

## 방향성 분자진화에 의한 음이온에 안정한 Papain 개발

† <sup>1</sup>강 환 구 · <sup>2</sup>황 선 덕 · <sup>2</sup>김 형 식 · <sup>1</sup>정 종 식 · <sup>3</sup>이 병 욱  
<sup>1</sup>한남대학교 나노생명화학공학과, <sup>2</sup>(주)브릿지 바이오, <sup>3</sup>고신대학교 생명과학부  
(접수 : 2006. 8. 23., 게재승인 : 2006. 10. 20.)

## The Development of Papain which is Extremely Stable to Negative Ionic Environment by Directed Molecular Evolution

Whan-Koo Kang<sup>† 1</sup>, Sun-Duk Hwang<sup>2</sup>, Hyoung-Sik Kim<sup>2</sup>, Jong-Sik Jeung<sup>1</sup>, and Bheong-Uk Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering & Nano-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea

<sup>2</sup>Daecheong bldg. 3F, #15-6, Daehwa-dong, Daedeok-gu, Daejeon 306-800, Korea

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, The University of Kosin, Busan 606-701, Korea

(Received : 2006. 8. 23., Accepted : 2006. 10. 20.)

When the papain, which is a sort of Cystein protease, is applied to the outer skin, it decomposes the protein which forms the peeled outer skin and speeds up metabolism. Therefore, it is one of the most important cosmetics compositic which keeps the function of skin normal. When the papain is used in cosmetics with surfactant, the activity of papain is reduced rapidly. In this study, the modified papain with extreme stability negative ionic environment was developed by directed evolution

**Key Words** : Cystein protease, papain, error prone PCR, mutagenesis, staggered extension process, toletry dopes enzyme

### 서 론

화장품산업은 정밀화학 분야에서는 의약부분 다음가는 규모의 큰 산업분야로서, 최근에는 생명 공학적 기법으로 개발된 다양한 기술이 사용되기 시작하였다. 과거의 단순 화장의 개념이 아닌, 특정 물질의 적용에 의한 피부에서의 생체 반응을 유도하고 있으며, 더욱이 의학적 효능에 버금가는 효능을 보유한 화장품들이 등장하여 전 세계시장을 주도하고 있는 실정이다. 화장품의 적용 대상인 피부는, 다른 신체 조직과 마찬가지로 외부의 환경 변화에 따른 다양한 생리작용이 지속적으로 진행되고 있으며, 대부분의 최종 생리대사는 효소에 의해 직접적으로 이루어져 있다. 따라서 효소 자체를 화장품 원료로 사용할 경우에는, 기존의 단순 첨가 원료가 가질 수 없는 원하는 특정 대사 과정을 보유한 화장품의 개발이 가능해질 것으로 기대 된다.

그러나 화장품으로서의 효소의 이용은 아직 세계적으로도 초기단계로서, 화장품 개발에 필수적으로 수반되는 문

제점들, 즉 장기간 실온에서의 안정도의 문제, 피부자극에 대한 문제, 제형성분과의 반응성 문제, 제형 내에서의 작용성 문제 등이 해결되어야 하는데, 특히 제형 내에 다량으로 존재한 음이온의 작용에 따른 효소 활성의 감소가 큰 문제로 대두되고 있다. 효소의 개량은 생명공학 분야에서 막대한 연구가 이루어지는 중요한 주제로서, 현재 미국 Willem Stemmer에 의해 소개된 분자진화 기술이 가장 강력한 방법 중의 하나로 인정받고 있다. DNA shuffling으로 대변되는 이 기술은 유전자 증폭 기술 (polymerase chain reaction)을 이용하여 무작위적인 돌연변이를 특정 유전자 내에 무한대로 유발시키는 기술로서, Taq polymerase를 사용하여 다양한 무작위적 돌연변이를 단백질 내에 유발하여, 적절한 발현 벡터에 삽입시키고, 형질전환 시킨 후에, 원하는 특성을 보유한 효소를 탐색하는 것이다. Cystein protease 중의 하나인 papain은, 표피에 적용될 경우 박리된 표피의 각질을 이루는 케라틴 등의 단백질을 분해하여, 표피 신진대사를 원활하게 하여, 피부 기능의 정상화를 유지할 수 있는 효소체로서, 현재 화장품 및 향장품의 첨가제로서 많이 이용되고 있으나 현재 화장품에 첨가 시에 보여 지는 가장 큰 문제점으로는 제형 성분에 다량 존재하는 음이온성 고분자물질 (polyacrylicacid, polyacrylamide) 및 계면활성제 (sorbitan stearate, polysorbate)에 대한 불안정성으로 인하여 효소활성의 상실이다. 본 연구에서는 분자 진화 방법을 이용하여, 음이온 환경에서 안정한 papain으로

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering & Nano-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea

Tel : +82-42-629-7932, Fax : + 82-42-623-9489

E-mail : wkoo@hannam.ac.kr

개발하였다.

본 기술의 중요성은 화장품 첨가제로서의 단일 효소의 개발 뿐만 아니라, 동일 기술이 화장품으로 상용이 가능한 다양한 효소들에 적용될 수 있는 기반 기술로 응용될 수가 있다는 점이다. 특히 개발시 장기간을 소요하며, 위험 부담이 높은 의약품의 신개발과는 다르게, 개발기간 및 적용이 상대적으로 유리한 화장품 원료용 개발 효소류의 생산은, 기술의 적용 또한 용이하다. 따라서 세계적으로 본격화되기 시작한 효소형 화장품을 개발하는 것은 화장품 제조 기술을 선점하게 하며, 또한 이 기술의 주도 능력을 배가시킬 것이다.

본 연구에서는 방향성 분자진화기술 (directed molecular evolution)을 이용한 음이온에 안정한 papain의 개발을 연구 목표로 하고 있다.

연구의 범위는 음이온 안정성 papain 생산을 위한 유전자의 방향성 분자진화와 분자 진화된 음이온 안정성 papain의 스크리닝, 분자 진화된 papain의 아미노산 서열 및 특성 분석, 분자 진화된 재조합 papain의 생산방법 기술 개발 확립이다.

## 재료 및 방법

### Papain peptidase IV 유전자의 확보 및 발현 균주

본 연구에 사용한 *E. coli* 및 *S. cerevisiae* 숙주세포와 plasmids를 Table 1에 정리하였으며, papain 유전자의 경우는 papaya 열매에서 얻었다. 재조합 papain 발현용 *S. cerevisiae* 균주는 모두 uracil 영양 요구성 변이주이며 haploid로 *S. cerevisiae* 2805 (*MATa pep4::HIS3 prb1-1.6R can1 GAL2, his3-200 ura3-52*)와 *S. cerevisiae* BJ5465 (*MATa ura3-52 leu2-3 leu2-12 his4-419 suc2-9*)를 사용하였다. 또한 plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 *XL1-Blue*와 *DH5a*를 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*에서 papain 발현 vector는 유도성 발현 vector로써는 GAL promoter를 가진 YEGa-HIR525와 GAP promoter를 가진 pYIGP vector를 사용하였다. 이 vector들은 형질전환효소의 선택표지로 *URA 3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를 가지며, 효모 복제 원으로 2  $\mu$ m replication origin을 이용하여 복제한다.

### 음이온 안정성 papain 유전자를 얻기 위한 분자진화의 방법 개발 및 조건

분자진화 방법으로는 Error prone PCR 방법 확립 정제된 papain PCR product, 10X mutagenic buffer (70 mg  $MgCl_2$ , 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 0.1% (wt/vol) gelatin), 10X dNTP mix (2 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP) 및 5 mM  $MnCl_2$  용액을 준비하였다. PCR tube에 10X mutagenic buffer 10  $\mu$ l, 10X dNTP mix 10  $\mu$ l, 각 primer 30 pmol, template DNA 1  $\mu$ l, *Taq* polymerase 5 unit, error rate를 조절하기 위해서  $MnCl_2$ 을 0.3~1.0 mM이 되도록 넣고 최종 부피가 100  $\mu$ l가 되도록 D.W.로 채웠다. PCR program은 94°C 1 min, 5

2°C 1 min, 72°C 1 min을 15번 반복하여 PCR한다.

DNA shuffling을 통한 mutagenesis로써 Step 1은 변이된 2개 이상의 papain 유전자를 같은 양으로 혼합 후 혼합된 DNA 30~45  $\mu$ l와 10X DNaseI digestion buffer 5  $\mu$ l 혼합 후 전체 양이 50  $\mu$ l가 되도록 D.W.로 채웠다. PCR 기기에 15°C, 5분간 방치 후 0.2 unit의 DNaseI 첨가하였다. Digestion의 온도 및 시간 조건은 15°C 10분, 90°C 10분으로 하였다. Step 2는 정제된 DNA fragment 10  $\mu$ l, 10X *Pfu* buffer 2  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.4  $\mu$ l (0.4 mM), *Pfu* 1.25 unit을 넣고 D.W.로 전체 부피를 20  $\mu$ l으로 하였다. PCR 조건은 96°C 3min으로 denaturation 시킨 후 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C, 1 min + 5 sec/cycle을 60 cycle로 반복한 후 마지막 extension으로 72°C, 7 min을 주었다. Step 3은 Reassembled product 1  $\mu$ l, 각 primer 30 pmol, 10X *Taq* buffer 10  $\mu$ l, 10mM dNTP 2  $\mu$ l와 *Pfu/Taq* (1 : 1) 2.5 unit을 혼합하고 전체 부피가 100  $\mu$ l가 되도록 D.W.로 채운 후 PCR 기기로 반응하였다. PCR의 온도 및 시간 조건으로 96°C 5 min을 한 후 94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 45 sec을 10 cycle 반복하고 다시 94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 45 sec + 20 sec/cycle을 14 cycle 반복한 후 마지막으로 72°C 7 min을 주었다

Staggered extension process는 선별된 papain 변이체 유전자를 같은 양으로 혼합 후 이것을 template로 하여 각 forward, reverse primer를 넣고 extension 시간 없이 denaturation, annealing만 반복적으로 PCR을 하였다

혼합 DNA 1  $\mu$ l, 각 primer 30 pmol, *Taq* buffer 10  $\mu$ l, 10 mM dNTP 2  $\mu$ l, *Taq* polymerase 2.5 unit를 넣고 전체 부피 100  $\mu$ l가 되도록 D.W.로 채운 후 PCR 기기로 반응을 하였다. PCR의 시간 및 온도 조건은 94°C 5 min을 한 후 extension 구간이 없이 94°C 30 sec, 52°C 5 sec를 80 cycle로 반복하여 반응하였다.

Table 1. List of yeast strains and plasmids was used in this study

Host Strains	Genetic markers	Sources or reference
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1, recA1, gyrA96, hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>thi, relA1, supE44, Δ(lac-p roAB)</i> , [F', <i>traD36, p roAB, lacqZAM15</i> ]	commercial
<i>E. coli</i> DH5a	ϕ80 <i>dlacZAM15, endA1, recA1, hsdR 17</i> , (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, relA1</i>	commercial
<i>S. cerevisiae</i> 2805	<i>MATa p ep 4::HIS3 p rbl-1.6R can1 GAL2 his3-200 ura3-52</i>	R.B. Wickner. NIH
<i>S. cerevisiae</i> BJ5465	<i>MATa ura3-52 trp1 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1 GAL</i>	ATCC 208289
Plasmids	Description	Sources or reference
pYIGP	<i>S. cerevisiae</i> expression vector (GAP promoter), 6.53kb	KRIBB
YEGa-HIR525	<i>S. cerevisiae</i> expression vector (GAL promoter), 8.41kb	KRIBB

### 분자진화된 음이온 안정성 papain의 효율적 스크리닝 방법

Filter paper 이용하는 방법을 선택하였다. 96 well 액체배

지와 YDGS plate에 error prone된 papain library의 transformation colony을 접종 후 4일 배양한 후 4°C cold chamber에서 cell을 precipitation시킨다. 96 well에서 발현된 배양액 (20  $\mu$ l)을 skim milk agar plate 위에 놓여있는 paper disk 위에 떨어뜨리고 30°C incubator에 넣어 약 10시간 반응시킨 다음 clear zone이 선명하고 지름이 크게 형성된 colony를 선별한다.

Papain의 정량 분석방법 확립은 Sigma로부터 Papain (14 unit/mg), Casein N,N-dimethylated (5 g)과 Picrylsulfonic acid (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, 10 ml)를 각각 구입했다.

Papain은 1 g/L로 농도로 증류수에 녹여 사용하였고 Casein은 2 g/L의 농도로, picrylsulfonic acid는 100  $\mu$ l를 증류수 14.9 ml에 희석하여 사용하였다. Papain을 1 g/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L의 6가지 구간으로 정하여 실험하였다.

먼저 Casein용액을 96-well에 각각 100  $\mu$ l 넣는다. 그리고 Papain sample을 50  $\mu$ l씩 넣는다. Blank로 사용될 well에 대해서는 증류수를 사용하였다. 20분간 incubation한 후 20분이 지난 후 Picrylsulfonic acid 50  $\mu$ l씩 넣어준다. 다시 20분간 incubation한다. Picrylsulfonic acid와 casein으로부터 분해 되어진 amine들이 서로 반응하여 오렌지색을 띄게 된다. 이것을 microplate reader로 wavelength 450 nm에서 Optical density를 측정하였다.

**P32-15 파파인 변이체의 papain 유전자 sequence 분석 방법**

DNA sequencing을 하기 위해서는 screening으로 선별된 papain mutant P32-15 균주를 최소 액체 배지 또는 복합배지 5 ml에 접종하여 20시간 배양하였다. 배양 후 1 ml을 취하여 원심분리 후 상등액을 버리고 pellet을 genomic DNA purification kit를 이용하여 yeast에 있는 plasmid를 정제하였으며, 이를 이용하여 papain 유전자만을 PCR하였고, 이 PCR product를 sequencing 하였다.

**P38-10 파파인 변이체에 대한 sequence 분석 방법**

DNA sequencing을 하기 위해서는 screening으로 선별된 papain mutant P38-10 균주를 최소 액체 배지 또는 복합배지 5 ml에 접종하여 20시간 배양하였다. 배양 후 1 ml을 취하여 원심분리 후 상등액을 버리고 pellet을 genomic DNA purification kit를 이용하여 yeast에 있는 plasmid를 정제하였으며, 이를 이용하여 papain 유전자만을 PCR하였고, 이 PCR product를 sequencing 하였다.

**분자진화된 재조합 파파인의 생산방법**

배양 조건은 pH 5.0-5.5, 온도 30°C, D.O. 10%를 유지하여 진행하였다. 초기에 C/N ratio가 3/2인 feeding solution을 feeding program을 이용하여 specific growth rate ( $\mu$ )를 0.1 hr<sup>-1</sup>로 유지하면서 600 rpm에서 O.D. 70까지 배양한 후 expression stage에 galactose로 C-source shift하여 최종 O.D. 90까지 fed-batch로 진행하였다.

Papain의 정제 방법을 확립하기 위해 파파인의 일차분리에 ammonium sulfate를 이용한 침전법을 사용하였다. 침전

물은 5 mM Tris buffer (pH 7.5)로 재용해시켰다. 재용해 후 크로마토그래피 공정으로 넘어가기 전에 염과 저분자량의 배지성분들을 제거하였다. 이러한 저분자량의 불순물을 제거하기 위해서 dialysis를 하였다. 크로마토그래피 공정에는 heparin-Sepharose affinity column, CM column과 DEAE column을 사용하여 정제하였다. 크로마토그래피로 얻어진 파파인은 Sephadex G-100 column으로 gel filtration을 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**Papain peptidase IV 유전자의 확보 및 발현 균주 개발**

파파야 열매에서 RNA를 뽑아내어 cDNA를 합성하였고 이를 이용하여 PCR에 의해서 papain 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 이용하여 papain을 발현하는 YEGa-Papain IV (GAL promoter)와 pYIGP-Papain IV (GAP promoter) vector를 개발하였다. 또한 이들 vector를 *S. cerevisiae* Y2805에 형질 전환 하였고, papain 발현을 확인하였으며, 이들을 error prone PCR을 통한 papain library의 발현에 사용하였다.

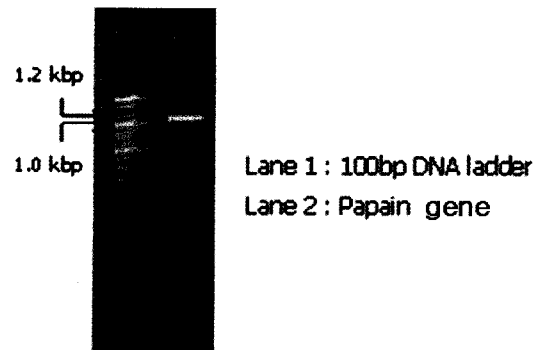


Figure 1. Agarose gel analysis of papain gene amplification.

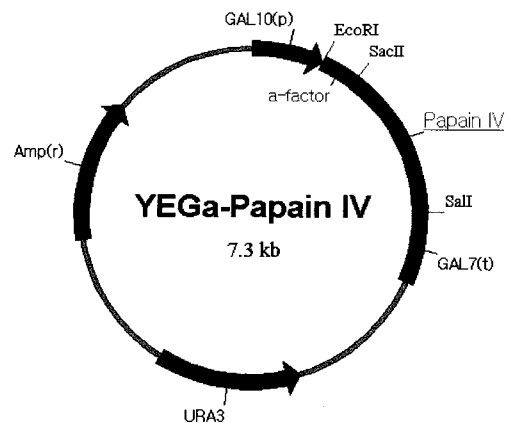


Figure 2. Papain expression vector map used in cloning.

**음이온 안정성 papain 유전자를 얻기 위한 분자진화의 방법 개발 및 조건 확립**

Error prone PCR 방법과 DNA shuffling을 통하여 분자 진

화를 수행하였다. 그 결과 음이온 안정성 papain 유전자를 획득할 수 있었다.

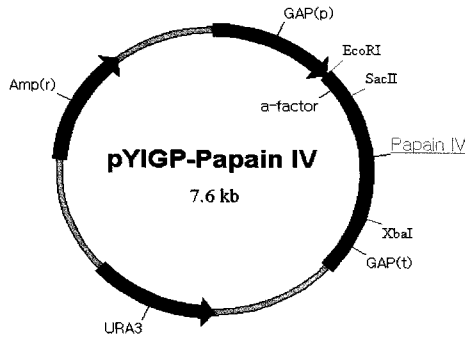


Figure 3. Papain expression vector map used in cloning.

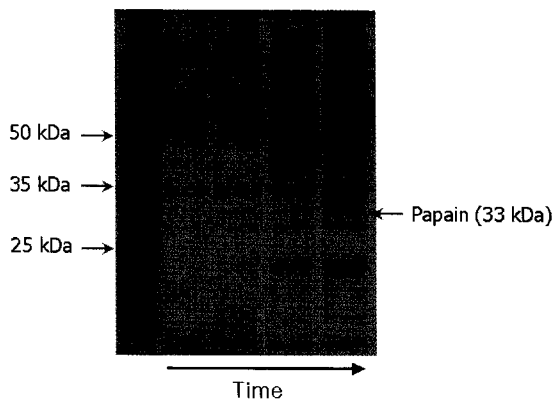
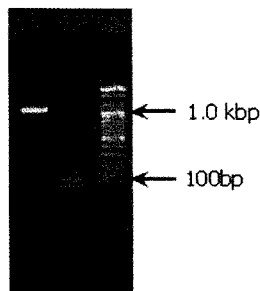


Figure 4. Papain expression of SDS-page gel.



Lane 1 : Papain gene  
Lane 2 : Papain DNase I digestion  
Lane 3 : 100bp DNA ladder

Figure 5. DNase I digestion.

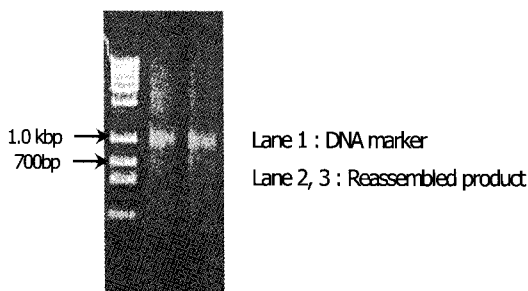


Figure 6. Fragment reassembly without primer.

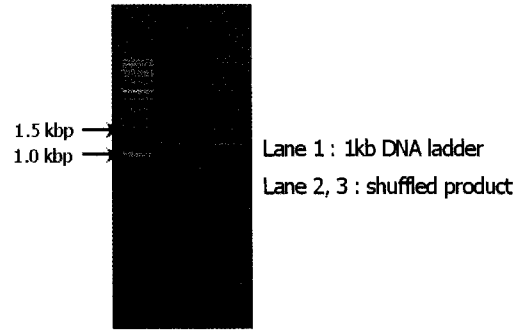


Figure 7. PCR amplification of reassembled products.

**분자진화된 음이온 안정성 papain의 효율적 스크리닝 방법 개발**

Skim milk agar plate를 이용하여, 활성 및 안정성이 뛰어난 개량형 papain의 screening 방법을 개발하여 분자진화된 음이온 안정성 papain의 Colony를 획득할 수 있었다. Colony선별은 Fig. 8과 같다.

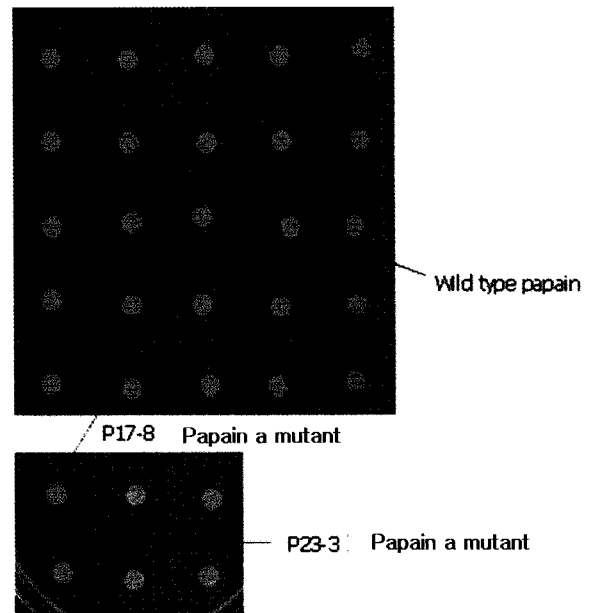


Figure 8. Screening method for skim milk analysis confirmation that use with filter paper of agar plate.

Error prone된 파파인 생산균주의 발현 배양액을 paper disk에 떨어뜨린 결과 활성이 증가된 colony의 경우 clear zone이 다른 colony에 비하여 선명함을 확인하였고 선택된 균주에 대해서 flask로 배양하여 skim milk agar plate (skim milk 0.5%)에서 재확인하였다. Error prone하여 얻어진 변이체에 대해서도 동일한 실험으로 O.D 값을 측정하여 Papain과 비교분석하여 정량하였다. 분석 결과는 Fig. 9, 10에 나타내었다.

**분자진화에 의한 음이온에 안정한 개량형 파파인 screening 방법 개발**

음이온성 고분자물질과 계면활성제 중 대표적으로 사용

되는 3가지 시약 polyacrylamide, polyacrylic acid, polysorbate 를 대상으로 실험하였다. Skim milk agar plate (skim milk 0.5%)에 각각의 음이온시약과 계면활성제를 1%를 첨가하여 사용하였다. 분자 진화된 개량형 papain library들이 발현한 배양액 20  $\mu$ l에 음이온 물질을 1% 첨가하여 30 hr 동안 방치한 후 이를 paper disk 위에 떨어뜨려 clear zone 을 확인하였다.

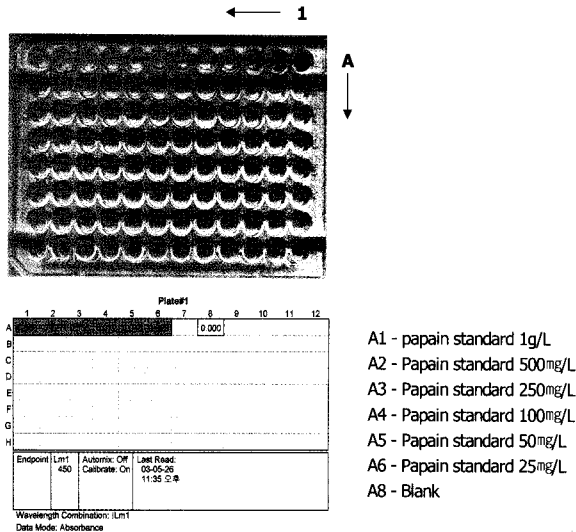


Figure 9. Papain quantitative analysis using casein.

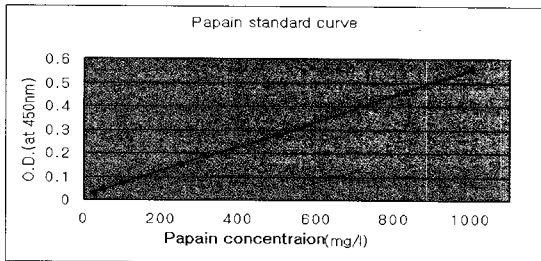


Figure 10. Papain standard curve.

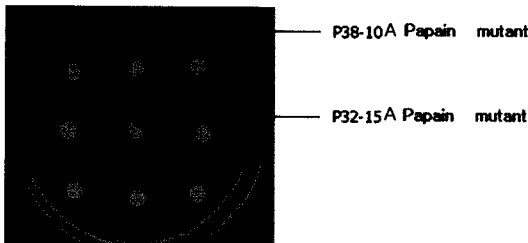


Figure 11. Papain mutant.

음이온이 첨가된 skim milk agar plate에서 clear zone을 형성하는 파파인 생산 균주에 대해서 casein 활성 측정법으로 활성감소율을 측정하였고 선택된 분자 진화된 개량형 papain 발현된 상등액을 20X 희석하여 음이온의 최종농도가 1%가 되도록 조제하였다. 음이온 첨가 후 5 hr, 10 hr, 15 hr, 20 hr, 24 hr, 30 hr, 35 hr 동안 각각 방치하여 sample을 취한 후 음이온을 넣지 않은 배양액을 control 100%로 하였을 때 음이온 첨가시의 활성을 %로 나타내었다.

정량분석방법에 의한 음이온 Polyacrylamide 첨가시 papain의 안정성 test는 Fig. 12과 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Polyacrylamide stability test

exposure time (h)	activity (%)		
	kind of mutant papain P38-10	P32-15	Wild type
0	100*	100*	100*
5	88	69.2	60.0
10	75.3	54.2	33.5
15	65.3	45.9	19.2
20	57.69	40.2	12.6
25	50.77	34.9	8
30	45.26	31.74	5.7
35	41.99	28.02	2.7

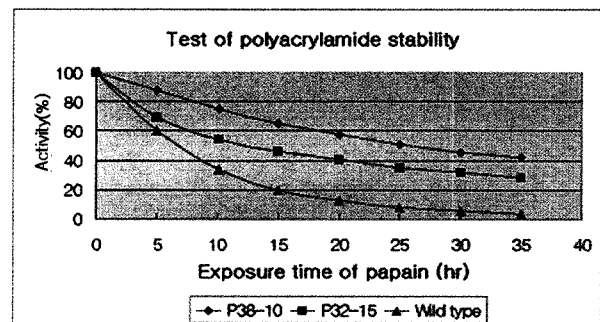


Figure 12. Polyacrylamide stability test.

Table 3. Polyacrylic stability test

exposure time (h)	activity (%)		
	kind of mutant papain P38-10	P32-15	Wild type
0	100*	100*	100*
5	81.8	69.56	56.3
10	68.18	52	37.7
15	60.2	41.23	26.8
20	53.6	35.6	17.9
25	49.1	30.43	12.5
30	44.6	26.77	7.5
35	40.8	22.94	4

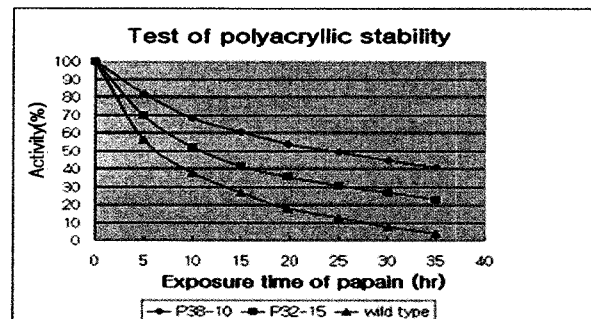


Figure 13. Polyacrylic stability test.

각 개량형 papain 변이체와 wild type papain을 대상으로 음이온 (polyacrylamide)을 첨가하지 않았을 때의 활성을 각각 100%로 기준 삼고 음이온 첨가시 노출시간 기준으로 활성의 감소를 측정하였다. 분자진화방법에 의하여

Polyacrylamide 첨가시 안정성을 지니는 개량형 papain을 얻고자 screening한 결과 skim milk plate에서 크고 선명한 clear zone을 형성하는 두가지 개량형 papain candidate을 얻어 실제 activity test를 수행하였다. 이 결과 음이온 첨가 35시간 경과 후에는 wild type의 papain 활성이 100%에서 약 2.7%로 감소된 반면 P38-10과 P32-15의 개량형 papain은 활성이 각각 100%에서 41.99%와 28% 정도로 활성감소가 되었음을 알 수 있었다. 이 결과는 P38-10의 경우 wild type과 비하여 음이온 첨가 후 약 35시간에서 측정된 결과 활성이 약 15배 정도로 유지됨을 확인하였으며 P32-15는 wild type에 비해 약 10배 정도로 유지됨을 확인하였다.

정량분석법에 의한 음이온 Polyacrylic acid 첨가시 papain의 안정성 test는 Fig. 13, Table 3에 나타내었다.

음이온을 넣지 않은 각각의 papain 배양액을 100%를 기준으로 각 개량형 papain 변이체와 wild type papain을 대상으로 음이온 (polyacrylic acid)을 첨가하지 않았을 때의 활성을 각각 100%로 기준삼고 음이온 첨가시 노출시간 기준으로 활성의 감소를 측정하였다. Polyacrylic acid 첨가 후 35시간 경과 시 wild type의 papain 활성이 100%에서 4%로 감소된 반면 P38-10과 P32-15의 개량형 papain 활성은 각각 100에서 40.8%와 100에서 22.94%로 활성감소가 줄어들음을 알 수 있었다. 이 결과 P38-10의 경우 wild type에 비하여 음이온 존재시 35시간 후에는 활성이 10.2배 유지되며, P32-15는 wild type에 비해 약 5.7배 유지됨을 확인하였다.

정량분석법에 의한 음이온 Polysorbate에 첨가 시 papain의 안정성 test는 Fig. 14와 Table 4에 각각 나타내었다.

Table 4. Polysorbate stability test

kind of mutant papain exposure time (h)	activity (%)		
	P38-10	P32-15	Wild type
0	100	100	100
5	84	76	66.6
10	70.37	56	46.3
15	59.259	44.9	32
20	52.5	38.5	21
25	46.8	33.6	13.6
30	43	28.3	7.2
35	40.4	25.3	4

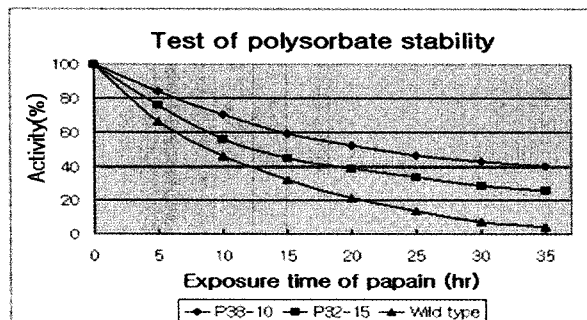


Figure 14. Polysorbate stability test.

각 개량형 papain 변이체와 wild type papain을 대상으로 음이온 (Polysorbate)을 첨가하지 않았을 때의 활성을 각각

100%로 기준삼고 음이온 첨가시 노출시간 기준으로 활성의 감소를 측정하였다. Polyoxyethylenesorbitan monooleate 첨가 후 35시간 경과 시 wild type의 papain 활성이 100%에서 4%로 감소된 반면 P38-10과 P32-15의 개량형 papain 활성은 각각 100에서 40.4%와 100에서 25.3%로 활성감소가 줄어들음을 알 수 있었다. 이 결과 P38-10의 경우 wild type에 비하여 음이온 존재 시 35시간 후에는 활성이 10배 유지되며, P32-15는 wild type에 비해 약 6배 유지됨을 확인하였다.

결과적으로 음이온 물질에 의하여 파파인의 활성이 매우 저해됨을 알 수 있었고, 특히 35 hr 정도 음이온에 노출되었을 때 wild type의 파파인은 그 활성이 거의 대부분 없어지는 것으로 확인되었다(2~4% 활성만 잔류). 그러나 본 분자진화방법에 의하여 구한 P32-15, P38-10 개량형 papain 변이체의 경우는 이러한 음이온 첨가 후 35시간이 경과 후 wild type에 비해 활성이 10-15배 정도로 높게 유지됨을 알 수 있었다.

**P32-15 파파인 변이체의 papain 유전자 sequence 분석**

P32-15에 대해서 sequencing을 한 결과 전체 1047개의 염기 서열 중 7개가 바뀌었으며, 이 중에서 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 5개이었고, 이로 인해 4개의 아미노산의 서열이 바뀐 것을 알 수 있었다.

33 Y(TAT) → P(CCT)      105 K(AAG) → T(ACG)  
247 S(TCA) → T(ACA)      306 Y(TAT) → N(AAT)

**P38-10 파파인 변이체에 대한 sequence 분석**

P38-10에 대해서 sequencing을 한 결과 전체 1047개의 염기 서열 중 9개가 바뀌었으며, 이 중에서 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 7개이었고, 이로 인해 6개의 아미노산의 서열이 바뀐 것을 알 수 있었다.

29 S(TCT) → F(TTT)      35 Q(CAA) → P(CCC)  
36 D(GAT) → H(CAT)      104 F(TTC) → L(CTC)  
184 E(GAA) → D(GAC)      260 Q(CAA) → P(CCA)

**분자진화된 제조합 파파인의 생산방법 확립**

고농도 세포배양을 통한 분자진화 기술에 의하여 얻어진 음이온에 안정한 papain의 최적 발현 방법 개발하였다. Fed-batch 방법은 2-stage 방법으로 초기 성장 구간에서는 glucose, YE만 가지고 배양한 후 expression 구간에서 galactose, glucose, YE로 바꾸어 하여 실험을 하였다.

이 경우 최종 O.D는 약 90 정도이며 파파인의 발현량은 약 0.4 g/L 수준임을 확인하였다.

Papain의 정제 방법을 확립하기 위해 파파인의 일차분리에 ammonium sulfate를 이용한 침전법을 사용하였다. 파파인의 분자량은 33 kDa이며, silver gel 상에서 순수한 발현 band를 확인하였다.

## 요 약

이 연구의 최종 목표는 방향성 분자진화기술 (directed molecular evolution)을 이용한 음이온에 안정한 papain의 개발이다. 음이온 안정성 papain 생산을 위한 유전자의 방향성 분자진화 방법 개발이 이루어졌으며 분자진화된 음이온 안정성 papain의 스크리닝 방법 개발됐다. 분자진화된 papain의 아미노산 서열 및 특성 분석과 분자진화된 재조합 papain의 생산방법 확립되었다. 분자진화된 재조합 papain의 formulation 및 제품 적용화 기술 개발이다. 연구 결과 Papain petidase IV 유전자의 확보 및 발현 균주 개발하였고 음이온 안정성 papain 유전자를 얻기 위한 분자진화의 방법 개발 및 조건 확립하였다. 분자진화 방법으로 error prone PCR 방법 확립, DNA shuffling을 통한 mutagenesis 방법 확립, staggered extension process 방법 확립 및 분자 진화된 음이온성 안정성 papain의 효율적 스크리닝 방법 개발하였다. Skim milk agar plate 이용, 활성 및 안정성이 뛰어난 개량형 papain을 Filter paper방법을 이용하여 screening 방법을 개발하였다.

## 감 사

본 연구는 보건 의료 기술 연구 개발사업 (과제번호 02-PJ1-PG11-VN01-SV05-0008)의 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Zhao Humin and Lori giver (1998), Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination, *Nature biotechnology* **16**, 258-261.
2. Zhao Humin and Frances H. Arnold (1997), Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination, *Nucleic acids research* **25**(6), 1307-1308.
3. Zhang Ji-hu and Glenn Dawes (1996), Directed Evolution of fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **94**(9), 4504-4509.
4. Xian Ming and Xinchao Chen (2000), Inhibition of papain by s-nitrosothiols, *Biological chemistry* **275**(27), 20467-20473.
5. Bubins, W. A. and Ofner (1992), The determination of e-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous material by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. biochem.* **207**, 129-133.