

반응표면 분석법을 이용한 Papaya 유액추출물에서 Crude Protein 회수 조건의 최적화

오훈일 · 오상준 · 김정미*

세종대학교 식품공학과, *연세대학교 식품영양과학연구소

Optimization of Crude Protein Recovery from Papaya Latex Extract Using Response Surface Methodology

Hoon-II Oh, Sang-Joon Oh and Jeong-Mee Kim*

Department of Food Science and Technology, Sejong University

*Research Institute of Food and Nutritional Science, Yonsei University

Abstract

Crude papain extracted at optimum condition was purified with an ethanol precipitation method. Four factors of protein recovery method were optimized by response surface methodology (RSM) and the function was expressed in terms of a quadratic polynomial equation. Adequacy of the model equation for optimum response values was tested and optimum conditions of protein recovery were 38.2 mg/mL of protein, ethanol concentration of 40% and precipitation temperature of -8°C. The experimental value (68.97%) for recovery yield was closed to the predicted value (77.28%) under these conditions.

Key words: papaya latex, protein recovery yield, response surface methodology (RSM)

서 론

Papain은 식품 공업에서 육류의 연육제 및 주류의 청징제로 널리 사용하고 있으며^(1,4) 의약품, 화장품, 섬유 공업등에서도 많이 사용하고 있다⁽⁵⁾. 이와 같은 papain의 응용으로 papain 정제에 대하여 많은 연구가 이루어졌다. Kimmel과 Smith⁽⁶⁾는 papaya로부터 유액(latex)을 추출한 후 황산 암모늄염을 이용하여 침전정제시켜 papain을 결정화하고, papain의 esterase 반응을 보고하였으며, Syu 등⁽⁷⁾은 agarose gel을 담체로 한 affinity chromatography를 3가지의 서로 다른 ligand (ϵ -Acp-D-Phe-OCH₃, ϵ -Acp-D-Phe-C₂H₅, ϵ -Acp-L-Leu-D-Phe)를 사용하여 papain을 정제하였고, ϵ -Acp-D-Phe-C₂H₅를 ligand로 사용한 경우 ligand의 농도가 높아져도 활성의 변화가 거의 없음을 보고하였다. Burke 등⁽⁸⁾은 papaya 유액으로부터 crude papain을 10 mM acetate buffer (pH 5)를 이용하여 분리한 후 p-aminophenyl-mercury 그룹에 공유결합된 컬럼을 이용한 af-

finity chromatography로서 papain을 정제하는 2단계 정제법을 보고하였다. Boudart⁽⁹⁾는 papaya 과실로부터 제조된 papaya 유액을 용해시킨 후 원심분리하고 액상의 내용물을 동결건조하여 무기물을 제거하였으며 진공상태에서 불활성기체 존재 하에 분무건조하여 정제된 papain을 제조하였다. 이 때 활성도는 650 WPA (Wallerstein proteolytic activity)였으며, 수율은 공정과정에 투입된 신선한 유액 중량의 20%를 나타냈다고 보고하였으나 정제도에 대한 언급은 없었다. Fukal 등⁽¹⁰⁾은 Kimmel⁽⁶⁾의 방법인 황산 암모늄 등을 이용하여 1차 침전시킨 후 CM-셀룰로오즈 chromatography로 papain을 정제하였으며, 280 nm에서의 흡광도로서 그 정제 정도를 조사하였다.

본 연구에서는 전보⁽¹¹⁾에서 보고한 최적 추출조건으로 papaya 유액으로부터 얻은 crude papain의 효율적인 회수를 위하여 간단한 정제방법인 ethanol 침전법⁽¹²⁾을 이용하여 protein을 회수하였다. 또한 protein의 최적 회수 조건을 규명하기 위하여 회수에 영향을 크게 미치는 주요 인자 즉 침전온도, pH, protein과 ethanol 농도의 4인자를 설정하고, 3수준 모델에 의한 중심합성법에 의하여 실험설계 및 반응표면 분석에 의한 통

Corresponding author: Jeong-Mee Kim, Research Institute of Food and Nutritional Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

계적 분석을 실시하였다. 이 분석 방법은 종속변수에 대해 각 독립변수의 영향의 정도를 등고분석으로 확인할 수 있는 반응표면 분석법 (response surface methodology; RSM)으로, protein 회수의 최적 조건을 확립하기 위하여 protein의 회수율에 대하여 회수조건을 다중 회귀분석하고 모델식을 설정하여 RSM을 이용한 3차원 분석을 수행하였다. 이로써 papaya 유액 추출물에서 protein의 최적 회수 조건을 확립하고, 최적 조건에 의한 회수도의 예측치와 실험치를 비교하여 그 유의성을 조사함으로써 최적화된 회수 조건을 산출해내고자 하였다.

재료 및 방법

재료

Papaya latex는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 구입하여 전보의 방법⁽¹¹⁾으로 crude papain을 추출하여 실험에 사용하였다.

Crude protein 회수에 대한 실험 설계

Papaya 유액 추출액을 침전정제하기 위하여 protein과 ethanol 농도, pH와 침전 온도를 각각의 독립 변수로 설정하고, Statgraphics 프로그램 내의 중심합성 계획법 (central composite design)을 이용하여 crude protein의 회수에 대한 3수준 4요인의 부분실험 계획법 (fraction factorial block)을 설정하였다(Table 1). 즉 + α (max)와 - α (min) 값의 범위는 Cohn 등⁽¹³⁾의 연구 결과를 참고하여 protein 농도는 최소값 15.8 mg/mL, 중간값 30.1 mg/mL과 최대값 66 mg/mL을 설정하였고, protein 회수를 위한 ethanol 농도는 최소값 25%, 중간값 32%, 최대값 40%로 정하였다. 침전정제시 침전온도는 최소값 -20°C, 중간값 -8°C, 최대값 5°C로, pH 범위는 최소값 4.8, 중간값 6.6, 최대값 7.4을 설정하여 부분요인 실험법으로 실험구를 Table 1과 같이 조합하였다.

Crude protein의 침전 정제

Crude protein의 회수에 대하여 설정되어진 부분실험 계획법에 따라 30개의 처리구로 papaya 유액 추출물을 ethanol로 침전정제하였으며⁽¹²⁾, 침전물을 용해한 buffer의 상층액을 30배 희석하여 자외가시분광 광도계 (Hewlett Packard 8452A)로 280 nm에서 흡광도값 (O.D.)을 측정한 후⁽⁷⁾ 단백질 회수율은 다음과 같이 계산하였다.

Table 1. Fraction factorial block of experimental design for protein recovery performance test

Treatment No.	Coded variables ¹⁾				Process variables			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	+1	4.8	15.8	25	5
2	-1	-1	+1	-1	4.8	15.8	40	-20
3	-1	+1	-1	-1	4.8	66.0	25	-20
4	-1	+1	+1	+1	4.8	66.0	40	5
5	+1	-1	-1	-1	7.4	15.8	25	-20
6	+1	-1	+1	+1	7.4	15.8	40	5
7	+1	+1	-1	+1	7.4	66.0	25	5
8	+1	+1	+1	-1	7.4	66.0	40	20
9	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8
10	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8
11	-1	-1	-1	-1	4.8	15.8	25	-20
12	-1	-1	+1	+1	4.8	15.8	40	5
13	-1	+1	-1	+1	4.8	66.0	25	5
14	-1	+1	+1	-1	4.8	66.0	40	-20
15	+1	-1	-1	+1	7.4	15.8	25	5
16	+1	-1	+1	-1	7.4	15.8	40	-20
17	+1	+1	-1	-1	7.4	66.0	25	-20
18	+1	+1	+1	+1	7.4	66.0	40	5
19	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8
20	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8
21	+1	0	0	0	7.4	30.1	32	-8
22	-1	0	0	0	4.8	30.1	32	-8
23	0	+1	0	0	6.6	66.0	32	-8
24	0	-1	0	0	6.6	15.8	32	-8
25	0	0	+1	0	6.6	30.1	40	-8
26	0	0	-1	0	6.6	30.1	25	-8
27	0	0	0	+1	6.6	30.1	32	5
28	0	0	0	-1	6.6	30.1	32	-20
29	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8
30	0	0	0	0	6.6	30.1	32	-8

¹⁾X₁: buffer pH, X₂: protein concentration (mg/mL), X₃: ethanol concentration (% v/v), X₄: treatment temperature.

단백질 회수율(%)=

$$\frac{\text{침전물 용해액의 O.D.} \times \text{buffer의 부피}}{\text{침전물 용해액의 O.D.} \times \text{용해액 부피} + \text{상층액 O.D.} \times \text{상층액 부피}} \times 100$$

반응표면 분석에 의한 회수 조건의 최적화

Papaya 유액 추출액에서 단백질을 정제회수하기 위한 protein과 ethanol 농도, pH 범위와 정제온도를 각각의 독립변수로 선정하고, 회수율은 종속변수(Y)로 선정하여 Statgraphics 프로그램을 이용하여 다중 회귀 분석하고 반응변수에 대한 모델을 추정하여 이를 다항 회귀 모형식으로 변환하였다. 또한 회수율과 회수 조건을 최적화시키기 위해 단백질 회수율에 대한 회

수 조건의 다중 회귀분석, 분산분석, F 검정 및 t 검정을 하여 종속 변량의 최적화를 확인하였고 반응표면 분석에 의한 최대 정상점을 구하였으며, 3차원 분석(3-D plot)을 통하여 회수 조건의 최적화를 실시하였다.

결과 및 고찰

Crude protein 회수를 위한 부분실험 계획법

전보⁽¹¹⁾에서 보고한 최적 조건으로 추출한 crude papain을 정제회수하기 위하여 Statgraphics 프로그램 내의 중심합성 계획법으로 설정한 3수준 4요인의 부분계획 실험법과, ethanol로 처리되어진 각 실험구의 단백질 회수율은 Table 2와 같다. 각 독립 변수의 수준을 설정하게된 근거는 Cohn 등⁽¹³⁾이 혈청과 혈액 단백질의 성질을 조사하기 위하여 생물학적 조직의 구성분

중의 단백질과 지단백질을 분리하는 system에 기초하였다. 이 연구에서는 albumin, α-globulin, cholesterol, β-globulin, γ-globulin, fibrinogen 등을 분리하기 위하여 ethanol 침전법을 사용하였으며 그들이 설정한 단백질 농도(0.2~66 mg/mL), pH (4.4~7.4), 침전온도(-10°C~0°C), ethanol 농도(0~40%, v/v), 염의 농도 등 여러 조건 중에서 본 실험에서는 단백질 농도, pH와 침전온도, ethanol 농도를 독립 변수로 설정하였다. 이 중에서 protein 농도는 protein이 침전된 후 원심분리에 의하여 실질적으로 회수될 수 있는 최소량인 15.8 mg/mL로, 이는 Cohn 등⁽¹³⁾이 설정한 단백질 농도의 최저치보다 높은 수준이었고, papaya 유액 추출액의 pH 범위는 4.8과 7.4를 최저치와 최고치로 설정하였다. 한편 ethanol 농도는 가장 낮은 침전 온도 내에서 papaya 유액 추출액이 얼지 않았던 ethanol의 농도(25%)를 최저 농도로 설정하였고 최고 농도는 위의 연구에서와 같은 범위의 최고 농도 수준(40%)을 설정하였다. Papaya 유액 추출액의 침전온도는 효소 단백질의 변성을 최소화시키기 위하여 냉장온도인 5°C와 냉동온도인 -20°C를 침전온도의 수준으로 설정하였다. 각 독립 변수의 중간값은 최대값과 최소값의 범위 내에서 중간값의 유의성을 인정할 수 있는 값으로 pH 6.6과, protein 농도 30.1 mg/mL, ethanol 농도 32%, 침전온도 -8°C로 설정하였다. 부분요인 실험법에 의하여 처리되어진 각 시험구 중에서 단백질 회수율이 가장 높았던 처리구는 각 독립 변수의 중간값인 위의 조건 즉 crude protein 농도는 30.1 mg/mL, 32%의 ethanol 농도, pH는 6.6, 침전온도 -8°C로 처리된 시험구에서 67.83%로서 단백질 회수율이 가장 높았다(Table 2).

Table 2. Fraction factorial block of experimental design for protein recovery performance test and recovery yield

Treatment No.	Coded variables ¹⁾				Recovery yield (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	+1	38.53
2	-1	-1	+1	-1	49.70
3	-1	+1	-1	-1	32.44
4	-1	+1	+1	+1	36.73
5	+1	-1	-1	-1	38.11
6	+1	-1	+1	+1	61.78
7	+1	+1	-1	+1	31.36
8	+1	+1	+1	-1	55.88
9	0	0	0	0	67.83
10	0	0	0	0	67.83
11	-1	-1	-1	-1	28.97
12	-1	-1	+1	+1	44.97
13	-1	+1	-1	+1	23.39
14	-1	+1	+1	-1	37.34
15	+1	-1	-1	+1	20.22
16	+1	-1	+1	-1	38.39
17	+1	+1	-1	-1	24.88
18	+1	+1	+1	+1	28.27
19	0	0	0	0	67.83
20	0	0	0	0	67.83
21	+1	0	0	0	61.87
22	-1	0	0	0	53.25
23	0	+1	0	0	59.06
24	0	-1	0	0	54.50
25	0	0	+1	0	64.60
26	0	0	-1	0	45.47
27	0	0	0	+1	52.08
28	0	0	0	-1	39.21
29	0	0	0	0	67.83
30	0	0	0	0	67.83

¹⁾X₁: buffer pH, X₂: protein concentration (mg/mL), X₃: ethanol conc. (%), v/v, X₄: treatment temperature.

Crude protein 회수 조건의 최적화

Crude protein을 ethanol로서 침전정제하기 위한 papaya 유액 추출액의 농도, pH, ethanol 농도와 침전온도 등의 4가지 요인을 독립 변수로 설정하고 280 nm에서의 흡광도 값을 단백질 회수율로 환산한 후 이 값을 종속 변수 Y로 설정, 다중 회귀분석을 수행하여 (Table 3) 다음과 같은 모델식을 얻었다.

$Y = 7.4554 + 1.2657X_2 + 1.0552X_3 - 1.7407X_4 - 0.0166X_2^2 - 0.1134X_4^2$ (r=0.9801). 이때 t-value의 절대값이 1.75 이상인 항은 다중 회귀분석 모델식에 채택하고 t-value의 절대값이 1.75 미만인 항은 기각하였다. 각 인자의 변수에 대한 회귀 계수는 1차 선형 효과와 반응표면이 곡면을 이루는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 회수조건 인자간에 상호 작용이 있다. 다중 회귀분석 전체에 대한 분산분석 결과(Table 4) 다중 상관계수의 제공

합은 73851.4, 잔차의 제곱 합은 1198.7이었고 유의 수준을 검정하는 자유도와 F-value도 양호한 값($p < 0.001$)

Table 3. Values of multiple regression coefficients calculated for the protein recovery yield

Independent variables	Coefficient	Standard error	t-value
Constant	7.4554	5.7034	6.6624
X_1	-0.0131	0.0086	1.3474
X_2	1.2657	0.4031	3.1400
X_3	1.0552	0.2068	5.1030
X_4	-1.7407	0.3717	-4.6834
X_1X_2	1.9079	2.9749	0.6413
X_1X_3	2.5549	10.3000	0.2481
X_1X_4	-0.2120	1.0914	-0.1926
X_2X_3	-0.0076	0.0108	-0.0108
X_2X_4	-0.3144	0.4759	-0.6607
X_3X_4	-0.4084	1.6478	-0.2479
X_1^2	4.7014	2.7694	-1.3651
X_2^2	-0.0165	0.0050	-3.3367
X_3^2	-0.1169	0.0882	-1.3255
X_4^2	-0.1134	0.0223	-5.0698

X_1 : buffer pH, X_2 : protein concentration, X_3 : ethanol conc. (% v/v), X_4 : precipitation temperature.

Table 4. Analysis of variance for full regression

Source	Sum of square	DF	Mean square	F-value
Model	73851.4	12	6154.28	92.4122 ¹⁾
Error	1198.7	18	6.59	
Total	75050.1	30		

¹⁾ $p < 0.001$.

을 나타내어 종속 변수와 독립 변수와의 상관관계가 뛰어난 것을 알 수 있었으며 다중 회귀분석에서 얻은 모델식의 각 변수들 사이에는 99.9% 수준에서 유의성이 있음을 알 수 있었다. 다중 회귀분석에 의해 설정된 모델식을 이용하여 Statgraphics 프로그램에 있는 반응표면 분석법(RSM)으로 Fig. 1-3과 같은 결과를 얻었다. 독립변수 중 crude protein 농도를 각 수준 별로 고정한 결과, 40%의 ethanol 농도와 침전온도 -8°C 축선 상에서 반응값이 가장 높았고, crude protein 농도가 30.1 mg/mL일 때 76.01%의 단백질 회수율을 나타냈으며 protein 농도가 66 mg/mL인 경우 회수율이 64.30%였다(Fig. 1). Ethanol 농도를 고정하여 반응값을 조사한 결과 ethanol 농도가 40%일 때 crude protein 농도는 38.5 mg/mL, 침전온도 -8°C에서 회수율이 77.32%로 가장 높은 반응값을 보였으며, ethanol 농도가 25%일 때는 61.50%의 회수율을 나타냈다(Fig. 2). 침전온도를 고정한 경우에는 crude protein 농도가 38.5 mg/mL, ethanol 농도는 40% 축선 상에서 침전온도가 -8°C 일 때 77.55%의 최고 반응값을 나타냈으며 침전온도가 -20°C인 경우에는 60.34%의 회수율을 보였다(Fig. 3). 반응표면 분석 결과 최고치의 반응값이 직교좌표 상에 나타나는 경향이 일정하여 40%의 ethanol 농도에서, 침전 온도가 -8°C일 때 모델식을 미분하여 protein 농도는 38.2 mg/mL, 40%의 ethanol 농도와, 침전 온도 -8°C의 최적 조건을 설정하였다. 모델식의 최적 조건에 의하여 정제되어진 protein의 예상회수율은

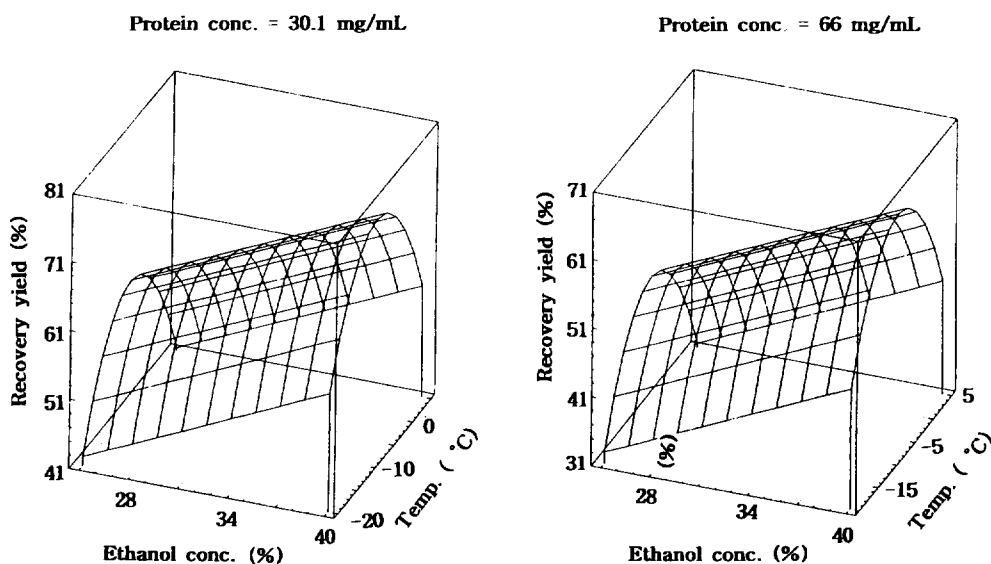


Fig. 1. Response surfaces of the protein recovery yield at constant protein concentration of 30.1 mg/mL and 66 mg/mL, respectively.

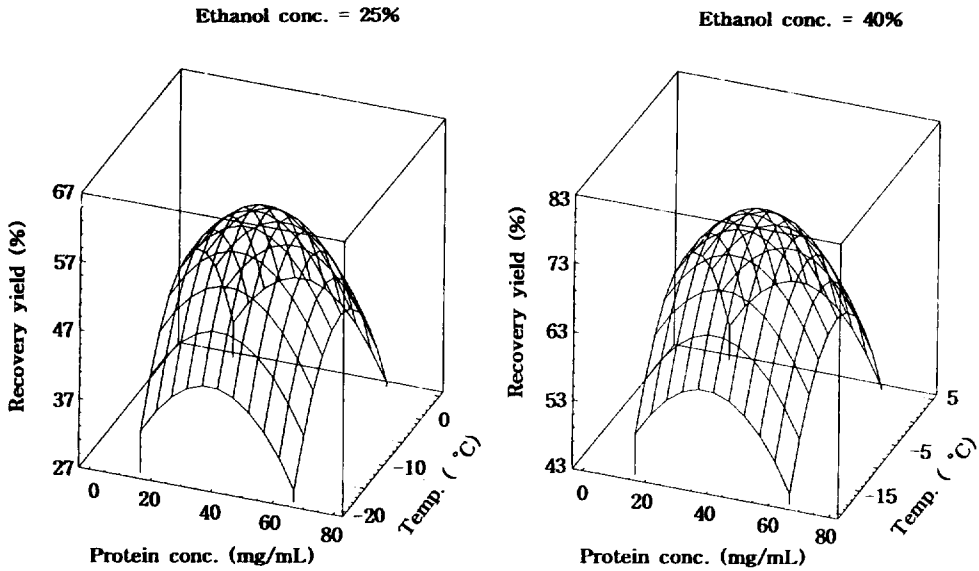


Fig. 2. Response surfaces of the protein recovery yield at constant ethanol concentration of 25% and 40%, respectively.

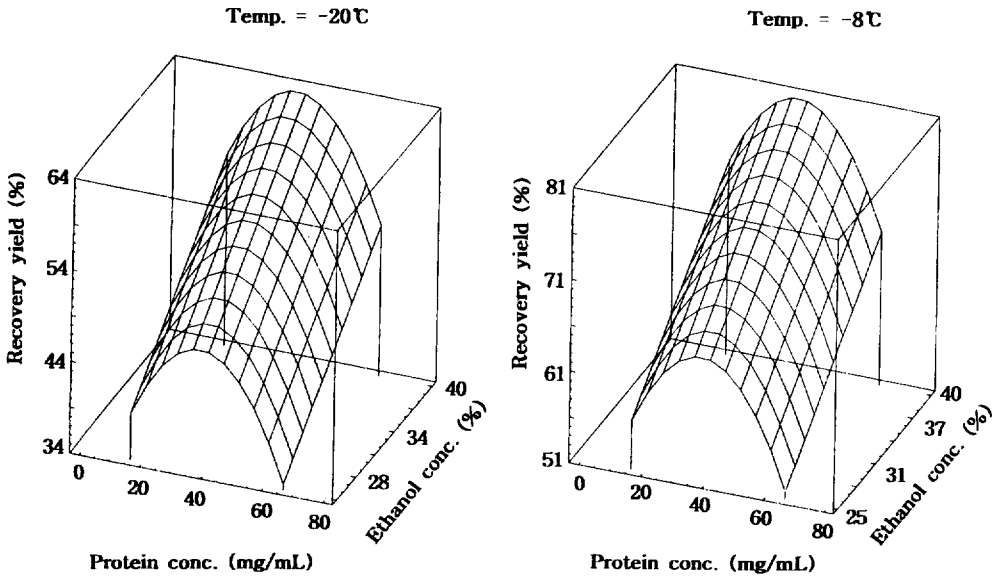


Fig. 3. Response surfaces of the protein recovery yield at constant precipitation temperature of -20°C and -8°C, respectively.

77.28%이었고 실험에 의한 실추회수율은 68.97%로 이는 Cohn 등⁽¹³⁾이 보고한 혈청 단백질 분획을 ethanol로 분리정제할 때의 수율 60% 보다 약간 높은 것으로 나타났다. 한편 본 실험에서 회수된 단백질의 분자량을 SDS-PAGE를 이용하여 측정된 결과 Aron⁽¹⁴⁾이나 Drenth 등⁽¹⁵⁾이 보고한 23.4 KD보다 많은 24.3 KD로 나타나 이는 212개의 아미노산이 펩타이드 결

합을 이루고 있는 papain의 분자량 23,400에 근접한 유형이었다.

요 약

Papaya 유액 추출물에서 protein을 정제 회수하기 위해 papaya 유액으로부터 추출한 추출액을 경제적이

고도 처리가 비교적 간단한 ethanol 침전방법을 사용하였다. 실험계획법에 의하여 설정된 3수준의 부분요인 실험법에 의하여 실시된 각 처리구의 실험 결과를 다중 회귀분석 방법에 의해 다음과 같은 모델식 $Y = 7.4554 + 1.2657X_1 + 1.0552X_2 - 1.7407X_3 - 0.0166X_4^2 - 0.1134X_5^2$ 을 산출하였으며 pH는 다중 회귀분석에 의해 제거되었다. 반응표면 분석법(RSM)을 이용한 결과 protein을 회수하기 위한 최적 조건으로는 protein 농도가 38.2 mg/ml, 40%의 ethanol 농도, 침전 온도는 -8°C였다. 이러한 최적 조건에 의한 회수율의 실험치는 68.97%로 예측치인 77.28%에 근접한 결과였다. 또한 유의 수준을 검정하는 자유도와 F-value도 양호한 값($p < 0.001$)을 나타내어 종속변수와 독립변수와의 상관관계가 뛰어난 것을 알 수 있으며 따라서 다중 회귀분석에 얻어진 모델식의 각 변수들 사이에는 유의성이 높음을 알 수 있었다.

문헌

1. 정동효 : 효소학개론. 대광서림, p.148 (1977)
2. 이서래, 신호선 : 최신식품화학. 신광출판사, p.212 (1988)
3. Tver, D.F. and Russell, P.: *The Nutritional and Health Encyclopedia*. Van Nostrand Reinhold Press, p.395 (1989)
4. Fennema, O.R.: *Food Chemistry*. Marcel Dekker. Inc., p. 400 (1985)
5. 노봉수, 박관화 : Papaya latex에 있는 단백질 분해 효소

- 들의 열불활성화에 관하여. 한국식품과학회지, 12(3), 209 (1980)
6. Kimmel, J.R. and Smith, E.L.: Crystalline papain. *J. Biol. Chem.*, 207, 515 (1954)
7. Syu, W.J., Wuand, S.H. and Wang, K.T.: Purification of papain by affinity chromatography. *J. Chromatography*, 262, 346 (1983)
8. Burke, D.E., Lewis, S.D. and Shafer, J.K.: A two step procedure for purification of papain extract of papaya latex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 164, 30 (1974)
9. Boudart, R.L.: Method for processing papain latex and product obtained. *British Patent Specification* 1,250,654 (1968)
10. Fukal, L., Kas, J. and Paluska, E.: Chromatographic separation of papain evaluated by immunochemical methods. *J. Chromatography*, 285, 365 (1984)
11. 오훈일, 오상준, 김정미 : 반응 표면 분석에 의한 crude papain 추출 조건의 최적화. 한국식품과학회지, 29(3), 509 (1997)
12. Deutscher, M.P.: *Guide to Protein Purification*. Academic Press, Inc., 182, 285 (1990)
13. Cohn, E.J., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J. N., Melin, M. and Taylor, H.L.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 459 (1946)
14. Arnon, R.: *Method in Enzymology*. Academic Press, New York, p.226 (1970)
15. Drenth, J., Jansonius, N. and Wolthers, B.G.: Papain structure. *J. Mol. Biol.*, 24, 443 (1967)

(1997년 4월 22일 접수)