

다당류를 이용한 수용성 난황 단백질의 분리

문태화 · 이현중

서울대학교 식품공학과

초록 : 식품첨가물로 허용되어 있는 알긴산나트륨, 알긴산프로필렌글리콜(PGA), 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(CMC), 펙틴 등 4종의 다당류를 이용하여 달걀 노른자의 수용성 단백질을 분리하기 위한 조건을 반응표면 분석법으로 조사하였다. Rotatable hexagon design으로 실험을 계획하여 다당류의 사용농도 5개 수준, 반응 pH 3개 수준에서 상층액 중의 단백질과 지방질 함량을 각각 측정하여 2차 회귀모형을 구하였다. 통계분석 결과 반응 pH가 다당류의 농도보다 난황 단백질-다당류 상호작용에 더 영향을 미치는 요인으로 밝혀졌다. 각 반응도의 contour plot을 작성, 분석하여 수용성 난황 단백질 분리의 조건으로 알긴산나트륨; 농도 0.23~0.25%, pH 5.9~6.0, PGA; 농도 0.15~0.17%, pH 4.3~4.5, CMC; 농도 0.30~0.31%, pH 3.0, 펙틴; 농도 0.09~0.10%, pH 5.6~5.8을 설정하였다(1993년 7월 2일 접수, 1993년 7월 24일 수리).

달걀 노른자는 달걀의 27~32%를 차지하며 32~35%의 지방질과 16% 정도의 단백질을 함유하고 있다. 노른자는 원심분리에 의하여 granule과 plasma로 분리되는데 granule은 α - 및 β -lipovitellin, phosvitin, low density lipoprotein 등으로 이루어져 있으며¹⁾ plasma는 α -, β - 및 γ -livetin과 low density lipoprotein 확분을 함유하고 있다.²⁾ 노른자 지방질의 약 28%를 차지하는 인지지방질의 3/4은 phosphatidyl choline(lecithin)이므로³⁾ 달걀 노른자는 식품산업에서 유화제로 사용되고 있는 crude lecithin의 중요한 원료이다.

산업적으로 달걀 노른자로부터 crude lecithin을 생산하는 데는 유기용매를 사용하므로 노른자에 함유되어 있는 단백질들이 변성되어 천연상태로 회수하기가 어렵다. 따라서 노른자의 지방단백질로부터 인지지방질을 추출하기 전에 수용성 단백질을 먼저 분리하여 활용하기 위한 연구가 이루어져 polyethylene glycol,⁴⁾ sodium dextran sulfate⁵⁾ 등을 사용하여 생리활성을 지닌 γ -livetin을 분리한 결과가 보고된 바 있다. 그러나 polyethylene glycol이나 sodium dextran sulfate는 식품첨가물로 허용되어 있지 않아 식품산업에서는 사용될 수 없다. 식품에 사용할 목적으로 식품첨가물로 허용되어 있는 다당류를 사용한 단백질의 분리에 관한 연구로는 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 추출한 globulin 확분에서 gum arabic과 arabinogalactan을 이용하여 지방질-단백질

복합체를 제거한 연구,⁶⁾ arabinogalactan, gum arabic, pectin 등을 사용한 탈지우유의 단백질 농축,⁷⁾ 알긴산나트륨을 이용한 난황의 지방단백질(lipoprotein)과 수용성 단백질의 분리⁸⁾ 등이 수행되었다.

한편 달걀 단백질 중 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid 등의 흰자 단백질은 유화성이나 거품 형성에 관한 성질 등 그 기능성에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔으나^{9,10)} 노른자에 대하여서는 전체적으로 표면활성이 크다는 것이 알려져 있을 뿐¹¹⁾ 각 구성 단백질의 기능성은 거의 알려져 있지 않다. 따라서 노른자에 함유된 단백질을 그 구조와 조성을 변화시키지 않고 분리하여 특성을 구명함으로써 달걀 노른자의 전체적인 기능성에 어떻게 기여하는지를 평가할 필요가 있다.

그러므로 본 연구에서는 달걀 노른자 중의 수용성 단백질의 이화학적 특성 및 기능적 성질을 규명하기 위한 첫 단계로 우리나라에서 식품첨가물로 허용되어 있는 수종의 다당류를 사용하여 달걀 노른자의 수용성 단백질을 분리하기 위한 조건을 반응표면 분석법으로 조사하였다.

재료 및 방법

재료

달걀은 산란 24시간 이내의 신선한 것을 양계장에서 구입하여 사용하였으며, 알긴산나트륨(sodium alginate)

은 Protan A/S사(Drammen, Norway)의 PROTANAL 764를, 알긴산프로필렌글리콜(propylene glycol alginate; PGA)은 Kelco사(San Diego, U.S.A.)의 MANUCOL ESTER E/RK를, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(sodium carboxymethylcellulose; CMC)는 Metsä-Serla Chemicals사(Skoghall, Sweden)의 CEKOL 150을, 펙틴(pectin)은 Sanofi Bio-Industries(Redon Cedex, France)의 PECTIN "HM 1"을 사용하였다.

달걀 노른자로부터 수용성 단백질의 분리

달걀 노른자를 흰자와 분리한 다음 동량의 증류수를 더하고 Polytron(Kinematica AG, Littau/Luzern, Switzerland)으로 8,000 rpm에서 30초 동안 균질화하였다. 이 희석된 노른자 5 ml에 일정량의 다당류를 녹인 증류수 20 ml를 더한 다음 혼합하고 1 N HCl 또는 1 N NaOH로 pH를 조절하여 실온에서 30분 동안 정치한 후 원심분리(10,000×g, 30분)하였다.

단백질과 지방질의 정량

상층액 중의 단백질 함량은 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)로 단백질을 용해시키는 Lowry방법의 변법¹²⁾을 사용하여 측정하였다. 지방질은 시료의 20배량의 chloroform-methanol(3 : 1)로 추출하고 지방질이 함유된 chloroform층을 분리한 다음 용매를 증발시키고 중량을 측정하여 정량하였다.

실험설계 및 통계분석

수용성 단백질 분리의 최적조건을 설정하기 위하여

rotatable hexagon design¹³⁾을 사용하여 second-order model $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2 + \beta_5X_1X_2 + \epsilon$ 의 parameter β_i 를 추정하였다. 위의 식에서 독립변수 X_1, X_2 는 각각 수용성 단백질을 분리하는 데 사용한 다당류의 농도와 pH이며, 종속변수 Y_1, Y_2 는 각각 상층액의 수용성 단백질과 지방질의 함량을 노른자 중의 총함량에 대한 백분율로 나타낸 반응도이다. 반응표면 분석법에 의한 통계분석은 Statistical Analysis System의 RSREG procedure¹⁴⁾를 사용하였다.

결과 및 고찰

수용성 단백질과 다당류의 상호작용

우리나라에서 식품첨가물로 허용되어 있는 알긴산나트륨, 알긴산프로필렌글리콜, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 및 펙틴 등 4종의 다당류를 사용하여 달걀 노른자로부터 수용성 단백질을 분리하기 위한 최적조건을 설정하기 위하여 단백질과 각 다당류의 상호작용 양상을 조사하였다. 먼저 예비실험에서 반응에 영향을 미치는 주요 환경요인 중 다당류의 농도와 pH를 각각 0.1%와 6.0으로 고정하고 NaCl을 0~0.4 M 범위에서 여러 농도로 첨가하여 이온강도가 수용성 단백질의 분리에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 NaCl의 농도를 증가 시킴에 따라 상층액중의 단백질 함량이 증가하였으나 아울러 지방질의 함량도 급격히 증가하였다.

따라서 이온강도를 제외하고 각 다당류의 농도와 반응 pH가 상층액 중의 수용성 단백질과 지방질 함량에 미치는 영향을 조사함으로써 수용성 단백질을 분리하기

Table 1. Experimental data for sodium alginate

Treatment	Coded variables		Uncoded variables		Responses			
	X ₁	X ₂	Conc. (% W/V)	pH	Y ₁ (mg)	(Protein) %	Y ₂ (mg)	(Lipid) %
1	1	0	0.40	6.0	119	25.2	157	18.3
2	0.5	0.866	0.35	7.0	253	53.6	648	75.5
3	-0.5	0.866	0.25	7.0	247	52.3	646	75.3
4	-1	0	0.20	6.0	97	20.6	33	3.4
5	-0.5	-0.866	0.25	5.0	72	15.3	29	2.1
6	0.5	-0.866	0.35	5.0	73	15.5	19	0.9
7	0	0	0.30	6.0	94	19.9	52	6.1
8	0	0	0.30	6.0	93	19.7	44	5.1
9	0	0	0.30	6.0	94	19.9	43	5.0
10	0	0	0.30	6.0	91	19.3	46	5.4
Egg yolk (2.5 ml)					472	100	858	100

위한 최적조건을 찾기 위하여 rotatable hexagon design을 이용하여 실험을 설계하였다. 각 다당류에 대하여 반응표면의 canonical analysis를 통해 반응도가 최소인 stationary point를 나타내는 조건을 설정하기 위하여 최종적으로 사용한 농도(X_1) 5개 수준, 반응 pH(X_2) 3개 수준과 각 처리조건에서 측정된 상층액의 단백질과 지방질 함량 및 이를 달걀 노른자의 단백질과 지방질 함량에 대한 백분율로 계산한 결과는 Table 1, 2, 3 및 4와 같다. 표에 나타난 바와 같이 최소반응도를 나타내는 조건을 포함하는 다당류의 농도와 반응 pH의 범위는 다당류의 종류에 따라 상이하였으며, 각 조건에서의 반응도의 범위도 다당류의 종류에 따라 상당한 차이를

보였다.

위의 실험 데이터를 분산분석한 결과와 각 다당류에 대한 회귀모형에서의 회귀계수 추정값을 각각 Table 5 및 6에 나타내었다. 이 실험에서 설정한 두 가지 반응도, 즉 상층액 중의 단백질 함량을 백분율로 표시한 값(Y_1)과 지방질 함량을 백분율로 나타낸 값(Y_2)에 대한 분산분석 결과를 보면 4가지 다당류 모두 Y_1 및 Y_2 에 대한 1차 효과(linear effect) 및 2차 효과(quadratic effect)가 유의성이 있었다. 또한 2차 회귀모형에 의해 설명되는 변동(variability)의 기여율을 나타내는 결정계수(coefficient of determination, R^2)도 PGA의 Y_1 에 대한 값 0.878을 제외하고는 모두 0.974 이상의 높은 값을 보여 다당류의

Table 2. Experimental data for propylene glycol alginate

Treatment	Coded variables		Uncoded variables		Responses			
	X_1	X_2	Conc. (% W/V)	pH	Y_1 (mg)	(Protein) (%)	Y_2 (mg)	(Lipid) (%)
1	1	0	0.35	4.5	76	16.1	140	16.3
2	0.5	0.866	0.30	5.0	83	17.6	220	25.6
3	-0.5	0.866	0.20	5.0	89	18.9	136	15.9
4	-1	0	0.15	4.5	65	13.8	36	4.2
5	-0.5	-0.866	0.20	4.0	70	14.8	41	4.7
6	0.5	-0.866	0.30	4.0	54	11.4	38	4.4
7	0	0	0.25	4.5	54	11.4	44	5.1
8	0	0	0.25	4.5	55	11.7	43	5.0
9	0	0	0.25	4.5	57	12.1	37	4.3
10	0	0	0.25	4.5	51	10.8	39	4.6
Egg yolk (2.5 ml)					472	100	858	100

Table 3. Experimental data for sodium carboxymethylcellulose

Treatment	Coded variables		Uncoded variables		Responses			
	X_1	X_2	Conc. (% W/V)	pH	Y_1 (mg)	(Protein) (%)	Y_2 (mg)	(Lipid) (%)
1	1	0	0.36	2.7	78	16.5	148	17.3
2	0.5	0.866	0.34	3.0	36	7.6	39	4.6
3	-0.5	0.866	0.30	3.0	50	10.6	12	1.4
4	-1	0	0.28	2.7	123	26.1	340	39.6
5	-0.5	-0.866	0.30	2.4	169	35.8	587	68.4
6	0.5	-0.866	0.34	2.4	191	40.5	552	64.3
7	0	0	0.32	2.7	82	17.4	163	19.0
8	0	0	0.32	2.7	83	17.6	142	16.6
9	0	0	0.32	2.7	87	18.4	134	15.6
10	0	0	0.32	2.7	81	17.2	166	19.4
Egg yolk (2.5 ml)					472	100	858	100

농도(X_1)와 반응 pH(X_2)가 반응도 Y_1 및 Y_2 에 미치는 영향을 2차 회귀모형으로 설명할 수 있는 것으로 나타났다.

한편 다당류의 사용농도와 반응 pH 사이의 교호작용(interaction)은 다당류의 종류에 따라 상이하게 나타나 알긴산나트륨과 CMC는 모두 각 반응도에 대해서 교호작용을 보이지 않았다. 그러나 PGA와 펙틴은 단백질 함량에 대해서는 농도와 pH 사이의 교호작용이 없었으나 지방질 함량에 대하여는 각각 1% 및 10% 수준에서 유의한 교호작용을 나타내어, 다당류의 농도가 상층액 중 지방질의 함량에 미치는 영향이 반응 pH에 따라 상이한

것으로 해석되었다.

그리고 두 가지 독립변수, 즉 사용 다당류의 농도 및 pH가 반응도에 미치는 전체적인 영향을 각 요인과 관련된 모든 parameter에 대해 검정한 결과(Table 7)를 보면, 다당류의 종류에 따라 실험에 사용한 다당류의 농도가 각 반응도에 미치는 영향의 유의성이 상이함을 알 수 있었다. 즉 알긴산나트륨의 경우 그 사용 농도가 상층액의 단백질 함량(Y_1)에 미치는 영향은 1% 수준에서 유의성이 있었으나 지방질 함량(Y_2)에 미치는 영향은 유의성이 없었던 반면에, PGA는 단백질 함량에 미치는 영향은 유의성이 없었으나 지방질 함량에 미치는 영향은

Table 4. Experimental data for pectin

Treatment	Coded variables		Uncoded variables		Responses			
	X_1	X_2	Conc. (% W/V)	pH	Y_1 (mg)	(Protein) (%)	Y_2 (mg)	(Lipid) (%)
1	1	0	0.10	6.0	106	22.5	49	5.7
2	0.5	0.866	0.08	7.0	128	27.1	208	24.2
3	-0.5	0.866	0.04	7.0	133	28.2	202	23.5
4	-1	0	0.02	6.0	108	22.9	92	10.7
5	-0.5	-0.866	0.04	5.0	97	20.6	29	3.4
6	0.5	-0.866	0.08	5.0	95	20.1	8.8	1.0
7	0	0	0.06	6.0	100	21.2	46	5.4
8	0	0	0.06	6.0	102	21.6	49	5.7
9	0	0	0.06	6.0	97	20.6	48	5.6
10	0	0	0.06	6.0	104	22.3	47	5.5
Egg yolk (2.5 ml)					472	100	858	100

Table 5. Analysis of variance for the response in each polysaccharide-egg yolk protein reaction system

Source	Degree of freedom	Sum of squares							
		Responses							
		Sodium alginate		PGA		CMC		Pectin	
		Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
Model	5	1864.9***	7911.7***	65.4*	510.2***	956.3***	4787.1***	67.2***	596.1***
Linear	2	1419.5***	5530.3***	26.5*	356.5***	869.4***	4185.7***	53.8***	480.1***
Quadratic	2	445.1***	2380.9***	37.8**	128.7***	72.1*	588.1*	13.3**	113.6***
Crossproduct	1	0.3	0.5	1.1	25.0***	14.8	13.3	0.1	2.4*
Residual	4	1.8	42.8	9.1	1.6	22.1	86.5	1.7	1.9
Lack of fit	1	1.6**	42.1***	8.2**	1.2*	21.3***	76.3**	0.2	1.8***
Pure error	3	0.2	0.7	0.9	0.4	0.8	10.2	1.5	0.1

***Significant at 1% probability level.

** Significant at 5% probability level.

* Significant at 10% probability level.

1% 수준에서 유의하였다. CMC와 펙틴의 사용농도는 단백질의 함량에 유의적인 영향을 미치지 않았으나 지방질 함량에는 각각 10%와 5% 수준에서 유의한 영향을 미쳤다.

그러나 반응 pH는 각 다당류에 있어서의 반응도에 모두 1% 내지 5% 수준에서 통계적으로 유의한 영향을 미쳐 단백질-다당류 상호작용에서 반응 pH가 다당류의 농도보다 더 중요한 영향 요인으로 밝혀졌다.

독립변수인 다당류의 사용 농도 및 pH와 종속변수인 반응도 Y_1 및 Y_2 의 관계를 각 다당류에 대한 회귀모형을 이용하여 입체적인 반응표면으로 나타내면 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 각 다당류의 사용 농도가 반응도에 미치는 영향은 상대적으로 작았고, 다당류에 따라 pH에 의한 영향이 더 크게 나타났으며, 같은 다당류에 대한 Y_1 과 Y_2 의 반응표면의 변화 경향은 큰 차이가 없었다.

한편 다당류를 사용하지 않고 희석한 노른자의 pH만을 조절하여 원심분리한 다음 상층액의 단백질과 지방질 함량을 측정하여 pH가 난황 수용성 단백질과 지방질의 분리에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 다당류를 사용하지 않은 경우 다당류를 사용하였을 때 보다 상층액 중 지방질 함량이 많아 난황 지방단백질(lipoprotein)이 적게 침전되었음을 보였다. pH 5.0에서는 상층액 중 지방질 함량이 다른 pH에서보다 훨씬 적었으나 같은 pH에서 알긴산나트륨, 펙틴 등의 다당류를 첨가하였을 때보다는 많아, 다당류를 첨가함으로써 노른자 지방질을 효율적으로 침전시킬 수 있는 것으로 나타났다.

수용성 단백질 분리조건의 결정

각 다당류에 대한 반응표면을 canonical analysis로 검토한 결과(Table 9) 각 반응도의 stationary point는

Table 6. Regression coefficients of the second order polynomials

Regression coefficient ¹	Responses							
	Sodium alginate		PGA		CMC		Pectin	
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
β_0	432.7***	971.7***	301.9**	593.3***	538.2	2477.7***	81.5***	208.7***
β_1	-207.2**	-321.0	-267.2	-669.0***	-666.7	-5330.8*	-60.6	-480.0**
β_2	-147.0***	-345.4***	-119.4**	-243.7***	-249.5*	-1062.4***	-23.0**	-73.3**
β_3	320.0***	545.0	345.0*	550.0***	2281.3	6750.0*	796.9*	1656.3**
β_4	13.7***	31.7***	13.3**	26.1***	56.3	159.2***	2.3***	6.8***
β_5	5.5	7.0	21.0	100.0***	-320.8	304.2	-7.5	38.8*
Coefficient of determination (R^2)	0.999	0.995	0.878	0.997	0.977	0.982	0.974	0.997

¹ These are coefficients of the equation $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 + \epsilon$

***Significant at 1% probability level.

** Significant at 5% probability level.

* Significant at 10% probability level.

Table 7. Analysis of variance for the overall effect of the two reaction variables on the response

Reaction variables	Sum of squares							
	Sodium alginate		PGA		CMC		Pectin	
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
Polysaccharide concentration	23.5***	109.2	17.0	159.4***	58.1	341.4*	2.7	23.2**
pH	1853.6***	7841.8***	53.6**	388.4***	919.5***	4513.0***	65.4***	581.1***

***Significant at 1% probability level.

** Significant at 5% probability level.

* Significant at 10% probability level.

모두 최소점으로 나타났으며, CMC를 제외한 다른 다당류에 대한 stationary point는 실험에서 사용한 범위의 값을 가졌으나 CMC의 반응도는 측정범위 밖의 값을 나타내었다.

따라서 수용성 단백질을 분리하는 데 필요한 조건을

설정하기 위하여 먼저 Fig. 3에 예시한 바와 같이 동일한 반응도 값을 연결한 contour plot을 작성하고 각 다당류에 대한 반응도 중 상층액의 지방질 함량의 상한값을 5%로 설정하고 5% 이하의 지방질 함량을 나타내는, 즉 95% 이상의 지방질이 침전되는 다당류의 농도(X_1)와 pH

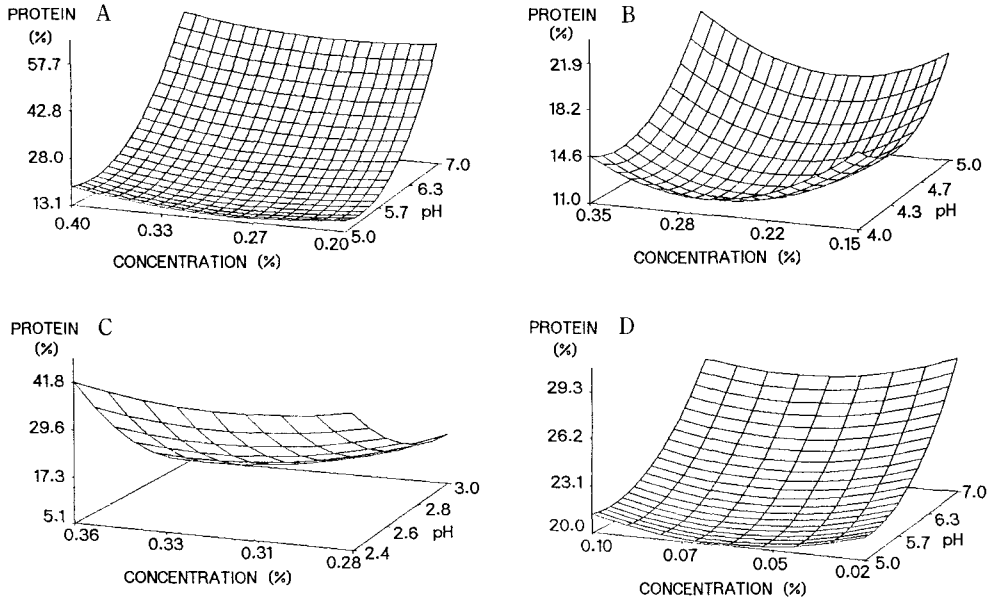


Fig. 1. Response surfaces for the effect of polysaccharide concentration and reaction pH on protein content. A) Sodium alginate, B) Propylene glycol alginate, C) Sodium carboxymethylcellulose, D) Pectin

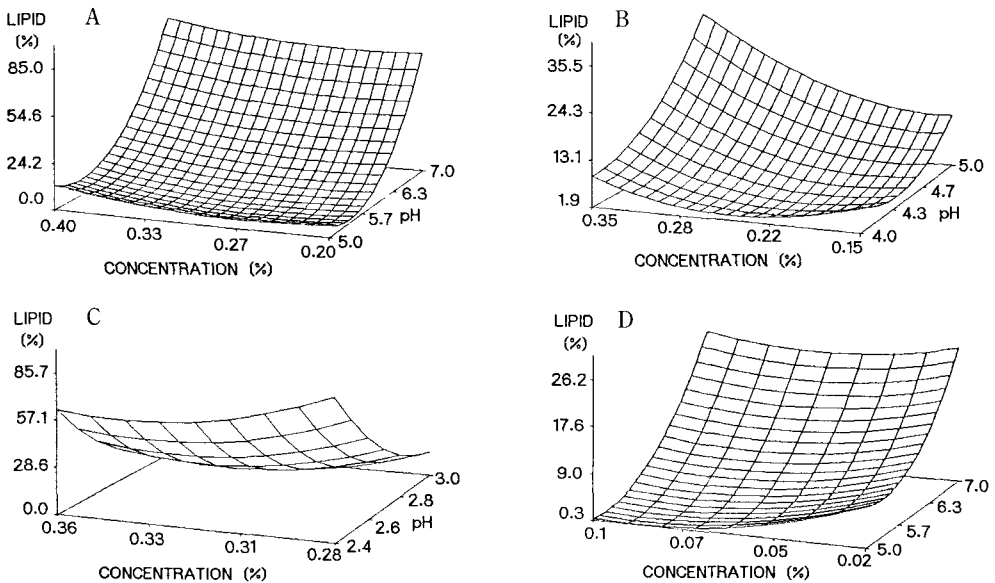


Fig. 2. Response surfaces for the effect of polysaccharide concentration and reaction pH on lipid content. A) Sodium alginate, B) Propylene glycol alginate, C) Sodium carboxymethylcellulose, D) Pectin.

이 연구는 1990년도 한국과학재단의 연구비지원(과제 번호: 903-1508-018-1)에 의한 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Burley, R. W. and Cook, W. H.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39 : 1295(1961)
2. McCully, K. A., Mok, C. C. and Common, R. H.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40 : 937(1962)
3. Rhodes, D. N. and Lea, C. H.: *Biochem. J.*, 65 : 526 (1965)
4. Polson, A., Wechmar, M. B. and Fazakerley, G.: *Immunol. Commun.*, 9 : 495(1980)
5. Jensenius, J. C., Anderson, I., Hau, J., Crone, M. and Koch, C.: *J. Immunol. Meth.*, 46 : 63(1981)
6. Bogracheva, T. YA., Grinberg, V. J. and Tolstoguzov, V. B.: *Carbohydrate Polymers*, 2 : 163(1982)
7. Antonov, YU., A., Grinberg, V. YA., Zhuravskaya, N. A. and Tolstoguzov, V. B.: *Carbohydrate Polymers*, 2 : 81(1982)
8. Hatta, H., Sim, J. S. and Nakai, S.: *J. Food Sci.*, 53 : 425(1988)
9. Halling, P. J.: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, 15 : 155(1981)
10. Kato, A. and Nakai, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 624 : 13(1980)
11. Stainsby, G.: In 'Functional Properties of Food Macromolecules', Mitchell, J. R. and Ledward, D. A. (ed), Chap. 7, Marcel Dekker, NY, U.S.A.(1986)
12. Markwell, M. A. K., Hans, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E.: *Anal. Biochem.*, 87 : 206(1978)
13. Gacula, M. C. and Singh, J.: In 'Statistical Methods in Food and Consumer Research', p.214, Academic Press, Inc., FL, U.S.A.(1984)
14. SAS: *SAS/STAT Guide for Personal Computers*, Version 6 Edition, Chap. 29, SAS Institute, Inc., NC, U.S.A.(1987)
15. Osuga, D. T. and Feeney, R. E.: In 'Food Proteins', Whitaker, J.R. and Tannenbaum, S. R.(ed), p.213, AVI, CT, U.S.A.(1977)
16. Radomski, M. W. and Cook, W. H.: *Can. J. Biochem.*, 42 : 1203(1964)

Separation of water-soluble egg yolk proteins using polysaccharide

Tae-Wha Moon and Hyun-Jong Lee (Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Response surface methodology was employed to investigate the conditions for separating water-soluble proteins from egg yolk using sodium alginate, propylene glycol alginate (PGA), sodium carboxymethylcellulose (CMC) and pectin which are approved as food additives. Effects of polysaccharide concentration and pH of the reaction system on protein and lipid contents in the supernatant were evaluated at respectively five and three levels of concentration and pH using rotatable hexagon design. Statistical analysis showed that pH of the system was a more important factor than polysaccharide concentration as it significantly affected all two responses. Separating conditions established by a graphical optimization technique were 0.23~0.25% of sodium alginate at pH 5.9~6.0, 0.15~0.17% of PGA at pH 4.3~4.5, 0.30~0.31% of CMC at pH 3.0, and 0.09~0.10% of pectin at pH 5.6~5.8.