

## 극성 저분자 케라틴 펩타이드에 의한 피부 탄력 변화 연구

맹지혜\* · 남개원\*\*·†

\*㈜씨알에이코리아

\*\*서원대학교 바이오코스메틱학과, 조교수

(2020년 6월 12일 접수, 2020년 7월 21일 수정, 2020년 8월 6일 채택)

## Study on Effect of Skin Elasticity by Polar Low Molecular Weight Keratin Peptide

Jihye Maeng\* and Gaewon Nam\*\*,†

\*CRA Korea Inc., 2018, Cheongnam-ro, Seowon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 28790, Korea

\*\*Department of Bio-cosmetics, Seowon University

(Received June 12, 2020; Revised July 21, 2020; Accepted August 6, 2020)

**요약:** 본 연구에서는 *Fervidobacterium islandicum* AW-1를 이용하여 극성 저분자 케라틴 펩타이드를 생산하고, 피부 탄력과 관련한 인자를 확인하여, 화장품 원료로서 극성 저분자 케라틴 펩타이드의 가능성을 확인하였다. 인체섬유아세포에 극성 저분자 케라틴 펩타이드를 농도에 따라 세포독성 및 콜라겐 합성능을 확인한 결과, 세포 독성은 나타나지 않았고, 인체섬유아세포 내 콜라겐 합성을 증가시키는 것을 확인하였다. 극성 저분자 케라틴 펩타이드를 함유한 마스크팩을 만들어, 22 명의 건강한 성인 피험자를 대상으로 4 주 동안 시험제품을 사용한 결과, 피부 탄력 및 피부 비틀림 탄력 개선, 수분량 증가, 피부색 개선에서 통계적으로 유의한 효과를 나타냈다. 이를 통해 극성 저분자 케라틴 펩타이드는 피부 탄력 개선에 도움을 주는 화장품 원료로 사용할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract:** Using *Fervidobacterium islandicum* AW-1, polar low molecular weight keratin peptides were produced and confirmed through factors related to the skin elasticity. As a result of confirming the cytotoxicity and collagen synthesis ability according to the concentration of the polar low molecular weight keratin peptide in human fibroblasts, it was confirmed that the cytotoxicity did not appear and the collagen synthesis in human fibroblasts was increased. A mask pack containing a polar low-molecular weight keratin peptide was used, and a test product was used for 4 weeks in 22 healthy women subjects. As a result, it showed statistically significant effects on skin elasticity, skin torsion elasticity, skin color and moisture improvement. Through this test, it was confirmed that the polar low-molecular keratin peptide can be used as a cosmetic ingredient that helps improve skin elasticity.

**Keywords:** *Fervidobacterium islandicum* AW-1, polar low molecular keratin peptide, skin elasticity, mask pack, bioactive peptide

### 1. 서 론

생물 활성 펩타이드(bioactive peptide, BP)는 신체 기능이나 상태에 긍정적인 영향을 미치는 특정한 단백질 조각으로 인체에 다양한 방면으로 영향을 줄 수 있다[1]. BP는 단백질이 풍부한 천연 자원에서 추출 되는데, 이들은 시중

에서 판매되는 화학 제품에 비해 몇 가지의 장점이 있다. 안정성이 우수하고 생리활성(기능성)이 매우 우수하며, 특정한 아미노산 서열에 의거하여 나타나므로 변색, 광독성이 없는 것으로 알려져 있다[2]. 생물 활성 펩타이드를 얻는 방법은 크게 세 가지로 나뉘는데, 첫 번째는 생체 내 소화, 두 번째는 *in vitro* 효소 가수분해, 세 번째는 미생물 발효이다[3]. 이들 중 미생물 발효는 다양한 미생물종류 뿐

† 주 저자 (e-mail: skarod@gmail.com)  
call: 043-299-8494

만 아니라 원료 획득방법 등 친환경적이고 경제적인 공급에 대한 연구들이 진행되고 있다[4].

피부 세포에 존재하는 섬유 단백질 중 하나인 케라틴은 기본적으로 황(sulfur)을 함유하고 있으며 피부, 모발, 손톱, 뿔 및 치아 등의 주요 성분으로 케라틴 형성세포(keratinocyte)를 통해 합성되며 일반적인 단백질 분해효소로는 분해되지 않는다[5]. 황(sulfur)의 함유량에 따라 케라틴은 2 가지로 나누어지는데, 소프트 케라틴(soft keratin)은 시스테인(cysteine)의 함량이 10%이하인 케라틴으로 피부의 표피에서 발견되며, 하드 케라틴(hard keratin)은 시스테인의 함량이 10 ~ 14%로서 모발, 손톱, 깃털 및 뿔에서 발견된다[6].

가금류 중 닭의 깃털을 분해하는 효소를 생산하는 *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (*F. islandicum* AW-1)은 유전자 분석을 통해 깃털을 분해하는 대사 과정을 밝힌 연구결과가 존재하며[7], 이를 통해 피부 노화를 진행시키는 시키는 효소인 MMP-1 (matrix metalloproteinase)을 억제하는 10 kDa 이하의 저분자 케라틴펩타이드의 아미노산 분석을 통하여 주름개선의 효능을 밝힌 보고가 있다[8-11].

이러한 케라틴 펩타이드를 통해 화장품 원료로서 가능성을 다양하게 탐진하였고, 최근 케라틴 펩타이드를 함유한 해어관련 제품을 제조하여 머리카락의 주요 구성성분인 케라틴에 대해 영향을 미치어 두피 및 해어관련 인체 효력 인자에 우수한 성능을 보인바 있다[12].

본 연구에서는 *F. islandicum* AW-1을 이용하여 닭의 깃털을 분해하여 케라틴 펩타이드를 생산 한 후, 피부 탄력 효능을 극대화와 화장품 원료 사용에 적합하도록 추가 공정을 도입하여 생산한 극성 저분자 케라틴 펩타이드를 이용하여, 인체섬유아세포에서 탄력 인자와 관련된 효능과 인체 피부 탄력 관련 효능을 확인하고자 하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 극성 저분자 케라틴 펩타이드 원료 및 제품 제조

수집한 닭의 깃털을 수돗물로 세척한 후, 이후 진행은 보고된 논문에 따라 진행하였다[7]. 표시되지 않은 시약은 시그마알드리치(Merck, USA)에서 구입하여 사용하였다. (*F. islandicum* AW-1 (KCTC 4680)을 닭의 깃털을 0.8% (w/v)함유하는 modified thermo-toga fervidobacterium (mTF) 배지에 L 당 0.1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.16 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g yeast extract(Difco, Md., USA), 1.0 mg resazurin, 10 mL trace element solution

(DSM medium 141), 10 mL vitamin solution (DSM medium 141), 3 mL 25% Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O를 첨가하여 배양하였다[8]. 배양은 N<sub>2</sub> 가스상태에서 밀봉한 세럼 병을 이용하여 70 °C에서 2 일간 진행하였다. 배양 후에는 먼저 배양액 내에 남아있는 깃대 등을 제거하기 위하여 깔때기와 거름종이 (pore size 5 μm)를 사용하여 일차 배양액 제조하였다. 원심분리(10,000 × g, 20 min, 4 °C)를 사용하여 균체 제거 후, 배양액을 냉동고 보관한 후, 일정량이 모이면 배양액을 녹인 후 다시 원심분리(10,000 × g, 20 min, 4 °C)를 수행 후, 상등액을 membrane filtration (pore size 0.22 μm, Merck, USA)을 수행하였다. 이후 96 h 동안 동결건조를 진행하여 케라틴 펩타이드 파우더 소재를 확보하였다. 이 소재를 혼산 분리공정을 통해 극성 케라틴 펩타이드를 확보한 후, 한외여과(ultrafiltration, Merck, USA)을 통해 10 kDa이하의 펩타이드를 획득하여, 최종적으로 극성 저분자 케라틴 펩타이드를 확보하였다.

확보한 극성 저분자 케라틴펩타이드는 인체 섬유아세포 효능 검증에 사용하였으며, 화장품에 사용하고자 미생물 challenge를 거쳐 사용하기에 적합한 화장품 원료로 제조하였다. 이를 마스크팩 제형에 1% 첨가하여 인체적용시험에 사용하였다.

### 2.2. 케라틴 펩타이드의 아미노산 분석

*F. islandicum* AW-1에 의해 0.8% (w/v)의 깃털을 배양 전후의 아미노산 변화를 관찰하기 위해 구성 아미노산 및 유리 아미노산 분석을 수행하였다. 이를 위해 배양 전후 배양액에 대하여 아미노산 분석기를 (Hitachi, Japan) 이용하여 분석하였다.

### 2.3. 극성 저분자 케라틴펩타이드의 세포 효력 평가

본 시험에 사용된 시약은 다음과 같다. 세포 배양에 이용한 시약은 dimethyl modified eagle medium (DMEM, Corning, USA), fetal bovine serum (FBS, Abm, USA), antibiotics (Abm, USA), phosphated buffered saline (PBS, Merck, USA)이다. 세포독성평가와 피부 세포 엘라스틴 합성 평가, 콜라겐 합성 평가에 쓰인 시약은 MTT (Dojindo, USA), elastin assay kit (F2000, Biocolor, UK), procollagen type Ic-peptide ELISA assay kit (PIP assay kit, Takara, Japan)이다. 시험에 사용한 세포주는 human fibroblast인 HS68 (ATCC® CRL-1635)를 사용하였다. 세포주는 DMEM media에 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가한 배지를 이용해 37 °C

에서 배양하며 실험을 진행하였으며, 세포독성시험은 MTT assay를 진행하고, 양성대조군으로는 5 % (v/v) FBS를 사용하였다. 엘라스틴 분해효소인 elastase의 저해 효소 시험을 위해 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하였고, 양성대조군으로 100 mg/mL adenosine을 사용하였다. 그 후 극성 저분자 케라틴 펩타이드가 인체 섬유아세포 내 피부 탄력과 관련된 단백질인 엘라스틴과 콜라겐에 미치는 영향을 확인하기 위하여 엘라스틴 합성능을 평가하는 elastin assay와 콜라겐 합성능을 평가하는 PIP assay를 진행하였고 양성대조군으로 10 ng/mL transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )를 사용하였다.

#### 2.4. 극성 저분자 케라틴펩타이드 원료를 함유한 마스크 팩 제조

극성 저분자 케라틴 펩타이드를 함유한 화장품 제형을 제조하고 이를 함유한 마스크팩을 제조하기 위하여 Table 1에서 표시된 화장품 내용물을 제조하였다. 비이커에 원료 1에서 6까지 칭량하여 넣고 70 °C 가열 용해하여 유상(oil phase)을 얻고, 플라스틱 용기에 원료 7에서 11까지 칭량하여 넣고 homo mixer (RBM, T.K Robomix, Primix, Japan)를

이용하여 원료 12, 13을 분산시켜 수상(water phase)을 얻었다. 수상에 유상을 투입 homo mixer를 이용하여 약 1,500 rpm에서 10 min 동안 유화를 진행하였고, 원료 14에서 16을 투입하여 1,500 rpm에서 5 min 동안 유화시켜 마스크팩 내용물을 제조하였다. 이른 일반적인 시트마스크 시트에 점착하여 밀봉 후, 인체 시험에 사용하였다.

#### 2.5. 극성 저분자 케라틴 펩타이드 제품의 인체 안전성 및 인체 효력 평가

극성 저분자 케라틴 펩타이드 원료 및 원료를 함유한 제품에 대하여 인체 안전성 평가를 실시하였다. 식품의약품안전처 고시 ‘기능성화장품 심사에 관한 규정(제2019-47호)’에 따라 인체 안전성 평가를 실시하였다. 건강한 남녀 피험자 33 명을 대상으로(평균 33.8 ± 10.55 세), IQ Ultra Chamber (Chemoteknique Diagnostics, Sweden)를 사용한 패치 적용 시험을 진행하였다. 패치를 이용하여 원료 및 제품을 피험자의 등 부위(척추 제외)에 24 h 동안 첨포를 진행하여, 패치 제거 30 min 후 1 차 판정을 진행하고, 패치 제거 24 h 후 2 차 판정을 진행하여 1, 2 차 판정의 평균 반응도를 기준으로 하여 최종 안전성 평가를 진행하였다.

**Table 1.** Cosmetic composition containing polar low molecular weight keratin peptides for use in mask packs

No.	TRADE Name	INCI Name	% (W/W)	FUNCTION
1	Arlacel 165	Glyceryl stearate/PEG-100 stearate	1.00	Emulsifier
2	HCO-40	PEG-40 hydrogenated costor oil	0.50	Emulsifier
3	Hicos CEH	Cetyl ethylhexanoate	1.00	Emollient
4	Hicos GTC	Caprylic/capric triglyceride	1.00	Emollient
5	DC 200f/6CS	Dimethicone	0.30	Emollient
6	1,3 BG	Butylene glycol	8.00	Humactant
7	D.I water I	Water	77.16	
8	EDTA-2Na	Disodium EDTA	0.02	Chelator
9	D-Panthenol	Panthenol	0.20	Humactant
10	KMO-6	1,2-hexandiol	2.50	Humactant
11	Glycerin	Glycerin	6.00	Humactant
12	Keltrol F	Xanthan gum	0.10	Thickener
13	Aristoflex AVC	Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	0.20	Thickener
14	Hyaluronic acid 1% solution	Sodium hyaluronate	1.00	Humactant
15	ALM(aqueous low molecular keratin peptide 1% solution	<i>Fervidobacterium Islandicum</i> /chicken feather ferment filtrate extract	1.00	Additive
16	Lavender oil	<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavender) Oil	0.02	Fragrance
Total			100.00	

극성 저분자 케라틴 펩타이드를 함유한 마스크팩을 제조한 후, 4 주 동안 피험자들에게 사용하게 하여 극성 저분자 케라틴 펩타이드 원료에 대한 인체효력시험을 진행하였다. 건강한 성인 여성 22 명(평균  $44.0 \pm 8.06$  세)을 대상으로 시험을 진행하였다. 무작위로 피험자를 선발하였으나, 화장품의 마스크팩 제형 및 사용 특성으로 인하여 건강한 성인여성의 지원이 선착순으로 모두 이루어져 건강한 성인여성을 대상으로 인체효력 시험을 진행하였다. 피험자들의 준수사항은 일반 화장품의 인체적용시험 선정 및 제외기준에 부합하며, 제품 사용기간에 평소 생활 시 기능성 화장품 사용 제한(주름개선, 미백개선 화장품 등), 자외선 차단제 사용 필수, 지나친 음주, 흡연, 자외선 노출 등 결과의 평가에 장애를 줄 수 있는 것 제한, 팩이나 마사지, 피부박피시술, 주름제거시술 등의 시술 금지, 시험에 영향을 줄 수 있는 의약품, 의약외품, 보조식품(비타민 등)의 복용 금지, 시험일정 및 방문일정 준수, 시험 실시 전 자신에게 발생하는 모든 질환, 증세에 대한 상세한 보고, 시험 실시 도중 발생하는 모든 질환 및 증세에 대한 상세한 보고, 그 외 생활 패턴은 평소와 동일하게 진행하게 피험자의 제품 사용 안내를 실시하였다. 피험자들에게 2 일 1 회 간격으로 4 주 동안 마스크팩을 저녁에 세안 후 15 ~ 30 min간 얼굴에 적용 후 제거한 다음 남은 마스크 팩 에센스는 얼굴에 흡수시키며, 추가로 다른 제품은 사용하지 않았다. 이후 사용 전, 사용 후 2 주, 사용 후 4 주에 기기 측정을 진행하면서 제품 사용 확인서를 작성하여 피험자의 제품 사용을 확인하였다. 기기 측정 항목은 피부탄성, 피부 비틀림 탄력, 피부색, 피부 수분량이다. 제품 사용에 따른 피부의 탄성 변화를 평가하기 위해 피부에 진동에너지를 가했을 때 파형이 유지되는 모양을 분석하여 피부 탄성을 측정하는 Ballistometer (BLS380, Dia-Stron, UK)를 이용하여 측정하였다. 제품 사용에 따른 피부 비틀림 탄력변화를 평가하기 위해 피부에 비틀림 자극을 가하여 피부의 회복력을 측정해 피부 탄력 저항을 측정하는 derma torque meter (DTM310, Dia-Stron, UK)을 이용하여 측정하였다. 제품 사용에 따른 피부색 변화를 평가하기 위해 측정 대상에서 반사된 빛을 프리즘을 통해 분리시켜 파장대역 반사율을 측정해 색을 분석하는 Spectrophotometer (CM2600D, Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였다. 제품 사용에 따른 피부 수분량 변화를 평가하기 위해 전기용량(capacitance)을 바탕으로 측정하는 Skin-O-Mat® (Cosmomed, Germany)를 이용해 측정하였다. 본 연구는 서원대학교 임상윤리위원회에 의해 측정하였다.

해 연구 수행 이전에 승인되었다(1040820-201905-HR-004-02).

## 2.6. 통계 분석

세포시험 및 인체 효력 시험의 기기 측정은 3 회 반복 측정을 진행하여 평균값을 구하였다. 통계 분석 결과는 95% 신뢰구간에서 유의성 여부를 확인하였다. 결과값에 대한 정규성 검정은 Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk 방법으로 실시하였다. 세포시험의 경우 paired t-test를 진행하였고, 인체효력시험의 경우, 정규성 검정 진행 후 정규성을 충족하면 one-way ANOVA 검정을 실시하였다. 통계분석 프로그램은 SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, USA)을 사용하였으며,  $p < 0.05$  미만의 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 케라틴 펩타이드의 아미노산 분석

*F. islandicum* AW-1으로 깃털을 분해하기 전후의 구성 아미노산 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 배양 전후 평균 구성 아미노산은 약 3.0 배가 증가하였으며, 유리아미노산 역시 약 2.9 배 증가하였다. 피부와 머리카락의 주요 구성 아미노산인 cysteine 및 methionine의 증가가 나타났으며, 특히 cysteine의 경우 3.5 배가 증가하였다. 유리 아미노산 분석에서 cysteine은 관찰되지 않으나, 배양 후 관찰되는 결과로 이는 깃털 케라틴에서 분해되어 유리되어 나오는 아미노산으로 판단되었다.

### 3.2. 극성 저분자 케라틴펩타이드의 세포 효력 평가

극성 저분자 케라틴 펩타이드의 농도에 따른 세포독성 시험 결과, 시험에 사용된 모든 농도에서 세포생존율이 90% 이상 나타나 세포 독성이 없음을 확인하였다(Figure 1A). Elastase 저해 시험에서  $20 \mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 통계적으로 유의하게 저해 효과를 나타냈으며, 이후 높도 의존적으로 elastase 저해하는 결과를 타나내었다(Figure 1B). 엘라스틴 합성 시험에서는  $400 \mu\text{g/mL}$ 에서 통계적으로 유의한 합성 결과를 나타냈고, 양성대조군으로 쓰인 TGF- $\beta$ 와 유사한 결과를 보였다(Figure 1C). 콜라겐 생성 시험에서  $400 \mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적으로 콜라겐 합성 증가를 나타내었다(Figure 1D). 따라서 극성 저분자 케라틴 펩타이드는 탄력관련 인자에서 세포 수준의 우수한 효과를 나타내었다.

**Table 2.** Composition amino acids and free amino acids analyses in mTF medium before and after 48 h anaerobic culture of *F. islandicum* AW-1. (A) Composition amino acids, (B) Free amino acids.

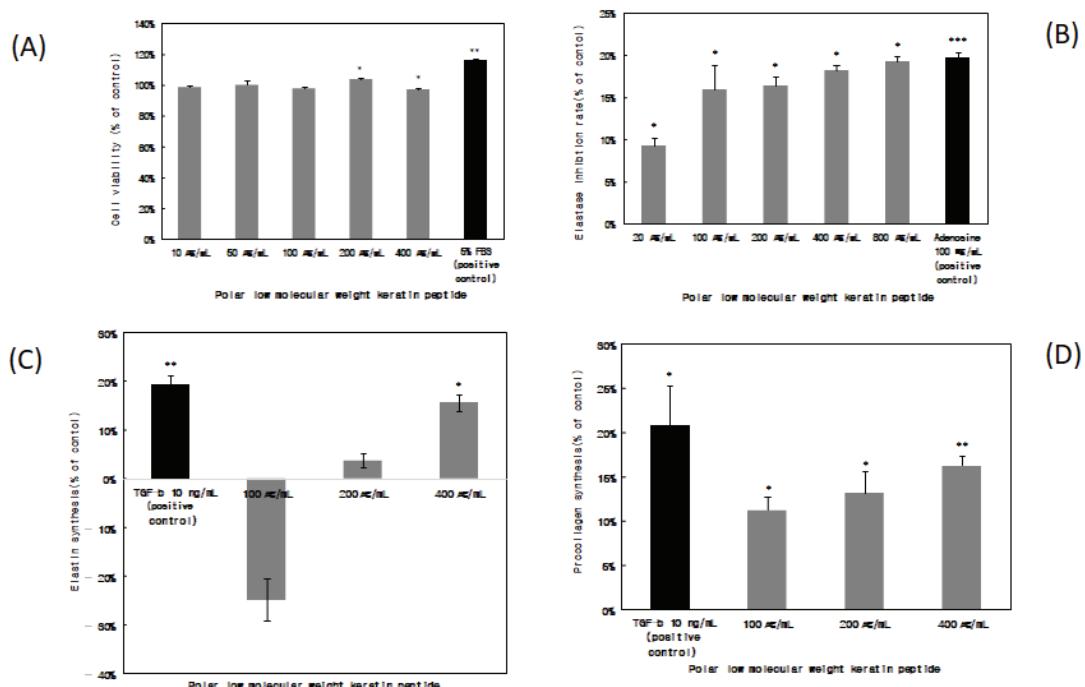
(A)

Amino acid	Polarity	Before (mg/L)	After (mg/L)	Fold
Thr	Polar	24.290	46.850	1.9
Ser	Polar	20.210	46.770	2.3
<b>Cys</b>	<b>Polar</b>	<b>7.670</b>	<b>27.050</b>	<b>3.5</b>
Tyr	Polar	17.500	73.140	4.2
Gly	Polar	16.140	59.140	3.7
Asp	Acidic/Polar	25.840	45.390	1.8
Glu	Acidic/Polar	61.400	80.390	1.3
Lys	Basic/Polar	28.880	15.460	0.5
His	Basic/Polar	1.810	53.620	29.6
Arg	Basic/Polar	15.570	80.070	5.1
Ala	nonpolar	41.530	140.040	3.4
Val	nonpolar	26.550	106.580	4.0
<b>Met</b>	<b>nonpolar</b>	<b>3.840</b>	<b>8.890</b>	<b>2.3</b>
Ile	nonpolar	24.440	64.100	2.6
Leu	nonpolar	45.850	107.800	2.4
Phe	nonpolar	-	40.940	
Trp	nonpolar	-	-	
Pro	nonpolar	19.000	143.330	7.5
NH <sub>3</sub>		19.760	126.650	6.4
<b>Sum</b>		<b>380.520</b>	<b>1,139.560</b>	<b>3.0</b>

(B)

Amino acid (mg/L)	Before	After	Fold
P-ser	7.410	34.290	4.63
PEA	2.170	11.490	5.29
Asp	26.920	48.340	1.80
THr	20.120	44.030	2.19
Ser	21.250	46.940	2.21
Glu	60.150	73.300	1.22
Gly	19.680	63.040	3.20
Ala	47.200	145.230	3.08
Cit	6.250	15.180	2.43
Val	35.950	122.030	3.39
<b>Cys</b>	-	<b>38.860</b>	
<b>Met</b>	<b>6.330</b>	<b>19.540</b>	<b>3.09</b>

Ile	26.440	69.110	2.61
Leu	41.270	109.560	2.65
Tyr	22.230	83.780	3.77
Phe	23.670	51.120	2.16
$\beta$ -Ala	-	0.440	
$\beta$ -AiBA	-	2.020	
$\gamma$ -ABA	21.990	21.870	0.99
EOHNH2	-	2.680	
NH3	32.780	87.320	2.66
Orn	10.860	83.050	7.65
Lys	31.840	22.230	0.70
1Mehis	-	8.230	
His	6.040	-	
Arg	15.710	85.270	5.43
Pro	13.030	160.910	12.35
<b>Sum</b>	<b>499.290</b>	<b>1449.860</b>	<b>2.90</b>



**Figure 1.** Result of human fibroblast cell cytotoxicity, elastase inhibition, elastin synthesis and collagen synthesis treated by various concentration of polar low molecular weight keratin peptide. Negative control vs samples. paired t-test. Significant \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (A) MTT assay, (B) Elastase inhibition assay, (C) Elastin synthesis assay, (D) PIP assay.

### 3.3. 극성 저분자 케라틴 펩타이드 제품의 인체 효력 평가

극성 저분자 케라틴 펩타이드 1% 용액과 5%용액, 1% 용액을 함유한 마스크팩을 가지고 인체첨포시험을 수행한 결과 모두 저자극 판정을 받았다(Data not shown).

극성 저분자 케라틴 펩타이드를 함유한 마스크팩을 피험자에게 4 주간 사용한 후 피부 탄성, 피부 비틀림 탄력, 피부색, 피부 수분량에 대한 기기 측정을 진행하였다. Table 3에서 나타낸 피부 탄력 관련 결과에서 피부 탄성 평가 결과, Indent는 사용 2, 4 주 후에 통계적으로 유의하게 증가한 결과를 나타내었으며, 사용 2 주 후 7.0%, 사용 4 주 후 18.6%의 개선율을 보였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). K값은 사용 2, 4 주 후에 통계적으로 유의하게 증가한 결과를 나타내었으며, 사용 2 주 후 4.2%, 사용 4 주 후 9.5%의 개선율을 보였다( $p < 0.01$ ). Alpha값은 사용 2, 4 주 후에 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었으며, 사용 2 주 후 11.4%, 사용 4 주 후 25.4%의 개선율을 보였다( $p < 0.001$ ). Mean CoR값은 사용 2, 4 주 후에 통계적으로 유의하게 증가한 결과를 나타내었으며, 사용 2 주 후 2.2%, 사용 4 주 후 6.3%의 개선율을 보였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Area값은 사용 2, 4 주 후에 통계적으로 유의하게 증가한 결과를 나타내었으며, 사용 2 주 후 13.0%, 사용 4 주 후 34.9%의 개선율을 보였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ).

피부 비틀림 탄력 측정 결과(Table 3) Ue값의 경우, 사용 전 대비 사용 후 2주, 사용 후 4주에 측정값이 감소하는

경향을 보였다. Uv의 경우, 사용 전 대비 사용 후 4 주에 측정값이 감소하는 경향을 보였다. Ur 값은 사용 전 대비 사용 후 4 주에 측정값이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 사용 2 주 후 2.0%, 사용 4 주 후 16.1% 개선율을 보였다( $p < 0.05$ ). Ur/Ue 값은 사용 전 대비 사용 후 2 주, 사용 후 4 주에 측정값이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 사용 2 주 후 6.7%, 사용 후 4 주 15.3% 개선율을 보였다( $p < 0.001$ ).

피부 수분량 측정 결과는 Figure 2에 나타내었다. 사용 후 2 주, 4 주에 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 사용 2 주 후 16.1%, 사용 4 주 후 29.4% 개선되었다( $p < 0.001$ ).

피부색 측정 결과, 피부 밝기를 표현하는 L\*값은 사용 전 대비 사용 후 2 주, 4 주에 측정값이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 사용 2 주 후 1.5%, 사용 4 주 후 3.1% 개선율을 나타냈다(Figure 3A,  $p < 0.001$ ). 피부의 붉은색을 나타내는 a\*값의 경우, 사용 전 대비 사용 후 2 주, 사용 후 4 주에 측정값이 통계적으로 유의하게 감소하는 결과를 보였다(Figure 3B,  $p < 0.001$ ). 피부의 노란색을 나타내는 b\*값은 사용 전 대비 사용 후 2 주, 사용 후 4 주에 측정값이 감소하는 경향을 보였으며, 전체적인 피부색을 나타내는 ITA값은 사용 전 대비 사용 4 주 후 측정값이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 사용 2 주 후 4.7%, 사용 4 주 후 15.8% 개선되었다( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Results of skin elasticity and skin torsion elasticity measurement after using mask pack (average  $\pm$  standard error) 0 week vs. 2 weeks, 4 weeks, One-way ANOVA analysis. Significant \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

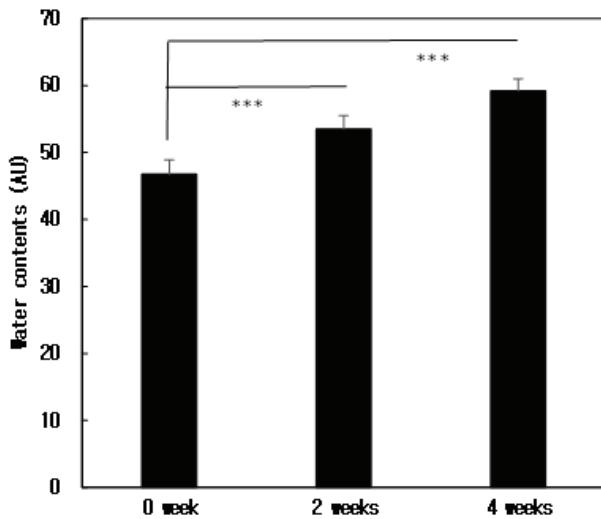
Assessment	0 week	2 weeks	4 weeks
Skin elasticity <sup>1</sup>	Indent	0.362 $\pm$ 0.0073	0.384 $\pm$ 0.0103
	K	0.908 $\pm$ 0.0154	0.942 $\pm$ 0.0153
	Alpha	0.041 $\pm$ 0.0005	0.037 $\pm$ 0.0004***
	Mean CoR	0.616 $\pm$ 0.0044	0.630 $\pm$ 0.0056*
	Area	38.236 $\pm$ 0.9207	42.738 $\pm$ 0.9423***
Torsion elasticity <sup>2</sup>	Ue	2.491 $\pm$ 0.1570	2.348 $\pm$ 0.1720
	Uv	1.113 $\pm$ 0.0461	1.056 $\pm$ 0.0384
	Ur	1.670 $\pm$ 0.0876	1.700 $\pm$ 0.1307
	Ur/Ue	0.680 $\pm$ 0.0108	0.723 $\pm$ 0.0111***

<sup>1</sup>Skin elasticity factors

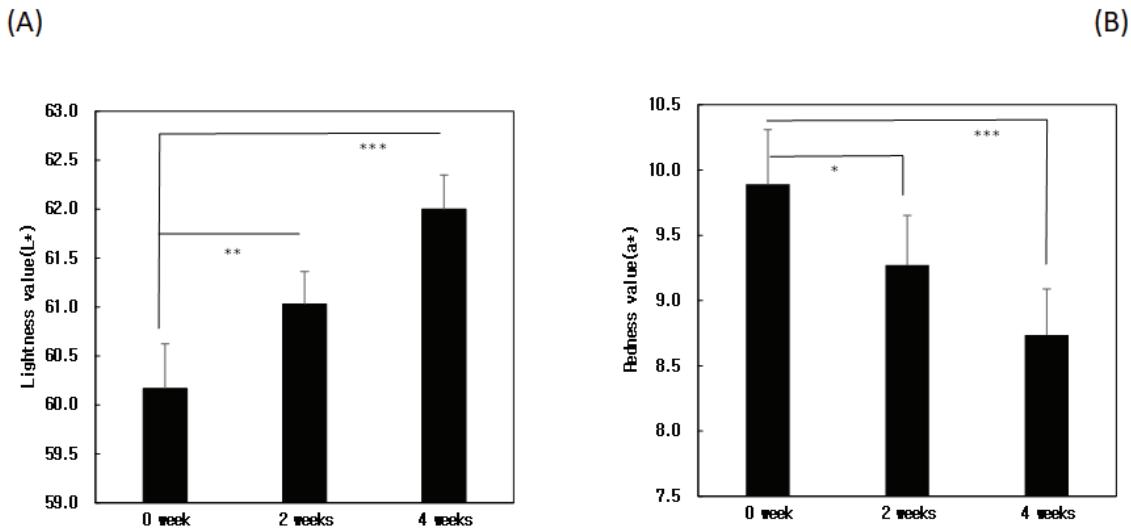
- Indent: Indentation depth(mm)
- K: Start height(mm)
- Alpha: Rate of exponential decay
- Mean CoR: Average CoR
- Area: Area under the curve

<sup>2</sup>Torsion elasticity factors

- Ue: Immediate extensibility(degrees)
- Uv: Visco-elastic extensibility(degrees)
- Ur: Immediate recovery(degrees)
- Ur/Ue: Elasticity ratio



**Figure 2.** Results of water contents for mask pack (average and standard error bar) during 4 weeks application. 0 week vs. 2 weeks, 4 weeks, One-way ANOVA analysis, significant \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 3.** Results of skin color for mask pack(average and standard error bar) during 4 weeks application. 0 week vs. 2 weeks, 4 weeks, One-way ANOVA analysis, significant \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (A) Lightness value, (B) Redness value.

#### 4. 결 론

*F. islandicum* AW-1이 깃털을 분해하여 생산하는 케라틴 펩타이드는 일반 펩타이드와는 다른 황(sulfur)을 함유하는 희귀아미노산 및 필수아미노산 함량이 많아 과거에 가축들의 영양원으로 사용되었다. 이렇게 얻어진 케라틴 펩타이드를 화장품 소재로 활용하고, 그 효과를 극대화하기 위

하여 극성 저분자 케라틴 펩타이드 분리를 진행하였다. 피부 및 헤어, 손톱의 주요 구성성분인 케라틴임을 확인하여, 이에 대한 피부의 효능에 탄력관련 영향을 살펴보기 위하여 탄력관련 세포 실험 및 화장품 제형 중 하나인 마스크 팩을 제조하여 인체 효력 시험을 진행하였다.

인체 섬유아세포주를 이용하여 극성 저분자 케라틴 펩

타이드의 농도에 따른 세포독성 및 탄력 관련 효능인 탄력 섬유 합성능, 콜라겐 합성능을 살펴본 결과, 극성 저분자 케라틴 웹타이드는 인체 섬유아세포에 독성이 없는 것을 확인하였으며, 엘라스틴 분해효소를 저해함으로써, 세포 내 탄력 섬유 증가와 콜라겐 합성능 증가를 통해 피부 세포의 탄력 효과를 확인하였다.

극성 저분자 케라틴 웹타이드를 함유한 마스크팩을 사용한 피험자를 대상으로 4 주 동안 제품 사용에 따른 피부 개선 시험을 진행한 결과, 피부 탄성 측정에는 모든 측정 인자들이 통계적으로 개선된 것을 확인하였다. 피부 비틀림 탄력 측정에서는 Ur값과 Ur/Ue 값에서 통계적으로 유의하게 개선되었다. 피부색 측정에서는 L\*, ITA\*에서 통계적으로 유의하게 개선된 것을 확인하였다. 피부 수분량 측정에서는 사용 후 4 주에 통계적으로 유의하게 개선된 것을 확인하였다. 이를 통해 극성 저분자 케라틴 웹타이드는 피부 탄력과 피부색, 피부 수분량 개선에 도움을 주는 것을 확인하였다.

본 연구를 통하여 극성 저분자 케라틴 웹타이드의 세포 내 탄력 개선 효능과 더불어 인체 피부 탄력 개선에 효과적인 것을 확인하였다. 이를 기반으로 향후 극성 저분자 케라틴 웹타이드는 인체에 안전하며 효능이 극대화 시킬 수 있는 원료로 피부 탄력 관련 제품의 활용 가능성을 기대할 수 있었다.

## Reference

- N. J. Gang, H. S. Jin, S. E. Lee, H. J. Kim, and H. Koh, New approaches towards the discovery and evaluation of bioactive peptides from natural resources, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **50**(1), 72 (2019).
- T. Uhlig, T. Kyprianou, F. G. Matinelli, C. A. Oppici, D. Heiligers, D. Hills, X. R. Calvo, and P. Verhaert, The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation, *EuPA Open Proteomics*, **4**, 58 (2014).
- H. Korhonen and A. Pihlanto, Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods, *Curr. Pharm. Des.*, **9**(16), 1297 (2003).
- G. Tucker, B. DeSilva, J. Dressman, M. Ito, T. Kumamoto, D. Mager, H. Mahler, A. H. M. Zeem G. M. Pauletti, H. Sasaki, V. Shah, D. Tang, and M. Ward, Current challenges and potential opportunities for the pharmaceutical sciences to make global impact: An FIP perspective, *J Pharm Sci*, **105**(9), 2489 (2016).
- B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, and M. A. Meyers, Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration, *Progress in Materials Science*, **76**, 229 (2016).
- J. Henry, E. Toulza, C. Y. Hsu, L. Pellerin, S. Balica, J. Mazereeuw-Hautier, C. Paul, G. Serre, N. Jonca, and M. Simon, Update on the epidermal differentiation complex, *Front Biosci (Landmark Ed)*, **17**, 1517 (2012).
- Y. J. Lee, H. Jeong, G. S. Park, Y. Kwak, S. J. Lee, M. K. Park, J. Y. Kim, H. K. Kang, J. H. Shin, and D. W. Lee, Genome sequence of a native-feather degrading extremely thermophilic *Eubacterium, Fervidobacterium islandicum* AW-1, *Stand Genomic Sci*, **10**, 71 (2015).
- H. S. Jin, K. Song, J. H. Baek, J. E. Lee, D. J. Kim, G. W. Nam, N. J. Kang, and D. W. Lee, Identification of matrix metalloproteinase-1-suppressive peptides in feather keratin hydrolysate, *J. Agric. Food Chem.*, **66**(48), 12719 (2018).
- G. W. Nam, D. W. Lee, H. S. Lee, N. J. Lee, B. C. Kim, E. A. Choe, J. K. Hwang, M. T. Suhartono, and Y. R. Pyun, Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe, *Arch. Microbiol.*, **178**(6), 538 (2002).
- H. S. Jin, S. Y. Park, K. Kim, Y. J. Lee, G. W. Nam, N. J. Kang, and D. W. Lee, Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates, *PLoS ONE*, **12**(2), e0172712 (2017).
- Y. J. Lee, I. Dganasingh, J. S. Ahn, H. S. Jin, J. M. Choi, S. H. Lee, and D. W. Lee, Biochemical and structural characterization of a keratin-degrading M32 carboxypeptidase from *Fervidobacterium islandicum*

- AW-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **468**(4), 927  
(2015).
12. G. W. Nam, Study on changes of hair and scalp characteristics by keratin peptides, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(4), 353 (2019).