

소프트콘택트렌즈 단백질제거제의 효능 평가법 분석

변현영^a, 성형경^a, 원혜림, 심지인, 박미정, 김소라*

서울과학기술대학교 안경광학과

투고일(2014년 1월 31일), 수정일(2014년 3월 3일), 게재확정일(2014년 3월 15일)

목적: 본 연구에서는 콘택트렌즈 단백질제거제 개발 시 요구되는 단백질 제거효능의 적절한 평가를 위한 시험법을 확립하고 이를 실제 콘택트렌즈에 침착된 단백질의 제거효율을 측정할 결과와 비교, 분석하여 단백질제거제의 효능 평가법으로 제시하고자 하였다. **방법:** 대한약전에 제시된 단백질화력 시험법을 이용하여 파파인, 판크레아틴, 셉틸리신 A 및 프로테아제와 각각의 효소가 포함된 단백질제거 정 또는 용액의 효능평가에 적절한 시험조건을 찾고자 하였다. 또한, balafilcon A 재질 렌즈에 인위적으로 침착시킨 단백질을 시판되고 있는 단백질제거 정 또는 용액으로 제거하여 세척효율을 확인하고 이들 방법의 상관관계를 분석하였다. **결과:** 판크레아틴과 판크레아틴 함유 제품의 경우 단백질화력 시험법으로 평가하였을 때 둘 다 약전에서 제시하는 판크레아틴 단백질화력 기준값인 28 IU/mg를 충족하였다. 프로테아제와 삼염화아세트산 B 용액으로 실험한 셉틸리신 A의 경우는 단백질화력 시험법으로 평가하였을 때 제조사에서 제시한 효소활성 값을 충족하였으나, 파파인과 삼염화아세트산 A 용액으로 실험한 셉틸리신 A는 제조사에서 제시된 효소활성 값에 해당하는 단백질화력이 측정되지 않았다. 시판되는 단백질제거제의 경우 판크레아틴을 함유한 제품을 제외한 나머지 세 가지 제품은 단백질화력 시험법으로는 제조사에서 명시한 효소들의 단백질 효소활성 값을 확인할 수 없었다. 그러나 실제 렌즈에 침착된 단백질의 제거정도를 측정하였을 때에는 파파인을 함유한 제품을 제외한 3종의 단백질제거제는 모두 90%가 넘는 단백질 제거효율을 보였다. 파파인 함유 단백질제거제의 경우 단백질화력 시험법으로는 효능 측정이 불가능하였으나 실제 렌즈에 침착된 누액단백질 제거효율은 73.72%에 이르렀다. **결론:** 본 연구결과로 콘택트렌즈 단백질제거제의 효능은 함유되어 있는 단백분해효소의 종류에 따라 시험법을 달리하여 평가되어야 함을 확인할 수 있었다. 즉, 판크레아틴, 프로테아제, 셉틸리신 A를 함유하는 단백질제거제는 단백질화력 시험법과 단백질제거효율 측정법으로 효능평가가 가능하고, 파파인을 함유하는 단백질제거제의 평가는 콘택트렌즈를 이용한 단백질제거효율 측정법만이 효율적임을 제안할 수 있다.

주제어: 단백질제거제, 단백질화력, 판크레아틴, 프로테아제, 셉틸리신 A, 파파인

서 론

콘택트렌즈의 이용률은 시력교정이나 미용의 목적으로 점점 증가하고 있다. 콘택트렌즈는 눈물층을 매개로 하여 각막 표면에 직접 닿게 되는데 이 때 누액의 여러 성분들이 렌즈착용시간과 렌즈의 재질에 따라 콘택트렌즈 표면이나 내부에 침착되게 된다. 콘택트렌즈의 침착물은 주로 지방, 칼슘, 단백질 침착물 등이 있는데 단백질 침착물의 경우 렌즈재질의 특성에 따라 렌즈 표면에 강하게 결합하여 제거가 어렵다. 예를 들어 음전하를 띠는 렌즈 표면을 가진 소프트렌즈의 경우 누액 속 단백질 중 양전하를 띠는 라이소자임과 강하게 결합하게 된다. 라이소자임은 렌즈 표면에 부착될 뿐만 아니라 분자량이 14.5 kDa로^[1,2] 작

아 콘택트렌즈 pore로도 침투되어 침착물을 형성한다. 이러한 누액단백 침착물은 시야흐림, 충혈, 자극감, 착용감 저하, 산소투과도 감소, 유두결막염, 미생물 증식과 같은 문제점을 유발한다.^[1] 최근 여러 단계를 거칠 필요 없이 편리하게 콘택트렌즈를 세척, 소독 및 보존까지 할 수 있는 다목적 용액이 많이 사용되고 있지만 다목적용액에 포함된 계면활성제만으로는 렌즈에 강하게 결합되는 단백질 침착물을 효과적으로 제거할 수 없다. 일정기간 사용하는 렌즈의 경우 반복적인 세척으로 표면의 단백질들은 제거할 수 있지만 남아있는 잔여물이나 용액 속 화학물질로 인해 변성되는 단백질들은 렌즈와 강하게 결합하게 된다.^[3] 따라서 일정기간 사용하는 렌즈의 경우는 단백질분해효소를 함유하는 단백질제거제의 주기적인 사용이 요구된다.

*Corresponding author: So Ra Kim, TEL: +82-2-970-6264, E-mail: srk2104@seoultech.ac.kr

^a본 연구 수행에 있어 동등하게 기여하였음

※본 논문의 일부내용은 2013년도 한국안광학회 동계학술대회에서 포스터로 발표되었음

단백질제거제는 증량제(bulking agent), 거품형성제, 완충용액, 유효제 등이 함유되어 있으나 주성분은 단백질분해 효소이며, 현재 단백질제거제에 사용되는 효소는 파파인, 판크레아틴, 썩틸리신 A 및 프로테아제 등이 있다.^{13,4)} 이들 효소들의 단백질 분해작용은 pH, 온도 및 처리시간에 따라 크게 달라질 뿐만 아니라 렌즈 재질의 종류에 따라 서로 달라지므로 효능 평가를 위해서는 적절한 시험조건이 요구된다.¹³⁾

현재 미국이나 유럽뿐 만 아니라 우리나라를 포함하여 콘택트렌즈 관리용품이 유통되고 있는 모든 나라에서 단백질제거제의 단백질 제거효능에 대한 효율적인 시험법이나 평가기준은 제시되어 있지 않은 실정이다. 그러나 콘택트렌즈 착용자의 증가에 따라 올바른 렌즈 관리에 대한 중요성 또한 강조되므로 관리용품의 효능에 대한 적절한 평가가 필요하다. 이에 식품의약품안전처에서는 콘택트렌즈에 강하게 침착된 단백질을 제거하는 목적의 단백질제거제의 효능 평가를 위한 가이드라인을 제시하고자 하였다. 본 연구에서는 콘택트렌즈 단백질제거제를 개발하고자 할 때 단백질 제거효능을 가장 효율적으로 평가할 수 있는 방법을 제시하기 위하여 준비과정이나 시험시간이 오래 소요되지 않는 장점을 가진 대한약전 기재의 ‘단백소화력 측정법’을 콘택트렌즈 단백질제거제의 효능평가에 적용하고자 하였다.¹⁵⁾ 또한 확립된 단백질소화력 측정법을 통한 단백질제거제의 효능 평가결과를 렌즈에 인위적으로 단백질을 침착시킨 후 단백질제거제를 이용하여 이를 제거한 후 렌즈에 남아있는 단백질을 정량하는 시험법의 결과와 비교하여 두 방법 간의 상관관계를 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

현재 콘택트렌즈 단백질제거제의 구성성분으로 사용되고 있는 효소로는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, USA)의 파파인(from papaya latex), 판크레아틴(from porcine pancreas), 썩틸리신 A(Type VIII: bacterial from *Bacillus licheniformis*), 프로테아제(from *Streptomyces griseus*)를 구입하여 사용하

였으며, 각각의 원료가 포함된 ‘I’사의 O제품, ‘II’사의 B제품, ‘III’사의 Z제품, ‘IV’사의 L제품을 실험대상으로 선정하였다(Table 1). 기타 시약은 Sigma-Aldrich사의 1급 및 특급시약을 구입하여 사용하였다.

2. 단백질소화력 시험법

대한민국 약전(식약처고시 제2012-129호)¹⁵⁾에 명시되어 있는 ‘일반시험법’ 중 ‘소화력시험법- 단백질소화력 시험법’의 방법으로 실험하였다.

1) 기질용액의 조제

건조된 유제카제인으로 기질용액 1 및 2를 조제하였다. 기질용액 1은 락트산시액 및 물에 카제인을 넣고 가온하여 녹였으며, 기질용액 2는 0.05 mol/l 인산수소이나트륨시액 및 물을 넣고 가온하여 녹인 후 식힌 다음 각각 총 200 ml이 되도록 물을 더하였다.

2) 침전시액의 조제

삼염화아세트산 A용액은 삼염화아세트산 7.2 g에 물 100 ml을 넣어 조제하였고, 삼염화아세트산 B용액은 삼염화아세트산 1.8 g에 6 mol/l 아세트산시액 5.5 ml을 넣은 후 물을 가하여 총 100 ml이 되도록 하였다.

3) 기질에 효소검액을 반응시킨 후 흡광도(A_T) 측정

기질용액 5 ml에 각 효소 검액 1 ml를 넣어 37±0.5°C에서 10 분간 반응시킨 후 침전시액 5 ml를 넣어 반응을 중지시키고 30 분간 방치한 후 여과하였다. 여액 2 ml를 취하여 0.55 mol/l 탄산나트륨시액 5 ml 및 폴린시액 1 ml를 각각 넣어 흔들어 섞은 후 항온조에서 다시 30 분간 방치하고 660 nm에서 흡광도(A_T)를 측정하였다.

4) 기질과 효소검액을 반응시키지 않은 대조군의 흡광도(A_B) 측정

각 효소검액 1 ml에 침전시액 5 ml를 섞은 후 기질용액 5 ml를 넣어 흔들어 섞고 37±0.5°C에서 30 분간 방치 후 3)과 동일한 과정을 거쳐 흡광도(A_B)를 측정하였고 이를 대조군으로 하였다.

Table 1. Proteolytic enzymes in protein removal agents and experimental condition

Protein removal agents	Proteolytic enzyme	Experimental condition
‘I’ company – product O	pancreatin	substrate 2 solution + trichloroacetic acid B
‘II’ company – product B	subtilisin A	substrate 2 solution + trichloroacetic acid A, B
‘III’ company – product Z	papain	substrate 2 solution + trichloroacetic acid A, B
‘IV’ company – product L	protease	substrate 2 solution + trichloroacetic acid A, B

5) 티로신 검량선 작성

단백질분해효소에 의해 카제인으로부터 생성된 티로신의 검량선을 구하기 위하여 티로신 용액의 흡광도 A1, A2, A3 및 A4를 측정하여 세로축에 흡광도를 가로축에 각각의 티로신 시험액에 함유된 티로신 양(μg)을 대응하여 검량선을 작성하고 흡광도차가 1일 때의 티로신의 양(μg)을 구하였다.

6) 단백질화력 계산

각 단백질분해효소의 단백질화력(단위/g 효소)은 아래의 식에 따라 결정하였다.

$$\text{단백소화력} = (A_T - A_B) \times F \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{M}$$

A_T : 카제인과 효소검액 반응시 흡광도

A_B : 대조군의 흡광도

M : 효소검액 1 ml 중 효소의 양(g)

F : 티로신 검량선에서 구한 흡광도 차가 1일 때 티로신의 양(μg)

3. 단백질 제거제 및 다목적 용액을 이용한 콘택트렌즈에 침착된 단백질 제거효율 측정

Balafilcon A 렌즈(Table 2)^[6,7]를 실제 누액과 같은 농도로 제조된 인공누액^[8]에 1주일동안 침착시킨 후 단백질제거 정 또는 용액을 이용하여 다음과 같이 각 제조회사 지침에 따라 단백질을 제거한 후 식염수로 렌즈에 결합되지 않은 단백질을 세척하였다.

① O제품을 이용한 단백질 제거: 렌즈 케이스에 식염수를 4 ml를 넣은 뒤, O제품을 1방울 씩 떨어뜨린 후 6시간 동안 담가 단백질을 제거하였다.

② B제품을 이용한 단백질 제거: RGP렌즈 케이스에 동일회사의 렌즈 보관액을 9할 채워 넣은 후 렌즈 당 2방울 씩 떨어뜨려 잘 섞어준 후 4시간동안 담가두어 단백질을 제거하였다.

③ Z제품을 이용한 단백질 제거: 식염수를 5 ml 채운 컵에 Z제품 1정을 넣어 완전히 용해시킨 후 렌즈를 넣고 15분간 담가두어 단백질을 제거하였다.

④ L제품을 이용한 단백질 제거: RGP렌즈 케이스에 렌즈 보관액을 9할 채워 넣은 후 렌즈 당 1방울 씩 떨어뜨린 후 살짝 흔들어 주고 1시간 동안 담가 단백질을 제거하였다.

제거되지 않고 콘택트렌즈에 남아있는 단백질은 Lowry 방법을 사용하여 정량하고 각 단백질제거제의 단백질 제거효율을 계산하였다.^[9] 각 단백질제거제의 단백질 제거효율은 동일한 실험조건 하에서 다목적용액(ReNu Fresh, Bausch & Lomb Inc.)을 이용한 단백질 제거효율과 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 단백질분해효소 및 단백질제거제의 단백질화력 측정

약전에 제시되어 있는 단백질화력 측정법은 소화제로 사용되는 단백질분해효소의 효능비교를 위해 제안된 방법이나 단백질분해효소의 효능을 평가하는 일반적인 방법이 기도 하다. 그러나 약전에는 판크레아틴 평가를 위한 조건만 제시되어 있어 본 연구에서는 콘택트렌즈 단백질제거제의 성분으로 사용되는 다른 효소들의 효능 측정도 가능한가를 검토하여 보았다.

약전에서 제시하고 있는 기질용액 1의 pH를 측정한 결과 2 정도의 강산으로 효소용액과 혼합 시 효소활성에 적절한 pH로 알려진 6.2~8.8의 범위를 맞추기가 용이하지 않아 콘택트렌즈 단백질제거제의 단백질화력 평가에는 적절치 않은 것으로 판단되어 기질용액 1은 이후 실험에서는 제외하였다. 기질용액 2의 pH는 약 7 정도로 각 효소의 적정 pH로 조정이 가능하여 판크레아틴은 pH 8.5, 프로테아제는 pH 8.8, 셉틸리신 A는 pH 7.5, 파파인은 pH 6.2로 각각 조절하여 실험을 진행하였다.

판크레아틴은 약전에 제시되어 있는 실험조건인 삼염화아세트산 B 용액만으로 효소 활성을 측정하였을 때 110.69 ± 5.07 IU/mg의 단백질화력 활성을 나타내었으며, 이는 약전에 명시된 최소 기준 28 IU/mg^[10] 이상을 충족하는 결과이었다. 판크레아틴 이외의 다른 세 가지 효소에 대한 조건은 확립되지 않은 상태이므로 단백질화력 측정을 위한 삼염화아세트산 A와 B 용액의 적합성을 평가하였다(Fig. 1). 프로테아제 효소 용액의 경우 삼염화아세트산 A 용액 사용 시에는 6.62 ± 0.44 IU/mg, B 용액을 사용한 경우 10.31 ± 0.28 IU/mg으로 단백질화력이 측정되어, 제조사에서 제시한 효소활성기준인 최소 4 IU/mg을 모두 충족하는 결과를 나타내어 단백질화력 측정법으로 효능평

Table 2. The general property of tested contact lens

Proprietary Name	Purevison 2HD ^[6,7]
USAN	balafilcon A
Manufacturer	Bausch & Lomb
FDA group	III
Water content(%)	36
Base curve(mm)	8.9
Diameter(mm)	14
Modulus(MPa)b	1.06
Recommended replacement schedule	4 weeks

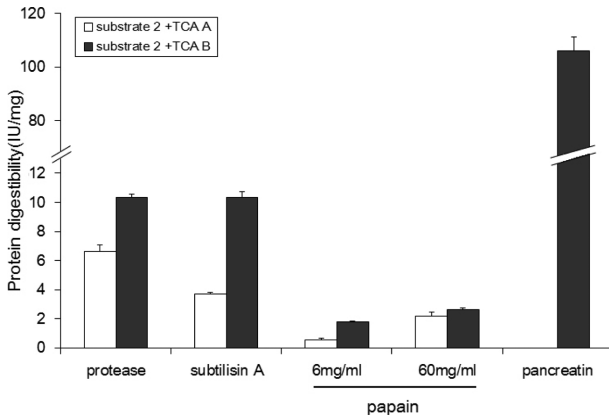


Fig. 1. Protein digestibility of proteolytic enzymes in protein removal agents.

가가 가능한 것으로 판단되었다. 썩틸리신 A의 단백소화력은 삼염화아세트산 A 용액을 사용하였을 때 3.72 ± 0.1 IU/mg로, 삼염화아세트산 B 용액을 사용하였을 때는 10.35 ± 0.36 IU/mg로 각각 측정되어 삼염화아세트산 B 용액을 사용하였을 때만이 제조사에서 제시하는 효소활성 값인 최소 10 IU/mg에 해당하는 값이 측정됨을 확인하였다. 파파인의 경우는 삼염화아세트산 A 용액을 사용 시에는 1.10 ± 0.14 IU/mg, 삼염화아세트산 B 용액을 사용하였을 경우 2.16 ± 0.15 IU/mg의 단백소화력을 나타내어 제조사에서 제공하는 효소활성 값인 10 IU/mg를 충족하지 못하였다(Fig. 1).

이러한 결과의 원인은 각 효소들의 특징에 있다고 할 수 있다.^[11-13] 판크레아틴은 아밀라아제, 리파아제 및 프로테아제로 이루어진 효소 복합체로 아미노산의 종류에 특이적으로 작용하지 않으며, 프로테아제 역시 단백질과 펩티드의 가수분해효소를 총칭하는 효소이므로 비교적 높은 단백소화력이 측정된다. 한편 썩틸리신 A는 세린 내 펩티드 가수분해효소이나 카제인에는 세린이 함유되어 있기 때문에 단백소화력이 측정가능하다. 그러나 파파인 경우는 시스테인 펩티드 가수분해효소인데 본 시험법에서 기질로 사용된 카제인은 시스테인의 함량이 높지 않아 파파인의 단백질 분해능이 충분히 나타나지 않은 것으로 사료된다.

따라서 콘택트렌즈 단백질제거제 개발 시 주 성분인 단백질분해효소의 효능정도를 제시하고자 할 때 그 효소가 판크레아틴, 썩틸리신 A 및 프로테아제인 경우에는 적절한 침전시약을 선택한다면 약전에 기재되어 있어 이미 검증된 방법으로 비교적 간단한 단백소화력 시험법을 이용하여 효소의 단백분해 효능으로 단백소화력을 제시하는 것이 가능하다. 그러나 단백질제거제의 주성분으로 파파인을 사용하고자 할 때에는 단백소화력 시험법으로는 그

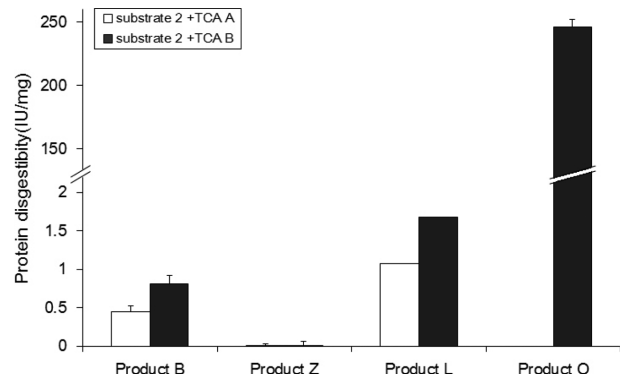


Fig. 2. Protein digestibility of protein removal tablets and solutions for contact lens.

효능을 적절히 제시할 수 없음을 의미한다.

다음으로는 단백질분해효소가 함유된 국내 유통 단백질제거제를 대상으로 단백소화력 시험법으로 단백소화력을 측정하였다. 그 결과 판크레아틴이^[10] 포함된 단백질제거용액 O제품은 약전에 명시된 활성 pH인 8.5, 기질 2용액 및 삼염화아세트산 B 용액을 사용하였을 때 251.47 ± 5.66 IU/mg의 단백소화력을 나타내어 28 IU/mg보다 약 4 배 높은 단백소화력을 가짐을 알 수 있었다. 프로테아제를 주성분으로 한 L제품은 삼염화아세트산 A 용액을 사용했을 때 1.07 ± 0.08 IU/mg, B 용액을 사용했을 때 1.68 ± 0.11 IU/mg의 단백소화력을 가져 삼염화아세트산 A, B 용액 모두 2 IU/mg 미만으로 O제품에 비해 낮은 단백소화력이 측정되었다. 썩틸리신 A를 주성분으로 한 B제품의 단백소화력은 삼염화아세트산 A 용액을 사용했을 때 0.44 ± 0.03 IU/mg, B 용액을 사용했을 때 0.81 ± 0.06 IU/mg로 나타났으며, 삼염화아세트산 A, B 용액 모두 1 IU/mg 미만으로 낮은 효소 활성이 측정되었다. 파파인을 주성분으로 한 Z제품의 단백소화력은 삼염화아세트산 A, B 용액 모두에서 0 IU/mg으로 나타났다(Fig. 2). 삼염화아세트산 A 용액과 B 용액의 실험값을 비교해보면 판크레아틴을 제외한 세가지 효소 모두 기질 2용액 + 삼염화아세트산 B 용액의 실험조건에서 더 높은 단백소화력을 보였다. O제품을 제외한 세가지 제품 모두 기질 2용액 + 삼염화아세트산 B 용액의 실험조건에서 더 높은 단백소화력을 보였으며, L제품의 경우 약 1.57배, B제품은 약 1.82배, Z제품은 약 2.11배 차이가 나타났다.

이상의 결과에서 각 효소가 함유된 단백질제거 정 또는 용액의 경우 판크레아틴을 포함한 O제품을 제외한 세 제품 모두 제시된 효소활성 값을 충족하지 못하는 것으로 나타났으며, 특히 파파인을 포함한 Z제품의 경우 0 IU/mg의 효소활성 값을 나타내었는데 이는 파파인효소 자체를 이용하여 실험하였을 때와는 달리 거의 측정되지 않는 단

백소화력 값을 보였다. 그러나 이러한 결과로부터 판크레아틴을 함유하는 O제품의 단백질제거효능이 다른 효소를 함유하는 단백질제거제보다 월등히 우수하다고 판단하기에는 무리가 있다. 그 이유로는 단백질분해효소 자체만으로 평가했을 때보다 낮은 농도의 효소가 단백질제거제에 함유되어 있을 가능성을 들 수 있으며, 단백질제거제의 제조에 사용되는 여러 다른 제제들이 효소활성에 미치는 영향을 완전히 배제할 수 없기 때문이다. 따라서 단백질제거제의 원료로서 각 단백질분해효소의 효능(파파인 제외)은 단백질소화력 시험법 결과로 제시가 가능하나, 제조가 완료된 상태의 단백질 제거제의 경우 단백질 제거효능은 단백질소화력 시험법으로 적절히 평가되지 못함을 알 수 있었다.

2. 콘택트렌즈에 침착된 단백질 제거효과 측정

단백소화력 시험법으로 평가한 콘택트렌즈 단백질제거제의 효능 정도를 실제 콘택트렌즈에 침착된 누액단백질의 제거효능과 비교하고자 하였다. 이를 위하여 balafilcon A 재질 렌즈를 7일간 인공누액에 침착시킨 후 단백질제거제를 처리하고 렌즈에 남아있는 단백질량을 정량하였다. Balafilcon A 재질 렌즈를 7일간 인공누액에 침착시켰을 때 렌즈에 침착된 단백질량은 $27.89 \pm 21.70 \mu\text{g}/\text{lens}$ 이었다. 판크레아틴을 함유한 O제품과 프로테아제를 함유한 L제품을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법으로 단백질을 제거한 결과 렌즈에 남아있는 단백질 양이 $0.00 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{lens}$ 로 두 제품 모두 단백질 제거효율이 100%임을 알 수 있었다. 셉틸리신 A를 함유한 B제품을 사용하여 단백질을 제거하였을 때에는 렌즈에 남아있는 단백질 양이 $2.68 \pm 5.98 \mu\text{g}/\text{lens}$ 로 측정되어 90.41%의 단백질이 제거됨을 확인하였다. 반면, 파파인이 주성분인 'III'사의 Z제품의 경우 렌즈에 남아있는 단백질 양이 $7.33 \pm 8.47 \mu\text{g}/\text{lens}$ 로 측정되어 73.72%의 단백질 제거효율을 보였다(Fig. 3). 반면 동일한 실험조건 하에서 다목적 용액인 ReNu를 사용하여 단백질을 제거하였을 때 그 효율은 약 8%가량으로 나타나 다목적용액보다는 단백질제거제의 단백질 제거효율이 통계적으로 유의하게 높은 것($p < 0.001$, protein removal agents vs multi-purpose solution by one-way ANOVA)으로 판단할 수 있었다.

단백질 제거목적으로 사용되는 다목적 용액이나 효소제의 단백질 제거효율은 렌즈의 재질 뿐만 아니라 침착되는 단백질의 종류, 침착량 등의 실험조건에 따라 달라진다. 즉, 셉틸리신 A 함유 단백질제거제의 단백질 제거효율을 조사한 박 등의 연구결과에 따르면 렌즈재질의 종류(etafilcon A, hilafilcon A 및 balafilcon A)나 침착된 단백질 양($190\text{--}680 \mu\text{g}/\text{lens}$)에 따라 18~38% 정도로 서로 상이하게 나타났다. 이러한 단백질 제거제의 단백질 제거효율

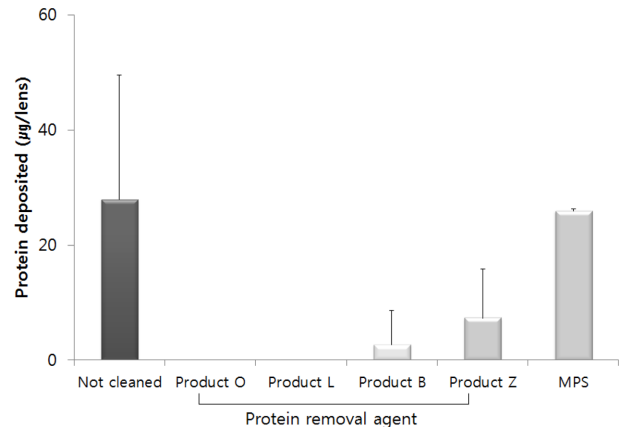


Fig. 3. Cleaning efficacy of protein removal tablets and solutions with balafilcon A lens.

을 다목적 용액의 효율과 비교하기 위하여 선행 연구결과들을 살펴보면 이 등^[14]의 연구에 따르면 실리콘하이드로겔 재질에 침착된 단백질 침착물을 2 종류의 다목적용액을 이용하여 제거하였을 경우 모두 10~29% 정도의 세척 효율을 보임을 알 수 있었다. 또한 Luensmann 등^[15]의 연구결과에 따르면 lysozyme과 albumin을 각각 balafilcon A 렌즈에 침착시킨 후 다목적용액으로 제거하였을 때 단백질 제거효율은 각각 58.4% 및 30.7%로 나타났다. 이렇듯 각 연구마다 연구조건이 달라 직접적인 비교하기에는 어려움이 있으나 연구결과들로 미루어 볼 때 동일한 조건이라면 다목적용액보다는 단백질제거제의 단백질 제거효율이 높은 것으로 생각할 수 있으며, 일정기간 이상 사용하는 콘택트렌즈의 경우 단백질제거제의 사용이 필요함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 단백질소화력 시험법과 실제 렌즈를 이용한 침착단백질 제거효율 검사법의 결과를 비교하면 판크레아틴 이외의 효소를 함유하는 제품인 L, B 및 Z는 단백질소화력 시험법에서는 높지 않는 효소활성 값을 나타내었으나 인공누액에 침착시킨 콘택트렌즈에 부착된 단백질을 제거하는 효능은 매우 우수함을 알 수 있었다. 즉, 단백질소화력 값이 $1.68 \pm 0.11 \text{ IU}/\text{mg}$ 인 프로테아제가 포함된 L제품도 balafilcon A재질에서는 100% 제거효율을 보였으며, 단백질소화력 값이 $0.81 \pm 0.06 \text{ IU}/\text{mg}$ 인 셉틸리신 A를 함유한 B제품도 동일 재질렌즈에서 90%가 넘는 단백질제거효율을 보였다. 파파인을 포함한 Z제품의 경우 카제인을 분해하지 못하여 단백질소화력은 $0 \text{ IU}/\text{mg}$ 으로 측정되었으나, balafilcon A 재질 렌즈를 이용한 실험에서는 단백질제거효율이 73.72%로 나타났는데 이는 단백질소화력 시험법에 사용되었던 기질인 카제인과 누액 단백질에 함유되어 있는 단백질에 차이가 있었기 때문인 것으로 생각할 수 있겠다. 누액의 대표적인 단백질은 라이소자임, 알부민

및 글로불린으로 이들 단백질에 포함된 아미노산을 살펴 보면 라이소자임은 129개의 아미노산으로, 글로불린은 각각의 아미노산이 동일한 비율로 구성되어 있으며, 천연 알부민의 경우엔 펩신으로는 분해가 가능하지만 트립신이나 파파인으로는 분해되기가 어려우나 변성된 알부민의 경우엔 어떠한 단백질가수분해효소를 써도 분해가 잘 된다는 특징을 가지고 있다.^[11-12] 따라서 다양한 아미노산의 조성으로 이루어진 누액단백질들의 분해능은 단백질분해효소의 효능 판단법인 단백소화력 시험법 단독으로는 정확하게 평가하기에는 무리가 있다고 생각되었다.

결 론

본 연구에서는 콘택트렌즈 단백질 제거제의 개발 시 단백질 제거효능을 효율적으로 평가할 수 있는 검사법을 개발하고자 대한약전에 기재된 단백질분해효소의 효능평가법인 '단백소화력 시험법'을 콘택트렌즈 단백질제거제 효능 평가에 적용하여 단백질분해효소 별로 적절한 실험조건을 확립하였으며, 단백질 제거제 원료로서의 단백질 분해효소(파파인 제외)의 효능을 효과적으로 평가할 수 있음을 밝혔다. 그러나 단백질분해효소를 포함하는 단백질 제거제 완제품(판크레아틴 함유 제품 제외)의 효능 평가에는 단백소화력 측정법 단독평가는 적절치 않은 것으로 판단되었다. 따라서 단백질 제거제 완제품인 경우에는 정확한 효능평가를 위하여 함유되어 있는 단백질분해효소의 종류에 따라 시험법을 달리하여 평가되어야 함을 제안할 수 있다. 즉, 판크레아틴, 프로테아제, 셉틸리신 A를 함유하는 단백질제거제를 개발할 시에는 '단백소화력 시험법'이나 콘택트렌즈를 이용한 '단백질제거효율 측정법'으로 효능평가가 가능하고, 파파인을 함유하는 단백질제거제 개발 시에는 콘택트렌즈를 이용한 '단백질제거효율 측정법'만을 이용한 결과가 제시되어야 함을 제안할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2013년 식품의약품안전처 용역연구개발과제(과제번호: 13172화장품462) 연구비로 수행되었습니다.

REFERENCES

- [1] Ju EH, Sung AY, Oh SJ, Lee KJ. The effect of protein deposit on the water content, oxygen transmissibility and contact angle of the soft contact lens. *Korean J Vis Sci.* 2010;12(4):291-302.
- [2] Jadi S, Heynen M, Luensmann D, Jones L. Composition of incubation solution impacts in vitro protein uptake to silicone hydrogel contact lenses. *Mol Vis.* 2012;18:337-347.
- [3] Park MJ, Chang JY, Shin YM, Kim DS. Factors in effecting the activities of the protein remover. *J Korean Oph Opt Soc.* 2005;10(2):91-97.
- [4] Woo Jeon Medical. BIOCLEN L-1, http://www.wjm.co.kr/ver2/product/product4_01.asp(29 Jan 2014).
- [5] The Korean Pharmacopoeia: General test method-Digestive power test, 10th ed. The Ministry of Food and Drug Safety, 2012, 149-151.
- [6] Subbaraman LN, Glasier MA, Senchyna M, Sheardown H, Jones L. Kinetics of in vitro lysozyme deposition on silicone hydrogel, PMMA, and FDA Groups I, II, and IV contact lens materials. *Curr Eye Res.* 2006;31(11):787-796.
- [7] Anorasko GJ, Ryen KA. A series of evaluations of MPS and silicone hydrogel lens combinations. *Rev Cornea Contact Lenses.* 2007:36-41.
- [8] Koo SB, Cho SB, Park MJ, Kim SR. The investigation on ultrasonic cleaning of soft contact lenses in local optical shops and the protein removal effect by lens containers. *J Korean Oph Opt Soc.* 2011;16(1):31-40.
- [9] Cookson C. Interference of zwitterionic biological buffers with the lowry method of protein determination. *Anal Biochem.* 1978;88(1):340-343.
- [10] The Korean Pharmacopoeia: Every article of medicine and medical supplies 1-pancreatin, 10th ed. The Ministry of Food and Drug Safety, 2012, 929-930.
- [11] Vernet T, Tessier DC, Chatellier J, Plouffe C. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease, papain. *J Biol Chem.* 1995;270(28):16645-16652.
- [12] Compilation Committee of Chemical Terminology. Dictionary of Chemical Terms. 1st Ed. Seoul: Iljinsa. 2003;97-776.
- [13] Kang YH. Encyclopedia of Life Science. 1st Ed. Seoul: Academyseojeok. 2008;159-1619.
- [14] Lee KJ, Kang YS. The amounts of protein deposits influenced by contact lens material and evaluation of the cleaning efficacy by care solution. *Korean J Vis Sci.* 2005;7(1):85-94.
- [15] Luensmann D, Heynen M, Liu L, Sheardown H, Jones L. The efficiency of contact lens care regimens on protein removal from hydrogel and silicone hydrogel lenses. *Mol Vis.* 2010;16:79-92.

[1] Ju EH, Sung AY, Oh SJ, Lee KJ. The effect of protein

Analysis of Evaluation Methods for the Efficacy of Protein Removal Agents for Soft Contact Lens

Hyun Young Byun^a, Hyung Gyeong Sung^a, Hye Lim Won, Ji In Shim, Mijung Park, and So Ra Kim*

Dept. of Optometry, Seoul National University of Science & Technology, Korea
(Received January 31, 2014; Revised March 3, 2014; Accepted March 15, 2014)

Purpose: The present study was conducted to establish the experimental condition for the proper evaluation of protein removal efficacy when developing protein removal agents. Its protein removal efficacy was further analyzed and compared with the result from protein removal efficacy against protein deposition on contact lens to suggest the evaluation method for efficacy of protein removal agents. **Methods:** Protein digestibility assay presented in the Korean pharmacopoeia was selected to establish the evaluation method for efficacy of papain, pancreatin, subtilisin A and protease itself as a ingredient and protein removal tablets or solution containing those enzymes and find a suitable test conditions. Furthermore, the cleaning efficacy of commercially available protein removal tablets and solution on balafilcon A lens deposited with protein artificially was measured and the correlation between two evaluation methods was further analyzed. **Results:** When pancreatin itself and the product containing pancreatin was evaluated by protein digestibility assay, both reached 28 IU/mg, the standard value of protein digestibility suggested by the Korean pharmacopoeia. In case of protease and subtilisin A tested with trichloroacetic acid B solution, both of them met the enzyme activity level proposed by the manufacturers when they were evaluated by protein digestibility assay however, papain and subtilisin A tested with trichloroacetic acid A solution were not reached the enzyme activity level. Among protein removal agents, three products except a product containing pancreatin did not meet the enzyme activity value specified by the manufacturer when they were evaluated by protein digestibility assay. However, actual protein removal efficacy of three products except a papain-containing product on the lens was greater than 90% protein removal. In the case of papain-containing protein removal product, its effect was not measured by protein digestibility assay however, its actual protein removal efficacy on the lens reached 73.72%. **Conclusions:** From the results, it was confirmed that the efficacy of protein removal agents for contact lens should be evaluated by different method according to the type of proteolytic enzyme contained. That is, the protein removal agents containing pancreatin, protease and subtilisin A can be evaluated by protein digestibility assay and protein removal efficiency evaluation and the products containing papain can be effectively evaluated by only the evaluation method for protein removal efficiency employing the lens.

Key words: Protein removal agents, Protein digestibility, Pancreatin, Protease, Subtilisin A, Papain