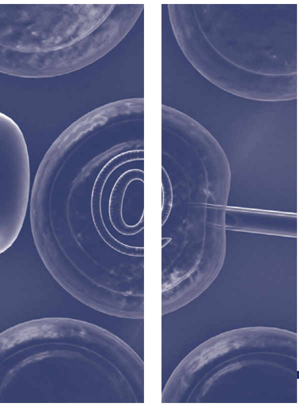


화장품 원료용 펩타이드의 효모 발효 생산 기술

유 병 조 수석연구원
한국생산기술연구원
청정생산시스템연구소
bjyu@kitech.re.kr

장 지 연
한국생산기술연구원
청정생산시스템연구소
day01277@kitech.re.kr

1. 국내외 화장품 시장의 지속적 증가

인류의 아름다움에 대한 끝없는 추구, 여성 경제활동의 증가, 중국을 비롯한 동남아 시장 확대 및 고령화에 의한 웰빙시대의 도래로 국내외 화장품 시장은 지속적으로 증가하고 있다. 2015년 기준 세계 화장품 시장규모는 약 420조이며, 국내는 12.8조 규모이다[1]. 화장품 시장 중 Skin Care와 Hair Care시장이 전체 시장 중 50% 이상을 차지하고 있다. 특히, Hair Care 시장에서 탈모방지 및 발모촉진용 화장품의 수요가 최근 들어 늘어나고 있는 상황이다. 탈모방지 및 발모촉진 제품의 함유물질로 유기 및 무기 소재, 오일, 천연추출물, 항균물질, 펩타이드 등이 있다. 우리나라의 경우 탈모방지 화장품 또는 샴푸는 기존 샴푸의 기본원료에 천연추출물(한방성분)을 주로 혼합하여 제품화하고 있다. 미국과 유럽의 경우 다양한 기능성 펩타이드가 Hair Care뿐만 아니라 Skin Care 제품의 원료로 사용되어지고 있다.

2. 화장품 원료 기능성 펩타이드 카퍼펩타이드(GHK-Cu)

펩타이드는 독성이 적어 안전하며, 강력한 생리활성을 가지고 있고, 정확한 활성기전이 규명되어져 있어 활용 폭이 매우 넓은 물질이다. 또한 빛과 공기에 안정적이고 물과 강한 친화력과 보습력을 가지고 있어 화장품 소재로 활용도가 매우 높은 편이다. 화장품용 기능성 펩타이드는 보습, 노화방지, 피부재생, 주름개선, 미백의 효능을 가지고 있으며, 노화로 인하여 생성되는 검버섯, 눈 밑 다크서클, 피부탄력의 개선에도 매우 효과적이다. 최근 들어 기능성 펩타이들을 활용한 피부재생 화장품들이 지속적으로 개발되고 있으며(표 1), 특히 미국과 유럽에서 고부가가치 화장품 원료로 인정

표 1. 현재 화장품 원료로 사용되고 있는 주요 기능성 펩타이드

#	peptide name	아미노산 서열	효능
1	Palmitoyl Tetrapeptide-7	PAL-GQPR	피부 탄력, 항노화, 수분유지
2	Palmitoyl pentapeptide-4	PAL-KTTKS	주름 개선
3	Palmitoyl Tripeptide-1	PAL-GHK	피부 세포의 재생 촉진, 손상 방지
4	Palmitoyldipeptide-5diaminohydroxybutyrate	Pal-Lys-Val-Dab-OH	피부 탄력 및 유연성 향상 등
5	Dipeptide Diaminobutyroyl Benzylamide Diacetate	H-b-Ala-Pro-Dab-NH-Benzyl.2AcOH	주름 개선
6	Snap-8	Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-Ala-Asp-NH2	항노화
7	Dipeptide-2	H-Val-Trp-OH	눈 밑 지방 감소
8	Acetyl Tetrapeptide-5	Ac-Beta-Ala-His-Ser-His-OH	눈 밑 지방 감소
9	Oligopeptide-20	H-Cys-Arg-Lys-Ile-Pro-Asn-Gly-Tyr-Asp-Thr-Leu-OH	항노화
10	Copper peptide-1	H-Gly-His-Lys-OH	발모 촉진, 피부 재생, 피부 탄력
11	Carnosine	H-Beta-Ala-His-OH	항산화
12	Cysteine peptide	Ac-RFAACAA-OH	미백
13	AHK-Cu	(Ala-His-Lys)2.Cu	발모 촉진
14	Acetyl Hexapeptide-3	Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH2	주름 개선
15	Acetyl tetrapeptide-15	Tyr-Pro-Phe-Phe	주름 개선, 항노화
16	Acetyl tetrapeptide-2	Ac-Lys-Asp-Val-Tyr	피부 재생, 항노화, 발모 촉진
17	Acetyl tetrapeptide-5	Ac-Ala-His-Ser-His	피부 재생, 눈 밑 지방 감소
18	Acetyl Decapeptide-3	Ac-YRSRKYTSWY-NH2	피부 재생
19	Ac-KGHK	Ac-Lys-Gly-His-Lys	발모 촉진
20	Biotinoyl Tripeptide-1	Biotin-Gly-His-Lys	발모 촉진
21	Copper Tripeptide-3	Ala-His-Lys.Cu	발모 촉진
22	Dipeptide-2	Val-Trp	눈 밑 지방 감소, 항노화
23	Hexapeptide-11	Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro	항노화
24	Palmitoyl hexapeptide-12	Pal-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly	주름 개선
25	Hexapeptide-2	MP(dF)R(dW)FKPV-CONH2	주름 개선, 항노화
26	Hexapeptide-9	Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln	피부 재생
27	HGG	His-Gly-Gly	발모 촉진
28	Octapeptide-2	Thr-Ala-Glu-Glu-His-Glu-Val-Met-CONH2	발모 촉진
29	Pal-KTTK	Pal-KTTK	콜라겐 합성, 주름 개선
30	Pal-Tripeptide	Pal-RFK	콜라겐 합성, 주름 개선, 수분 공급

받고 있다.

카퍼펩타이드는 우리 몸속의 혈액 내 플라즈마에 존재하는 펩타이드로 피부 내 상처가 났을 때 이를 회복시켜 피부를 빠르게 재생시켜주는 역할을 하는 펩타이드로써[2], Glycine, Histidine, Lysine의 3개의 아미노산과 Cu^{2+}이온이

결합하여 활성을 나타낸다(그림 1). 1973년 Pickart박사에 의해 발견하여 특허 받은 물질로 처음에는 상처치유 촉진제로 많이 사용되었으나, 피부 진피층의 가장 중요한 성분인 콜라겐과 엘라스틴의 합성에도 중요한 역할을 하는 것으로도 알려졌다[3]. 또한 두피 및 모낭세포의 성장확대 및 세포분열을 촉진하는 것으로 알려져, 현재 다양한 Skin Care 크림제품과 Hair Care 화장품 원료(샴푸)에 함유돼있다. 피부 및 모발 재생에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고된 카퍼펩타이드는 혈류의 변화를 유도하여 모낭에 적절한 영향을 공급해줘 두꺼운 모간을 가진 모발이 빠르게 성장하도록 한다.

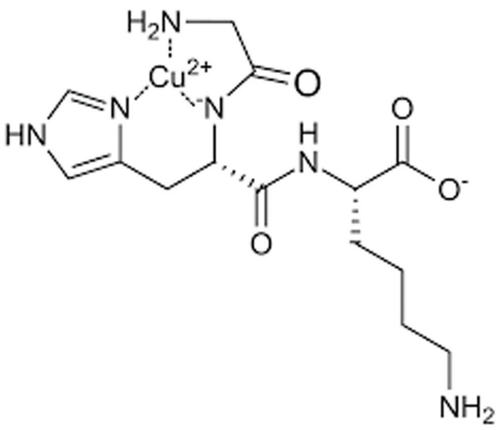
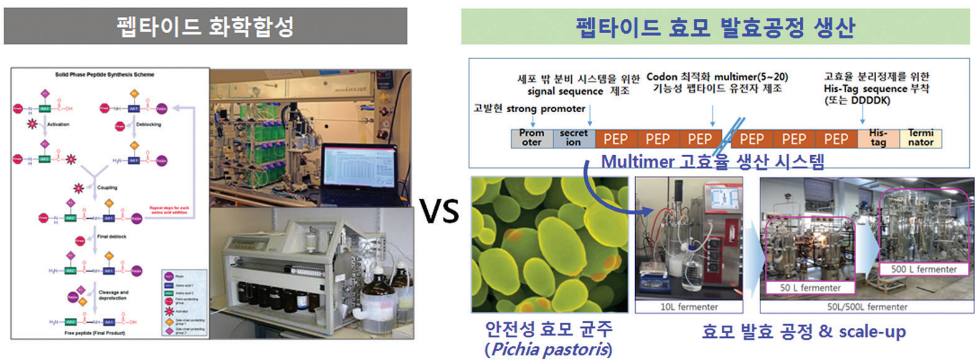


그림 1. 카퍼펩타이드(GHK–Cu)의 구조발효 생산의 비교

3. 효모 발효공정을 이용한 카퍼펩타이드 생산

현재, 화장품 원료로 사용되고 있는 짧은 길이의 펩타이드는 화학합성으로 생산되고 있다. 국내에서 3개 아미노산으로 구성된 펩타이드의 1g 화학합성비용은 40만원 수준이다. 이러한 고가의 화학합성 비용에 대한 부담감으로 화장품에 펩타이드의 함유량이 극소량에 불과해 그 효과가 제대로 발휘되지 못하고 있다. 또한, 그 구성성분이 인간 유래 안전성이 확보된 펩타이드지만, 화학합성을 통해 제조되기 때문에 그 과정에서 첨가되는 화학유해물에 의한 피부 부작용이 일어날 수도 있으며, 화학합성이라 제조 광고를 할 수도 없는 상황이다. 또한 화학합성 공정은 생산 capacity가 제



핵심이슈	화학합성	효모 발효공정 생산
가격 경쟁력	$400/g (3~4개 아미노산 기준) ➔ 생산 capa.가 매우 제한적임. ➔ Scale-up의 제한성 존재로 생산가 절감요소 없음.	$40/g (3~4개 아미노산 multimer 10mer 생산, 10L 발효 기준) $15/g (3~4개 아미노산 multimer 20mer 생산, 500L 발효 기준) $15/g (3~4개 아미노산 multimer 20mer 생산, 500L 발효, 효소 자체 생산 기준): Scale-up에 의한 Kg 수준 생산 가능 ➔ Multimer수, 발효 Scale 확대 및 자체 효소생산으로 생산가 절감
스토리텔링	➔불순물 및 미량의 피부자극 화학물 존재 ➔ 화학합성에 대한 언급 회피	➔ 친환경 효모 발효공정 이용한 자연과학 발효 화장품 스토리텔링 (예: SK-II 피테라 에센스)

그림 2. 펩타이드의 화학합성과 효모 발효 생산의 비교

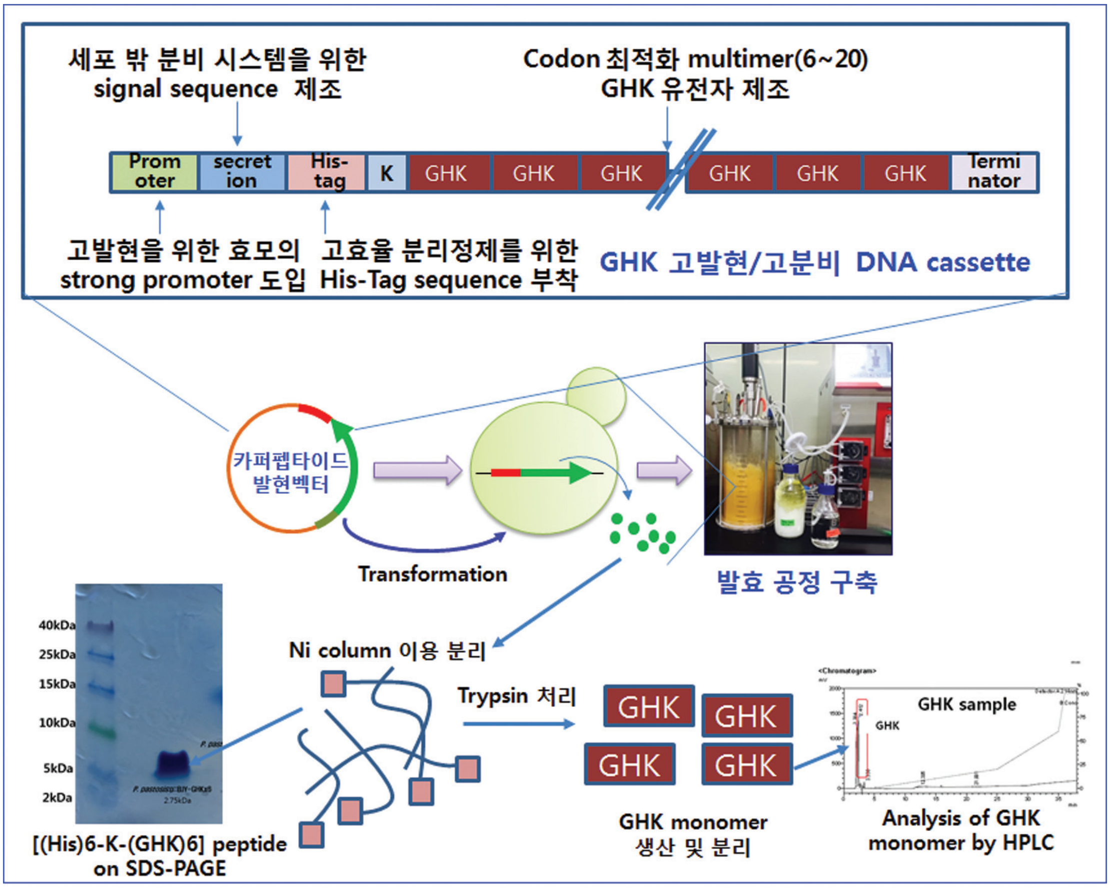


그림 3. 고효율 카퍼펩타이드 발효 생산 기술

한적이며 가격 절감요소가 없다(그림 2). 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 방안으로 효모 발효공정에 의한 펩타이드의 고효율 생산 기술 개발을 들 수 있다. 화학합성 대신 안전성 효모 균주의 발효공정을 이용한 생물공정으로 카퍼펩타이드를 고효율로 생산할 수 있다면, 가격 경쟁력 및 안전성 측면에서 화장품 수요기업의 니즈와 친환경 스토리텔링에 의한 광고효과의 극대화를 가져올 수 있다.

카퍼펩타이드의 고효율 효모 발효 생산을 위한 핵심기술로는 카퍼펩타이드의 multimer제작, 발효 scale-up 및 경제적 고순도 분리정제 기술이 있을 수 있다.

카퍼펩타이드가 화학합성 제조단가에 대해 경쟁력을 갖기 위해서는 고효율 생산과 경제적인 분리정제 기술의 개발이 우선적으로 필요하다. 이를 위해 GHK multimer를 설계하였고, 효율적인 분리정제를 위해 His-tag이 도입된 DNA cassette를 설계하였다(그림 3). Multimer의 경우 6, 10, 20 mer를 설계하였고, 트립신(trypsin)을 이용한 multimer의 monomer 전환과 His-tag 제거를 위해 His-tag 다음에 K(lysine)잔기를 첨가하였다. 세포 밖 분비를 위해 *Saccharomyces cerevisiae* 유래 α-mating factor sequence를 도입하였다.

제조된 DNA cassette를 안전성 효모 균주인 *Pichia pastoris*의 genome상에 삽입시킨 후 10L 발효조 기반으로 카퍼펩타이드를 발효생산 하였다. 발효액만을 수집하여 이를 Ni-column을 이용하여 분리하였고, 6개의 GHK multimer를 포함하고 있는 [(His)6–K–(GHK)6] peptide를 SDS–PAGE 상에서 확인하였다. GHK monomer 생산을 위해 분리정제된 [(His)6–K–(GHK)6] peptide를 트립신으로 처리하였다. 트립신 처리 후 분리된 (His)6–K를 제거하기 위해 Ni–column을 한 번 더 통과시켜 GHK monomer만을 재분리정제 한 후 HPLC를 통하여 GHK monomer를 확인하였다.

4. 가격 경쟁력 향상을 위한 이슈

기존 화학공정 대비 효모 발효공정에 의한 카퍼펩타이드의 생산이 가격적 경쟁력을 갖기 위해서는 다음과 같은 이슈들이 존재한다.

발효생산에 있어 카퍼펩타이드의 높은 생산농도의 달성이 필요하다. 카퍼펩타이와 같이 짧은 아미노산으로 구성된 펩타이드의 경우 기존 화학합성 제조단가를 뛰어넘기 위해서는 500mg/L 이상의 발효생산 농도 달성이 필요하다. 여기에 scale–up에 의한 대량생산 공정이 최적화 된다면 가격 경쟁력은 훨씬 더 높아질 수 있다.

본 개발기술에서는 고농도 카퍼펩타이드 생산을 위해 multimer system을 활용하였다. 카퍼펩타이드 multimer를 monomer로 전환하기 위해 트립신 처리가 필요한데, 이는 효소를 사용하는 공정이므로 제조단가에 큰 영향을 줄 수밖에 없다. 따라서, 카퍼펩타이드 multimer를 효모를 통해 발효 생산하듯이 트립신 또한 자체적으로 효모 발효공정에 의해 생산하여 사용한다면 제조단가를 절감할 수 있다.

마지막으로 분리정제에 사용되는 Ni–column을 대용량 scale로 제조하고 재사용을 통한 분리정제 비용 절감 공정개선이 필요하다.

이러한 펩타이드의 효모 발효 생산기술은 친환경 스토리텔링에 의한 광고효과 극대화와 기존 화학공정 대비 높은 가격 경쟁력을 가질 수 있는 기술로 발전하여 사업화 될 수 있을 것이다. 또한, 화장품 원료뿐만 아니라 cosmeceutical 및 pharmaceutical 소재 개발에도 똑같이 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 서건석, 박종숙, 신민선. 2016년 화장품 산업 분석 보고서, 2016.12.
2. Pickart L, Vasquez–Soltero JM, Margolina A. GHK peptide as a natural mudulator of multiple cellular pathways in skin regeration. *Biomed. Res. Int.* 2015.
3. Pickart L. Tripeptide from human serum which enhances the growth of neoplastic hepatocytes and the survival of normal hepatocytes. University of California, 1973.
4. 유병조. *카퍼펩타이드 제조용 발현 카세트 및 이의 이용*. **10**–2016–0133794.