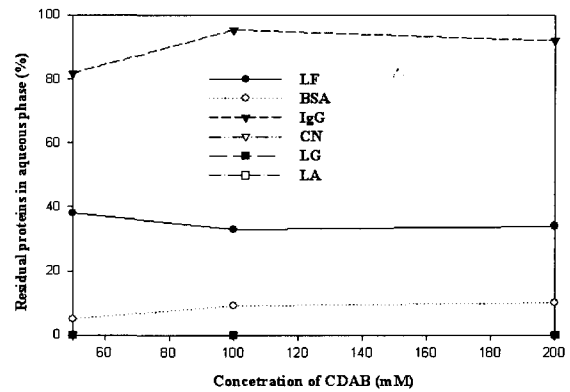
LF: lactoferrin, BSA: bovine serum albumin, IgG: immunoglobulin G, CN: caseins, LG:  $\beta$ -lactoglobulin, LA:  $\alpha$ -lactalbumin. The extraction was performed with the aqueous phase of pH 8 containing designated KCl concentrations and the organic phase containing 50 mM cetyldimethylammonium bromide(CDAB). The extraction time was 30 min.

보이는데 이온강도의 증가에 따라 특정 이온강도까지는 단백질 상호간의 정전기적 인력은 감소하고 계면활성제와 단백질간의 정전기적 결합은 증가하는 electrostatic screening effect를 나타낸다(Nishiki et al., 1993). 그러므로 역미셀 내부로 IgG를 제외한 다른 단백질의 용해가 증가하여 수용액상에 남아있는 IgG의 회수율은 증가하는 것으로 생각된다. 그러나 KCl의 농도가 100 mM 이상의 조건에서는 수용액상에 존재하는 BSA의 함량이 급격히 증가하는 것으로 나타났으며 이러한 현상은 KCl의 농도가 단백질간의 상호작용을 감소시키는 수준 이상으로 존재할 경우 염화이온들이 계면활성제와 결합하여 단백질과 반응할 수 있는 유효한 계면활성제의 전하를 감소시키며 계면활성제의 head group 사이에 반발력이 감소되어 미셀의 크기가 감소하기 때문인 것으로 판단된다.

따라서 낮은 이온강도( $\leq 20$  mM)는 IgG의 회수율을 감소시키며, 높은 이온강도( $\geq 100$  mM)는 IgG의 회수율에 큰 영향을 미치지 않으나 BSA의 역미셀 내로의 용해를 저해하므로 50 mM의 KCl 농도를 IgG의 선택적 분리에 적합한 염의 농도로 설정하였다.

**유기용매상의 계면활성제의 농도가 IgG의 분리에 미치는 영향**

역미셀을 이용한 단백질 추출조건에서 현실적으로 IgG의 분리효율에 변화를 줄 수 있는 요인으로는 앞서 언급한 pH와 이온강도 이외에 계면활성제의 농도를 고려할 수 있다. Fig. 3은 계면활성제의 농도에 따른 IgG의 분리 효율을 측정된 결



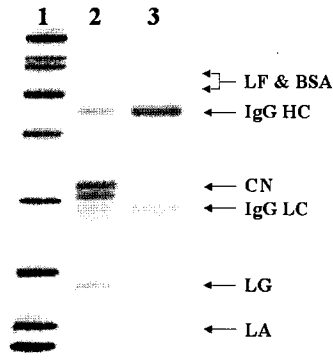
**Fig. 3. Proteins remained in the aqueous phase after reverse micellar extraction of the reconstituted colostrum powder at various CDAB concentrations.**

LF: lactoferrin, BSA: bovine serum albumin, IgG: immunoglobulin G, CN: caseins, LG:  $\beta$ -lactoglobulin, LA:  $\alpha$ -lactalbumin. The extraction was performed with the aqueous phase of pH 8 containing 50 mM KCl and the organic phase containing different concentrations of cetyldimethylammonium bromide(CDAB). The extraction time was 30 min.

과로서 IgG의 분리 효율은 계면활성제의 농도가 100 mM에서 최고에 도달했으며 그 이상의 농도에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. CDAB의 농도가 증가함에 따라 Lf와 BSA는 역미셀로의 용해에 큰 변화를 보이지 않았지만 IgG는 100 mM CDAB에서 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 전 등(2001)의 보고에서와 유사하게 계면활성제 분자들이 역미셀내에 밀집되어 고분자 단백질의 미셀내 용해를 감소시키는 것으로 생각되며 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 역미셀의 크기가 작아지기 때문인 것으로 추측된다.

반응 전 초유와 최적조건(pH 8, 50 mM KCl, 100 mM CDAB)에서 추출 후 회수된 수용액상의 전기영동 사진 및 단백질의 조성을 측정된 결과는 Fig. 4와 5에 제시된 바와 같다. 역미셀 추출 반응 후 수용액상에 존재하는 단백질의 대부분은 IgG였으며 BSA와 LF이 일부 검출되었으나 그 양은 매우 적었다. 반응 전 초유내의 IgG의 함유율은 약 30%였지만 역미셀 분리 후 그 비율이 93%로 증가하였으며 그 외 초유를 구성하는 주요 단백질인 CN(45%),  $\beta$ -LG(10%),  $\alpha$ -LA(5%)은 수용액상에서 유기용매상의 역미셀 내로 이동하여 검출되지 않았다. 한편 반응시간에 따른 IgG의 분리 효율을 측정하였으나 10분 이상의 반응시간에서는 IgG 회수율의 차이는 나타나지 않았다(data not shown).

본 연구에서 제시한 양이온 계면활성제를 이용한 단백질 추출 공정은 간편하고 효율이 높은 방법으로서 높은 상업적 이용 가능성을 가지고 있는 것으로 생각되며 현실적 적용을 위해서는 분리된 IgG 내에 잔존하는 계면활성제의 제거에 대



**Fig. 4. Electrophoregram of reconstituted colostrum powder and the aqueous phase after reverse micellar extraction.** LF: lactoferrin, BSA: bovine serum albumin, IgG HC: immunoglobulin heavy chain, IgG LC: immunoglobulin light chain, CN: caseins, LG:  $\beta$ -lactoglobulin, LA:  $\alpha$ -lactalbumin. (1) Molecular weight standard, (2) reconstituted colostrum powder, (3) the aqueous phase after reverse micellar extraction. The extraction was performed with the aqueous phase of pH 8 containing 50 mM KCl and the organic phase containing 100 mM cetyldimethylammonium bromide(CDAB). The extraction time was 30 min.

한 연구가 보충되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

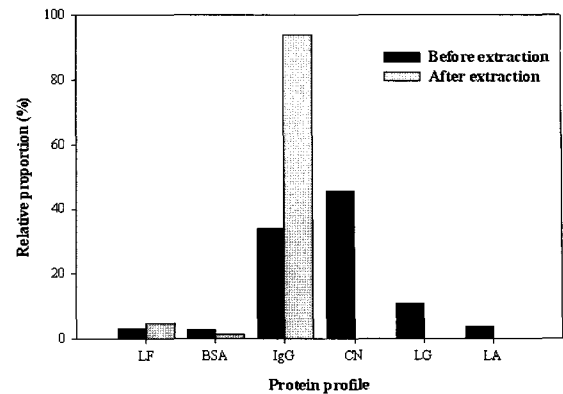
본 연구에서는 역미셀을 이용한 단백질 추출공정에서 적극적으로 활용되지 못했던 양이온 계면활성제에 의한 단백질 추출 가능성을 제시하였으며 초유로부터 IgG의 분리를 위한 반응조건을 조사하였다. IgG의 분리에 적합한 조건은 반응 수용액상의 경우 pH 8, 50 mM KCl이었으며 유기용매상의 계면활성제(CDAB) 농도는 100 mM로 나타났다. 위의 조건에서는 초기시료에 존재하는 IgG의 90% 이상이 회수되었으며 회수된 단백질의 93%가 IgG로 나타났다. 또한 본 연구는 기존의 역미셀을 이용한 일반적인 단백질 추출공정인 정추출 및 역추출공정을 이용하지 않고 정추출 공정만을 이용함으로써 추출과정을 단순화하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 국민대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Akita, E. M. and Li-Chan, E. C. Y. (1998) Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrum and whey using immobilized egg yolk antibodies. *J. Dairy*



**Fig. 5. Protein profile of reconstituted colostrum powder (before extraction) and the aqueous phase after reverse micellar extraction.**

LF: lactoferrin, BSA: bovine serum albumin, IgG: immunoglobulin G, CN: caseins, LG: lactoglobulin, LA:  $\alpha$ -lactalbumin.

The extraction was performed with the aqueous phase of pH 8 containing 50 mM KCl and the organic phase containing 100 mM cetyldimethylammonium bromide(CDAB). The extraction time was 30 min.

*Sci.* **81**, 54-63.

- Al-Mashikhi, S. A., Li-Chan, E., and Nakai, S. (1988) Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *J. Dairy Sci.* **71**, 1747-1755.
- Chang, Q., Liu, H., and Chen, J. (1994) Extraction of lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsin and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water. *Enz. Microb. Technol.* **16**, 970-973.
- Chou, S. T. and Chiang, B. H. (1998) Reversed micellar extraction of hen egg lysozyme. *J. Food Sci.* **63**, 399-402.
- Chun, B. S., Kim, S. K., Yoon, S. O., and Song, S. K. (2001) Mass transfer of lysozyme extraction using reversed micelles. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 241-245.
- Dekker, M., Hilhorst, R., and Laane, C. (1989) Isolating enzymes by reversed micelles. *Anal. Biochem.* **178**, 217-226.
- Gerberding, S. J. and Byers, C. H. (1998) Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *J. Chromat.* **808**, 141-151.
- Kim, Y. S., Rho, Y. T., Shin, H-H., Hong, S. I., and Pyun, Y. R. (1990) Protein solubilization in reverse micelles of cationic surfactant. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**, 215-221.
- Martinek, K., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., Khmelni-tsky, Y. L., and Levashov, A. V. (1989) Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochim. Biophys. Acta*

- 981, 161-172.
10. Matzke, S. F., Creagh, C. A., Hayness, J. M., Prausnitz, J. M., and Blanch, H. W. (1992) Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles. *Biotech. Bioeng.* **40**, 91-102.
11. Nishik, T., Sato, I., Kataoka, T., and Kato, D. (1993) Partitioning behavior and enrichment of proteins with reversed micellar extraction: 1. Forward extraction of proteins from aqueous to reversed micellar phase. *Bio-technol. Bioeng.* **42**, 596-600.
12. Rho, S. G. and Kang, C. H. (2002) Liquid-liquid extraction of BSA using AOT reverse micelles: Effects of pH and salts in forward and backward transfer. *Hwahak Konghak* **40**, 203-208.
13. Rho, S. G. and Kang, C. H. (2001) Solubilization of BSA into AOT reverse micelles using the phase-transfer method: Effect of pH and salts. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 48-53.
14. Stejins, J. M. (2001) Milk ingredients as nutraceuticals. *Int. J. Dairy Tech.* **54**, 81-88.
15. Xu, Y., Sleight, R., Hourigan, J., and Johnson, R. (2000) Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Process Biochem.* **36**, 393-399.
- 
- (2003. 12. 8. 접수 ; 2003. 12. 29. 채택)