

## 갈릭산 펩타이드 유도체를 이용한 주름개선 소재 개발

정해수<sup>1</sup>, 송미영<sup>1</sup>, 김형식<sup>1</sup>, 서효현<sup>1</sup>, 이정훈<sup>1</sup>, 이경록<sup>2</sup>, 홍일<sup>2</sup>, 모상현<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>(주)바이오에프디엔씨 항노화연구소

<sup>2</sup>(주)아미코스메틱

## Development of Anti-Wrinkle Materials using Galloyl-Peptide Derivatives

Hae Soo Jung<sup>1</sup>, Mi Young Song<sup>1</sup>, Hyoung Sik Kim<sup>1</sup>,

Hyo Hyun Seo<sup>1</sup>, Jeong Hun Lee<sup>1</sup>, Kyung Rok Lee<sup>2</sup>, Il Hong<sup>2</sup>, Sang Hyun Moh<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

<sup>2</sup>AMI Cosmetic Co., Ltd.

**요약** 항산화 효능이 우수한 phytochemical에 콜라겐 합성능이 우수한 기능성 펩타이드의 결합을 통해 소재 자체의 안정성 뿐만 아니라 수용액 상태에서의 분산성을 증대시켜 주름개선 효능과 더불어 우수한 화장품 소재로서의 가능성을 가진다. 이에 본 연구는 항산화, 항염 및 항암 등의 효능을 가진다고 알려져 있는 phytochemical인 갈릭산을 이용해 phytochemical-펩타이드 유도체를 개발하여 화장품 소재로서의 가능성을 시험하였다. 갈릭산에 LVH, IVH, KTTKS, YGGFM, YGGFLRKYP 총 5종의 펩타이드를 각각 합성하여 만든 갈릭산 펩타이드 유도체의 항산화 및 주름개선의 효능을 평가하고자 DPPH radical scavenging activity와 real-time PCR로 주름개선과 관련된 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과 5종 유도체 모두 우수한 자유라디칼 소거능을 보였다. 또한 collagen 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가하였고, collagen 생성시 분비되는 펩타이드의 증가를 통해 항산화뿐만 아니라 주름개선에도 효과가 있었다. 이를 통해 갈릭산 펩타이드 유도체가 항산화 및 주름개선을 위한 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

**Abstract** Conjugating a phytochemical, a strong antioxidant, with a functional peptide not only compensates for its stability, but also improves its solubility and anti-wrinkle effects, thereby contributing to the possibility of becoming an excellent cosmetic ingredient. Thus, in this study we examined the potential cosmetic use of a phytochemical-peptide derivative using gallic acid, a phytochemical with antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer effects. To evaluate the antioxidant and wrinkle-improving efficacy of 5 synthesized gallic acids conjugated with LVH, IVH, KTTKS, YGGFM, and YGGFLRKYP respectively, we observed the expression of genes related to wrinkle improvement using DPPH radical scavenging activity and real-time PCR. As a result, all 5 derivatives had excellent free radical scavenging effects. The expression level of genes involved collagen synthesis also increased, and the secreted peptides during collagen production contributed to their antioxidant and wrinkle improving effects. These results mark the potential use of gallic acid peptide derivatives as a cosmetic ingredient for anti-oxidation and wrinkle improvement.

**Keywords** : Phytochemical, Gallic acid, Galloyl derivatives, Anti-Oxidant effect, Anti-Wrinkle effect

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였음. [S2178403, 주름개선능이 우수한 파이토케미칼-펩타이드를 함유한 화장품 브랜드 개발]

\*Corresponding Author : Sang Hyun Moh(Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C)

Tel: +82-10-8921-0435 email: shmoh@biofdnc.com

Received May 15, 2015

Revised (1st June 19, 2015, 2nd July 1, 2015)

Accepted August 6, 2015

Published August 31, 2015

## 1. 서론

갈릭산(Gallic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid)은 phenolic acid로 다양한 식물에서 얻어진 phytochemical 이다[1]. 갈릭산은 오배자, 옷나무, 풍년화, 다옌, 오크나무 등의 다양한 식물에서 발견되며[2], 항균, 항바이러스, 항염, 항산화, 항암 등의 효능을 가진다[3-5]. 갈릭산은 세 개의 -OH(hydroxyl)기와 하나의 -COOH(carboxylic acid)기가 붙어있는 링 구조를 가진다. 펩타이드는 아미노산이 여러 개가 peptide bone에 의해 연결되어있는 아미노산 폴리머로 아미노산의 아미노기와 카르복실기의 축합반응에 의해 합성된다[6, 7]. 펩타이드는 아미노산 서열이 가지는 배열 및 구조에 따라 생체 내 혹은 피부에서 생리활성을 가지게 되어 생물학적 제제로서의 산업적 응용가능성이 높다. 현재는 제조합 과정을 통해 합성된 펩타이드의 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 피부 미용분야에서 적용되는 펩타이드는 signal 펩타이드로 콜라겐 합성을 증대하거나 분해하는 역할을 하여 주로 항주름 효과를 가진다[8, 9]. 특히 펩타이드에 폴리페놀 같은 phytochemical을 붙여 고기능성을 갖게 하는 기술은 의학 및 화장품 산업, 제빵산업, 포도주산업 등의 다양한 분야에서 적용될 수 있다. 이러한 기술을 도입하여 국내에서 사람의 부갑상선 호르몬에서 유래한 펩타이드에 레티놀을 결합한 유도체를 만든 사례가 있으며, 해외에서는 피부구조를 향상시키는 트리펩타이드 유도체를 만들어 미용용품으로 사용한 사례가 있다. Phytochemical-펩타이드 융합소재는 자체의 안정성과 수용액 상태에서의 분산성을 증대시키는 등 주름개선의 효능적 측면뿐만 아니라 융합소재의 분산성 및 안정성을 높여 생산시 정제 수율을 높이고 다양한 화장품 소재로 사용할 수 있는 장점을 지닌다. 따라서 항산화 효능이 우수한 phytochemical에 콜라겐 합성에 효과적인 기능성 펩타이드를 결합시킴으로써 효능이 우수하며 안정성 및 용해도가 높은 고기능성 소재의 개발을 추진할 수 있다. 이에 본 연구는 우수한 항산화, 항염 효능을 갖는 갈릭산에 다양한 기능성 펩타이드를 결합하여 갈릭산 펩타이드 유도체를 합성하고 항산화 및 주름개선 관련 효능을 평가하여 갈릭산 펩타이드 유도체가 화장품 소재로서 가능성을 확인하고자 하였다.

본 연구에 이용한 갈릭산 펩타이드 유도체는 LVH, IVH, KTTKS[10], YGGFM, YGGFLRKYP(BNEP) 총

5가지의 펩타이드를 이용하여 만들어진 유도체들로 각각의 항산화 및 주름개선과 관련된 효능을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 세포 배양

인간 각질형성 세포주(HaCaT, keratinocyte), 인간 섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 DMEM, 10% FBS, 1% antibiotic -antimycotic(GIBCO)의 배지에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하였다.

### 2.2 Cell viability 측정 시험

HaCaT cell을 24 well plate에 1×10<sup>5</sup>개의 세포를 분주하여 배양하였다. 24 시간 후 FBS를 포함하지 않는 배지로 교체하고 24 시간동안 starvation하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그 후 24 시간 동안 배양하고 배지를 제거한 뒤 5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl Tetrazolium Bromide, Sigma) 시약을 각 40 μl 씩 처리 후 4시간 동안 추가 배양하였다. 4 시간 뒤 배지를 제거하고, dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 넣고 10 분간 흔들어 준 다음 200 μl씩 96 well에 취하여 Spectrophotometer (Thermo)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[11, 12].

#### Cell viability(%)

$$= (\text{시험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100(\%)$$

### 2.3 DPPH 자유 라디칼 소거능

에탄올상에서 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma)가 발생시키는 자유 라디칼에 대한 소거능을 시험하여 딱지꽃 추출물의 항산화 효과를 평가하였다. 에탄올 0.4 ml에 0.1 mM DPPH 용액을 0.5 ml을 넣고 일정농도의 시험물질을 첨가하여 잘 섞어준 후 냉암소에서 30 분 동안 반응시킨다. 반응 후 Spectrophotometer (Thermo)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다 [13, 14].

#### 자유 라디칼 활성 저해율(%)

$$= 100 - \{(\text{각 시료액의 반응 흡광도} / \text{대조군의 반응 흡광도}) \times 100(\%)\}$$

### 2.4 Real-Time PCR

세포를 96 well plate에서 배양하고 FBS를 포함하지 않는 DMEM배지로 교환하고 시료를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 SuperPrep™ cell lysis & RT Kit for qPCR(TOYOBO)를 이용하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 Thunderbird™ SYBR qPCR Mix(TOYOBO)를 사용하여 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR machine(Qiagen)으로 수행하였다. 실험에 사용한 primer는 QuantiTect primer assays를 사용하였다[15, 16].

### 2.5 Procollagen synthesis assay

Procollagen synthesis 분석은 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit (Takara)를 사용하여 측정하였다. CCD986sk cell을 48well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 후 24 시간동안 배양하고, 시험물질을 처리하였다. 물질처리 48 시간 후 얻은 배지를 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit의 매뉴얼에 따라 진행하여 분석하였다[17, 18].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 갈릭산 펩타이드 유도체의 cell viability 측정

갈릭산 펩타이드 유도체를 세포에 처리하여 세포의 성장 및 증식, 혹은 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT 시험법을 이용하여 cell viability를 측정하였다. 각각의 유도체를 1, 5, 10, 20  $\mu$ M의 농도로 세포에 처리하여 cell viability를 시험하였다. 그 결과 대부분의 갈릭산 펩타이드 유도체에서 큰 독성을 보이지 않았지만 galloyl-YGGFM 유도체에서 상대적으로 약간의 독성을 보임을 확인하였다[Fig.1]. 하지만 cell viability 값이 80%이상이므로 세포 독성에 큰 영향을 미친다고 하기 어렵다.

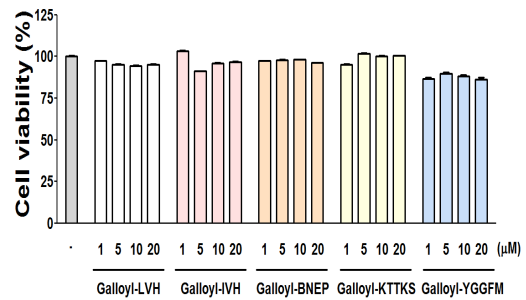


Fig. 1. Cell viability of galloyl derivatives

### 3.2 갈릭산 펩타이드 유도체의 자유 라디칼 소거능

DPPH는 화학적으로 안정화 된 수용성 자유 라디칼로 이를 이용해 갈릭산 펩타이드 유도체에 의한 라디칼 소거 능력을 측정하였다. Fig.2를 보면 5종의 유도체 모두 처리농도가 증가할수록 DPPH 자유 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 20  $\mu$ M를 처리한 경우 약 80% 정도 자유 라디칼 소거능이 증가하는 것을 알 수 있다. 이를 통해 잘 알려진 갈릭산의 항산화 효능이 갈릭산 펩타이드 유도체에서도 동일하게 나타남을 확인할 수 있었다.

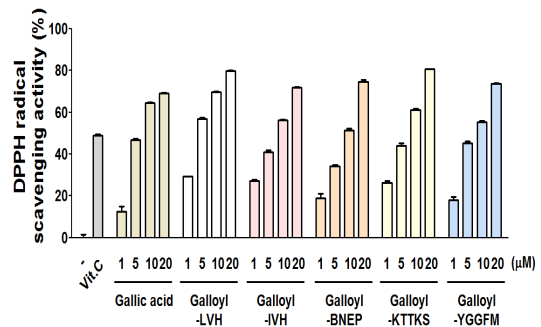


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of galloyl derivatives.

### 3.3 Collagen 합성 촉진능 시험을 통한 주름 개선 효과

갈로일 유도체의 세포내 collagen의 합성에 미치는 영향을 확인하고자 collagen 합성에 관여하는 procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE) 유전자의 발현 [18]과 collagen 합성시 세포 밖으로 분비되는 procollagen type I C-peptide(PIP)를 검출하여 각각의

유도체의 주름개선 효과를 시험하였다. 우선 collagen 합성에 관여하는 PCOLCE의 발현을 확인한 결과 갈릭산 펩타이드 유도체 5종 모두 PCOLCE의 발현이 증가하는 것을 확인하였다[Fig.3 A]. 대부분이 2배 이상 PCOLCE의 발현이 증가하였고, 그 중 galloyl-YGGFM을 1  $\mu$ M로 처리한 경우 약 5배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 시료처리시 세포 밖으로 분비되는 PIP의 양을 측정된 결과 galloyl-LVH, galloyl-BNEP, galloyl-YGGFM을 처리한 경우 PIP 양이 약 70-80%정도 증가하는 것을 확인하였다[Fig.3 B]. 이를 통해 갈릭산 펩타이드 유도체의 collagen 합성을 촉진시킴을 예측할 수 있고 그 중에서 특히 galloyl-LVH, galloyl-BNEP, galloyl-YGGFM 3종이 우수한 효과를 보임을 알 수 있다.

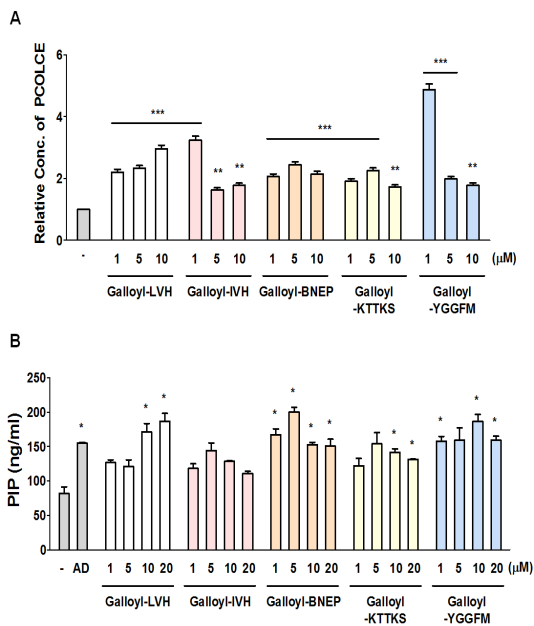


Fig. 3. Skin firming effect of galloyl derivatives. A. PCOLCE, B. Procollagen type I C-peptide. Results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0001 versus control(-) group.

#### 4. 결론

갈릭산은 항염 및 항산화에 효과적인 phytochemical로 갈릭산에 기능성 펩타이드를 붙여 합성한 갈릭산 펩

타이드 유도체 5종의 효능을 평가하였다. 그 결과 5종의 유도체 모두 세포 독성을 보이지 않았고, DPPH radical scavenging activity가 증가하여 항산화에 효과적임을 확인하였다. 또한 주름개선 필요한 collagen 합성에 관여하는 유전자인 PCOLCE의 발현을 2배에서 최대 5배까지 증가시키고, collagen 합성이 생성되는 PIP의 양 또한 약 80%까지 증가시킴을 통해 collagen 합성을 촉진시켜 주름개선에 효과적임을 예측할 수 있다. 이러한 결과는 갈릭산 펩타이드 유도체의 항산화 및 주름개선을 위한 화장품 소재로서의 가능성을 보여준다. 추후 항산화 및 주름에 관여하는 다양한 유전자 및 단백질의 발현 비교를 통해 갈릭산 펩타이드 유도체의 효능을 추가 입증하고 화장품 소재로서 개발을 추진할 예정이다.

#### References

- [1] Kasture VS, Sahu RK, Anjan K, Musmade DS, "Synthesis and antiparkinson activity of Gallic acid derivatives" *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 3(2), pp. 134-139, 2012.
- [2] Reynolds LD, Wilson NG "Scribes and Scholars" 3rd edition, *Oxford University Press*, pp. 193-194, 1991.
- [3] Nguyen DM, Seo DJ, Lee HB, Kim IS, Kim KY, Park RD, Jung WJ, "Antifungal activity of gallic acid purified from Terminalia nigrovenulosa bark against Fusarium solani." *Microb Pathog* 56, pp. 8-15, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2013.01.001>
- [4] Choi HJ, Song JH, Park KS, Baek SH, "In vitro anti-enterovirus 71 activity of gallic acid from Woodfordia fruticosa flowers." *Lett Appl Microbiol* 50, pp. 438-440, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02805.x>
- [5] Liu Z, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL, "Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein." *Chem Phys Lipids*, 106(1), pp. 53-63, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00133-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00133-X)
- [6] Paolo R, "Peptides and Peptidomimetics in Medicinal Chemistry", *Medicinal Chemistry and Drug Design*, 8, pp. 978-953, 2012.
- [7] Hashimoto SI, Kyowa C, Hofu S, "Ribosome-independent Peptide Synthesis in Nature and Their Application to Dipeptide Production", *J. Biol.*

- Macromol*, 8(2), pp. 28-37, 2008.
- [8] Ioannis, S., F. Demosthenes, V. Katerina, G. T. Andreas, K. Valentinos, B. Evangelos "Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs." *Mar. Drugs*, 8, pp. 629-657, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md8030629>
- [9] Ruiz, M. A., B. Clares, M. E. Morales, and V. Gallardo, "Evaluation of the anti-wrinkle efficacy of cosmetic formulations with an anti-aging peptide." *Ars. Pharm.* 50, pp. 168-176, 2010.
- [10] Robinson, L. R., N. C. Fitzgerald, D. G. Doughty, N. C. Dawes, C. A. Berge, D. L. Bissett, "Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin." *J. Cosmetic science* 27, pp. 155-160, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2494.2005.00261.x>
- [11] van Meerloo JI, Kaspers GJ, Cloos J, "Cell sensitivity assays: the MTT assay" *Methods Mol Biol.* 731, pp. 237-245, 2011.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
- [12] Fotakis G, Timbrell JA, "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride." *Toxicol Lett.* 160, pp. 171-177, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- [13] Huang D, Ou B, Prior RL, "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *J Agric Food Chem.* 53(6), pp. 1841-1856, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c>
- [14] Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y, "Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents." *Planta Med.* 60(5), 417-420, 1994.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-959522>
- [15] Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T, "Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR." *Appl Environ Microbiol.* 63(11), 4504-4510, 1997.
- [16] Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, Kai Y, "Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1." *J Mol Biol.* 306(3), 469-477, 2001.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4403>
- [17] Atsushi Masamune, Shin Hamada, Kazuhiro Kikuta, Tetsuya Takikawa, Shin Miura, Eriko Nakano, Tooru Shimosegawa. "The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice" *Journal of Gastroenterology.* 48, pp. 602-609, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2013.777776>
- [18] Cho S, Kim HH, Lee MJ, Lee S, Park CS, Nam SJ, Han JJ, Kim JW, Chung JH, "Phosphatidylserine prevents UV-induced decrease of type I procollagen and increase of MMP-1 in dermal fibroblasts and human skin in vivo" *J Lipid Res.* 49, pp. 1235-1245, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M700581-JLR200>

**정 해 수(Hae Soo Jung) [정회원]**



- 2012년 2월 : 청운대학교 화장품과학 전공 (이학학사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>  
화장품 과학

**송 미 영(Mi Young Song) [정회원]**

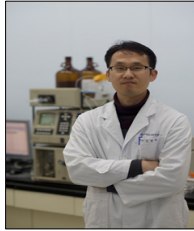


- 2008년 2월 : 건국대학교 화학전공 (이학학사)
- 2012년 8월 : 건국대학교 일반대학원 의생명과학전공 (이학석사)
- 2013년 9월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>  
생명과학, 화학

**김 형 식(Hyoungh Shik Kim)**

[정회원]



- 2001년 3월 : 전남대학교 화학과 (이학석사)
- 2013년 3월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 연구소장

<관심분야>  
유기화학, 생명과학

**이 경 록(Kyung Rok Lee)**

[정회원]

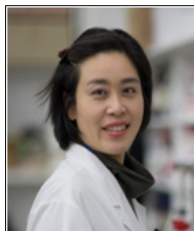


- 1995년 2월 : 연세대학교 화학공학 (공학학사)
- 1997년 2월 : 연세대학교 화학공학 (공학석사)
- 2006년 8월 ~ 현재 : (주)아미코스 메틱 대표이사(연구소장 겸임)

<관심분야>  
바이오소재, 기능성 화장품

**서 효 현(Hyo Hyun Seo)**

[정회원]



- 1999년 12월 ~ 2007년 3월 : (주)금호석유화학 금호생명환경과학연구소 선임 연구원
- 2004년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2007년 6월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>  
생명과학

**홍 일 (Il Hong)**

[정회원]



- 2005년 2월 : 세종대학교 생명공학과(공학석사)
- 2008년 1월 ~ 2013년 1월 : (주)케어젠
- 2013년 1월 ~ 현재 : (주)아미코스 메틱 근무

<관심분야>  
생명공학, 화장품

**이 정 훈(Jeong Hun Lee)**

[정회원]

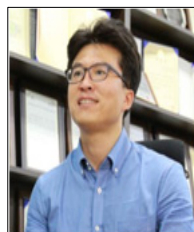


- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>  
생명과학

**모 상 현(Sang Hyun Moh)**

[종신회원]



- 2003년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 나노과학기술협동학부 (이학박사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 대표이사

<관심분야>  
생명과학, 나노과학