

## 아쿠아포닉스 기술을 이용한 친환경 항노화 제품 개발

김유아·전태병·장욱주·박병준·강학희<sup>†</sup>

한국콜마(주) 피부천연물연구소

\*농업회사법인 만나씨이에이(주)

(2019년 9월 2일 접수, 2019년 9월 23일 수정, 2019년 9월 27일 채택)

### Development of Sustainable Anti-aging Products Using Aquaponics Technology

You Ah Kim, Tae Byeong Jeon\*, Wookju Jang, Byoung Jun Park, and Hakhee Kang<sup>†</sup>

Skin & Natural Products Lab., Kolmar Korea Co., Ltd., 61, Heolleung-ro 8-gil Seocho-gu, Seoul, 06800, Korea

\*Mannacea

(Received September 2, 2019; Revised September 23, 2019; Accepted September 27, 2019)

**요약:** 본 연구에서는 국내 자생식물로부터 지속가능한 천연 항노화 화장품 신소재 개발을 위해 수생식물인 어리연꽃의 친환경 아쿠아포닉스 시스템 적용 가능성 및 항노화 효능을 검증하였다. 어리연꽃은 아쿠아포닉스 시스템내에서 부엽형태의 담액식 방식에서 성장 가능하고, 근경번식을 통해 증식됨이 확인되었다. 또한, 어리연꽃의 재배에 질산염, 칼륨 및 수온이 크게 영향을 미치며, 최적 조건은 각각 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 63.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 25  $^{\circ}\text{C}$ 로 확인되었다. 특히 주성분 2종(3,7-di-*O*-methylquercetin-4'-*O*- $\beta$ -glucoside 및 sweroside)이 약 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상 함께 존재 시 시너지 유효성이 있었다. 어리연꽃 추출물은 환경 유해물질 benzo[a]pyrene, ammonium nitrate, formaldehyde에 의해 손상된 피부 세포의 회복에 유의미한 효과가 있으며, 염증성 조절 인자인 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 COX-2를 억제하고, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 생성을 억제함으로써 항염 및 항노화 효과가 있음이 확인되었다. 따라서 아쿠아포닉스 기술 기반 어리연꽃 추출물의 원료 표준화는 화장품 분야에서 신규 항노화 기능성 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

**Abstract:** To develop sustainable new natural anti-aging ingredients from Korean native plants, we investigated the cultivation potential of *Nymphoides indica* using the eco-friendly aquaponics system, and tested the anti-aging effects from *N. indica* extracts. *N. indica* could be grown in aquaponics system using floating leaved deep water culture method, and propagated through rhizome propagation. It was confirmed that the nitrate (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), potassium (63.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and water temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ) greatly affected the cultivation of the *N. indica*. In addition, synergistic effects were found when two major components (3,7-di-*O*-methylquercetin-4'-*O*- $\beta$ -glucoside & sweroside) were present at more than about 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The extract had a significant effect on the recovery of skin cells damaged by environmental pollutant such as benzo[a]pyrene, ammonium nitrate, formaldehyde. It also suppressed PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and COX-2, and inhibited the production of MMP-1. Taken together, the results suggested that the standardized extracts of *N. indica* cultivated in the aquaponics has considerable potential as a new cosmetics ingredient with an anti-aging effect.

**Keywords:** sustainable aquaponics, *Nymphoides indica*, standardization, anti-aging

## 1. 서론

전 세계적으로 급속한 산업화 및 도시화는 대기, 토양,

수질 등 심각한 환경오염과 자원고갈의 문제를 야기하며 인류의 미래를 위협하고 있다[1-3]. 최근 이러한 자원의 고갈성과 유한성을 인식하며 다양한 분야에서 '지속가능성'에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 친환경적으로 도시성장을 이룰 수 있는 다양한 대안이 모색되고 있다 [4-10]. 화장품 산업에서도 폐자원을 활용하여 제품을 개발

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: hhkang@kolmar.co.kr  
call: 02-3459-5585)

하거나 지속가능한 원료를 대체하고자 하는 노력들이 이루어지고 있다[11,12]. 특히, 천연화장품에 대한 소비자의 니즈는 감성적인 코스메틱 산업에서 유기농 및 친환경을 내세우는 신제품의 개발로 이어지고 나아가 마케팅 요소로도 작용하고 있어 친환경산업 변화를 유도하고 있다. 아쿠아포닉스(aquaponics)란 수산양식(aquaculture)와 수경재배(hydroponics)가 결합된 최첨단 시스템으로 수산양식에서 발생하는 배설물을 식물 성장 영양소로 이용하면서 수질 정화 및 식물성장을 지속적으로 이어가는 유기생산법이다[13,14]. 이 기술은 수산양식에서 발생하는 과량의 오폐수를 친환경적으로 재사용함으로써 부영양화, 녹조, 적조 등의 수질오염을 예방함과 동시에 식물 재배에 필요한 농약, 비료 등의 사용을 유기농으로 대체함으로써 글로벌 지속 가능한 기술로 각광을 받고 있다[15]. 국내에서도 Ha & Jeong (2017)에 의해 엽채류 생산성 검토가 선행되어, 청하 청치마 상추 품종의 생산성에 유의미한 효과를 보고한 바 있다[16]. 하지만 여전히 시설 도입 비용에 따른 경제성에 대한 논쟁이 있으며, 이에 따라 고부가가치 자원의 발굴과 산업화 도입이 절실한 실정이다.

수생식물은 주로 물속이나 물가에 서식하는 식물로 수중이라는 독특한 환경에서의 생존에 적응하기 위해 기존 육상식물과는 다른 2차 대사산물을 생산할 것으로 추정되거나 그 산업적인 연구 사례는 육상식물에 비하여 낮은 실정이다[17,18]. 따라서 본 연구진은 산업적 가치를 갖는 새로운 수생식물 소재를 발굴하고자 한국에서 자생하는 3종의 어리연꽃속 식물을 천연물화학적으로 연구하여 어리연꽃(*Nymphoides indica*) 및 노랑어리연꽃(*N. peltata*) 추출물로부터 미백 및 주름 개선 등의 신규 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다[19-22]. 특히, 어리연꽃은 예로부터 열병, 머리 아픔 등 전통 약용작물로도 사용되어왔으나, 이를 산업화하기 위한 작물의 대량 확보가 어려워 자연을 훼손하지 않고 안정적으로 화장품 원료를 개발할 수 있는 표준화 연구가 필요한 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내 최초로 지속가능한 아쿠아포닉스 시스템으로 어리연꽃의 표준화를 연구하여 새로운 화장품 원료로의 개발 가능성을 입증하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 추출

본 실험에 사용된 어리연꽃은 국내산으로 광주광역시에

소재한 농업회사법인 (주)로터스그린(Korea)에서 구매하여 사용하였으며, 국립생물자원관 생물자원연구부 식물자원과의 확증표본(NIBRVPO000592689)으로 생물 종 판별 시스템에 의해 확인되었다. 종판별된 어리연꽃은 농업회사법인 만나씨이에이의 아쿠아포닉스 시설에서 재배되었으며, 어리연꽃의 전초는 음건한 후 실온에서 에탄올에 3일 동안 침지시키고 이 과정을 3회 반복하여 농축 후 동결 건조하여 추출물을 얻었다. 획득한 추출물은 성분 분석 및 *in vitro* 효능 평가에 사용되었다.

### 2.2. 시약 및 기기

표준품인 sweroside는 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (China)로부터 구입하였으며, 유효/지표성분의 함량 분석은 Shimadzu LC-20A HPLC (high-performance liquid chromatography) system (LC-20AD pumps, Diode array detector (SPD-M20A), Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 항노화 효과 측정에 사용된 시약인 benzo[*a*]pyrene은 Wako (Japan), ammonium nitrate, formaldehyde solution (36.5 ~ 38% in H<sub>2</sub>O), epigallocatechingallate (EGCG)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 세포독성 실험 및 배양을 위한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (USA), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin streptomycin (100X)는 Hyclone (USA) 제품을 사용하였다. 유효성 평가를 위한 MMP-1, Pro-COL1A1,  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였으며, PRO-PREP (Protein extraction solution)과 immobilon western chemiluminescent HRP substrate는 각각 iNtRON Biotechnology (Korea)와 Immobilon (Millipore, USA) 제품을 사용하였다. PGE<sub>2</sub> assay kit 및 TNF- $\alpha$  ELISA kit는 각각 R&D system (USA) 및 Thermo Fisher Scientific (USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 UV irradiation system은 World corporation (Korea), microplate reader 장비는 Bio-rad model 680 (Hercules, USA)를 사용하였으며, Chemi-Doc과 CS Analyzer는 Atto corporation (Japan), LAS4000 (Fuji Film, Japan) 제품을 사용하였다.

### 2.3. 어리연꽃 표준화 연구

#### 2.3.1. 환경 조건별 성장 측정

국내 자생의 어리연꽃속 대표식물인 어리연꽃에 대하여

자원화 및 표준화를 위한 재배 연구를 수행하였다. 재배 기간 동안 영양액 내의 pH, 질산염, 인산염, 칼륨 등의 다양한 미량원소의 농도 변화 양상을 측정하고 이를 정량화 하였다. 재배 방식을 표준화하고자 다양한 물리적 환경을 조정하여 이에 따른 결과를 관찰하였다. 온도와 영양 성분이 표본의 성장에 어떻게 영향을 주었는지 관찰하기 위해 생육 조건에 따라 생체 중량을 측정하였으며, 측정은 2개의 상이한 온도 성장 조건에서 표본을 공식적으로 이식한 후 7일, 14일, 21일 및 28일간으로 진행하였다.

### 2.3.2. 토양 조건별 재배 실험

담액식(deep water culture, DWC)를 이용한 부엽 환경 조성을 위하여 아쿠아포닉스 농장 내부에 수류가 발생하지 않는 배드와 뿌리 성장 환경 조성을 위한 연구를 수행하였다. 외부 병충해 확산을 방지하기 위하여 독립된 공간에서 양분 및 배수 등을 조절하였으며, 뿌리 성장 환경을 위해 피트모스, 마사토, 자갈을 조합한 토양 조성 및 황토볼(630 g/pot) 토양 조성 방법을 통하여 담액식 재배 실험을 진행하였다. 또한, 이를 통하여 인공 배양액에서의 어리연꽃의 번식 방법을 관찰하였다.

### 2.3.3. 환경조건별 성분 변화 분석

어리연꽃에 대한 환경 조건별 성분 변화를 관찰하기 위하여 2016년 12월부터 2018년 7월까지 월별로 재배, 수확한 시료를 대상으로 추출물 내 2종의 유효/지표성분(3,7-di-O-methylquercetin-4'-O-β-glucoside (C1), sweroside (C2)) 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석을 위한 컬럼은 C18 (phenomenex, 5 μm, 4.6 × 250 mm)을 사용하였고, 이동상은 물과 아세트나이트릴(gradient, 95/5 ~ 0/100, v/v, 50 min, 0.8 mL/min)을 사용하였다. 유효/지표성분의 확인은 기 보고된 분광학적 자료를 이용하여 확인하였다[23-25].

## 2.4. 어리연꽃 추출물의 항노화 효과 측정

### 2.4.1. 세포 배양 및 세포 생존율 측정

CCD-986sk 세포(human skin dermal fibroblast)는 american type culture collection (Manassas, USA)에서 구입하였으며, HaCaT (immortalized human keratinocytes)은 경희대학교 김형민 교수로부터 분양받아 사용하였다. MTT assay를 통해 세포생존율을 측정하기 위해 각 세포를 10% FBS 및 1%

streptomycin/penicillin이 함유된 DMEM 배지에서 세포배양기 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건으로 계대 배양 하였다. 이후 CCD-986sk 세포의 경우, 1 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96 well plate에 24 h 배양 후 농도별 시료를 처리하고 다시 45 h 배양시켰다. HaCaT 세포의 경우, 시험 종류에 따라 2 × 10<sup>3</sup> cells/well 및 5 × 10<sup>3</sup> cells/well mL 농도로 96 well plate에 24 h 배양 후 농도별 시료를 처리하고 다시 21 h 배양시켰다. 배양된 두 세포 모두 동일하게 5 mg/mL MTT 용액을 20 μL 처리하고 3 h 반응시킨 후 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150 μL 넣고 10 min간 교반한 뒤 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며 실험 대조구는 시료를 넣지 않은 blank로 하였다.

### 2.4.2. 환경 유해물질에 의한 세포 손상 회복 효능 측정

HaCaT 세포를 2 × 10<sup>3</sup> cells/well 농도로 96 well plate에 24 h 배양한 후 대기 오염원으로 알려져 있는 세 가지 세포 손상 인자 benzo[a]pyrene, ammonium nitrate 및 formaldehyde를 2.5, 500, 및 1.5 μg/mL의 농도로 각각 독립적으로 세포에 처리하였다. 이후 시료를 25, 50 및 75 μg/mL의 농도로 처리하고 다시 21 h 배양시키고, 배양이 끝난 후 세포 생존율 측정과 동일한 방식으로 MTT 용액을 처리하고 흡광도를 측정하였다.

### 2.4.3. 항염증 효과 측정

HaCaT 세포를 5 × 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 6 well plate에 안정화 시켰다. 24 h 후 PBS로 2회 washing 한 뒤 1 mL의 PBS를 well에 채워 ultraviolet B (UVB, 312 nm)를 20 mJ/cm<sup>2</sup> 조건으로 조사한 뒤 시료를 5, 10, 25 μg/mL의 농도로 배지와 함께 시료를 처리하여 48 h 배양하였다. 세포의 배양액을 수거하여 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 및 tumor necrosis factor (TNF)-α 측정 실험에 사용하였으며 각각 PGE<sub>2</sub> assay kit 및 TNF-α assay kit를 이용하여 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 활성을 수치화하였다. 또한 세포는 pellet을 확보하여 Pro-PREP solution으로 단백질을 획득한 후 cyclooxygenase (COX)-2 생성량을 측정하였다. 준비된 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 120 V에서 2 h transfer 하였다. 이어 5% skim milk에서 1 h blocking한 뒤 1차 및 2차 항체와 반응 시킨 후 Chemi-Doc 장치를 이용하여 현상 하였다.

#### 2.4.4. 콜라겐 분해 효소(MMP-1) 억제 효과 측정

CCD-986sk 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL의 세포 현탁액을 준비하여 100 mm cell culture dish에 15 mL 만큼 분주하였다 ( $6 \times 10^5$  cells/dish). 분주한 세포를 24 h 배양 후 UVA의 조사에 방해될 수 있는 인자를 제거하기 위하여 세포배지를 제거하여, PBS로 2회 washing 한 뒤 15 mL의 PBS를 dish에 채워 UVA (365 nm)를  $30 \text{ J/cm}^2$  조건으로 조사하였다. UVA 조사가 완료된 후 25, 50 및  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 배지와 함께 시료를 처리하여 다시 14 h 배양하였다. 반응 종료 후 세포 배지를 제거한 뒤 세포를 모아 Pro-PREP solution으로 세포 내 단백질을 획득 후 western blot를 수행하기 위해 전기영동하였다. PVDF membrane으로 transfer 시킨 뒤 membrane을 5% bovine serum albumin (BSA)로 blocking 하여, MMP-1의 발현량을 확인하기 위하여 1차 및 2차 항체를 순차적으로 처리하였다. 각 군별 발현량을 표준화하기 위하여 house keeping protein으로는  $\beta$ -actin을 사용하였다. 항체처리가 완료된 membrane에 immobilon western chemiluminescent HRP substrate를 처리하여 형광 반응을 유도 후 현상하였다. 현상에는 Chemi-Doc 장비를 활용하였으며, CS analyzer 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 단백질 발현량을 분석하였다. 시험 결과의 비교를 위한 양성대조구로는  $0.1 \mu\text{M}$  농도의 EGCG를 사용하였다.

#### 2.4.5. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS (Version 12.0, SPSS Inc., USA)을 사용하였다. 각 실험구의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 실험값과 대조값 사이의 통계적으로 유의한 차이는 2-표본 t 검정을 사용하여 분석하고 유의적

인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )에서 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

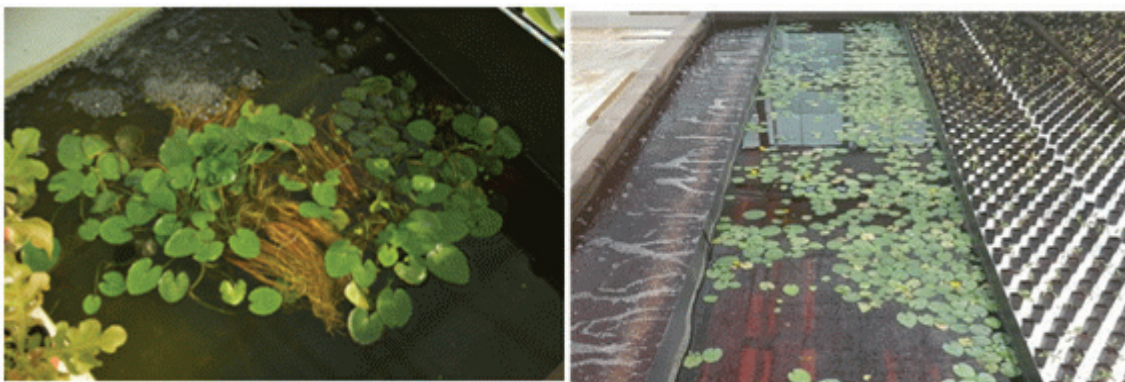
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 어리연꽃 표준화 연구

##### 3.1.1. 환경 조건별 성장 측정

어리연꽃 자원화 및 표준화를 위한 물리·영양·환경적 재배연구를 수행하였다. 물리적 환경으로 수생식물의 생육 환경과 유사한 담액식 방식을 적용하였으며, 일반적인 수경재배 방식인 부유(free-floating) 형태로 어리연꽃의 잎과 뿌리가 모두 떠다니는 환경에서는 성장 장애가 있음을 확인하였다. 이에 원인을 확인해 본 결과, 자생하는 어리연꽃의 뿌리가 바닥에 고정되어 자라는 생육 특성이 있음을 확인하였다. 이에 자생환경과 유사한 부엽(floating leaved) 형태의 배드 환경을 변경 도입한 결과, 물의 순환 및 균형적인 영양공급으로 성장에 '이상 없음'을 확인하였다(Figure 1).

영양적 요인으로는 양식 어종 가운데 환경 적응력이 뛰어난 향어(*Cyprinus carpio*)의 양식 부산물을 이용하여 자연적으로 분해되는 산물을 미량 조절하여 이용하였다. 어리연꽃의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 시기와 이 시기의 영양자료 평균치 산정을 통해 어리연꽃의 적정 영양성분을 확인해 본 결과, 질산염과 칼륨이 중요한 요인으로 판단되었으며, 이에 대한 적정농도는 각각  $80 \mu\text{g/mL}$  및  $63.5 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다. 또한, 환경적 요인 중에서 가장 큰



(A)

(B)

Figure 1. Practical deep water cultivation for *N. indica*. (A) free-floating and (B) floating leaved method.

**Table 1.** Calculated Parameters of The Initial Weight (g) While Being Supplied Nutrient Solution under Two Temperature Conditions

DAT <sup>z</sup>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>
0	7.00	7.00
7	9.19	10.38
14	10.41	13.54
21	11.33	15.28
28	12.20	16.46

DAT<sup>z</sup>, days after transplanting

W<sub>1</sub>, average temperature (over24-hourperiod) : 21 °C, general greenhouse environmental conditions

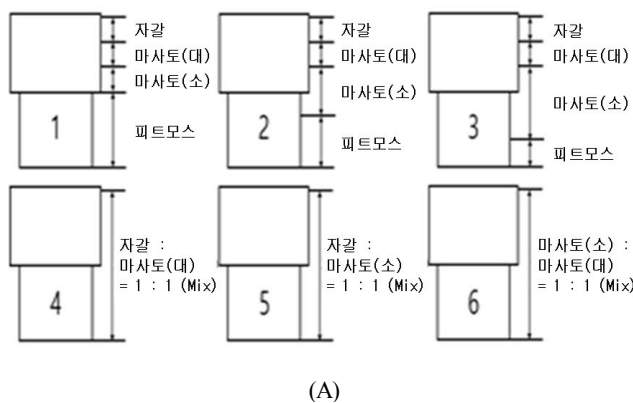
W<sub>2</sub>, average temperature (over24-hourperiod) : 25 °C, constant temperature greenhouse environmental conditions

영향을 미치는 인자는 수온으로 최적 수온은 25 °C로 낮은 온도 대비 재배 작물의 생중량이 증가함을 확인할 수 있었다(Table 1).

### 3.1.2. 토양 조건별 재배 실험

어리연꽃의 번식을 위해 피트모스, 마사토(소), 마사토(대), 자갈을 크기순으로 순차적으로 3 : 1 : 1 : 1, 2 : 2 : 1 : 1, 1 : 3 : 1 : 1 비율로 조합하여 3가지 조건에서 토양 적합성을 검토하였다. 그 결과, 부유물질을 방지하기 위해 토양 표층에 사용한 자갈 및 마사토가 어리연꽃의 뿌리 번식에 적합하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 자갈, 마사토(대), 마사토(소)를 혼합한 조건(1 : 1 : 0, 1 : 0 : 1, 0 : 1 : 1 mixing)에서도 물의 순환과 산소의 유입이 부족하여 부영양화 및 식물성 플랑크톤의 과생장에 의한 녹조가 발생하였으며, 재배 환경 조성에 부적합함을 확인할 수 있었다(Figure 2A). 이에 물의 순환이 원활한 황토볼을 이용하여 토양 조성 시험을 진행하였다. 한 포트당 약 630 g의 황토

볼을 채우고 어리연꽃을 재배한 결과, 양액의 순환이 원활함과 동시에 관리가 용이하였으며, 30일간의 생장 기간 동안 식물체의 생육이 매우 양호하고, 번식 및 개화가 지속적으로 진행됨을 확인할 수 있었다(Figure 2B). 나아가, 인공배양액에서 어리연꽃의 번식 방법을 관찰한 결과, 어리연꽃은 잎에 뿌리가 생긴 뒤 떨어져 나가는 근경번식을 하는 모습이 관찰되었다(Figure 3). 본 연구에서는 어리연꽃의 근연속종인 노랑어리연꽃의 번식법 또한 동시에 확인한 결과, 어리연꽃과 달리 노랑어리연꽃은 기는줄기번식을 하는 것으로 나타났다. 따라서 유사종이라 하더라도 종별 번식법이 다른점을 감안하여 자생식물의 성공적인 재배화를 위해 정확한 번식법 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.



**Figure 2.** (A) Soil composition using peat moss, masato, and gravel, and (B) the soil environment using lightweight expanded clay aggregate (LECA).



**Figure 3.** Cutting position for breeding (A) *N. indica* (B) *N. peltata* in artificial culture.

### 3.1.3. 환경조건별 성분 변화 분석

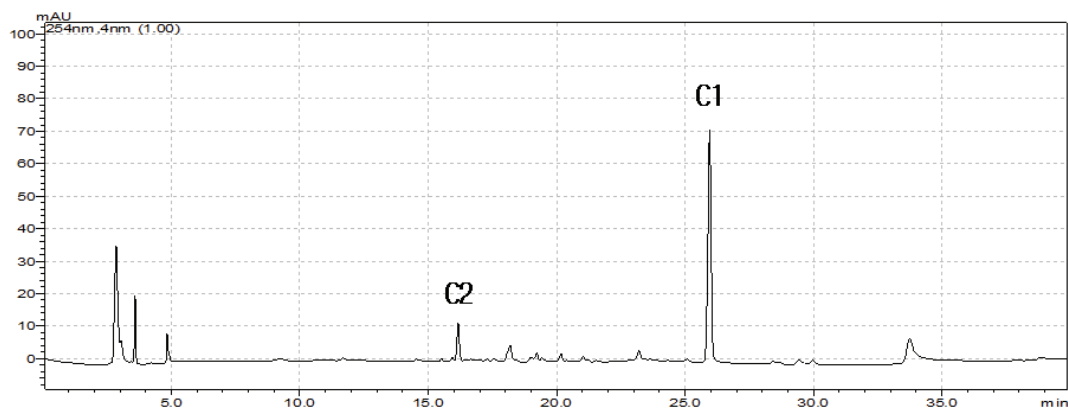
환경조건에 따른 유효/지표성분 변화를 관찰하기 위해 월별 어리연꽃 추출물 내 성분 함량을 분석하였다(Figure 4). 자생지에서 실내로 도입한 직후 시료인 16년 12월은 재배 적응 전 시료 결과로 함량 계산에서 제외하고 데이터를 해석하였다. 그 결과, C1 (3,7-di-O-methylquercetin-4'-O-β-glucoside)은 평균 7 μg/mL의 함량을 보였으며, 최고치는 18년 6월에 12.9 μg/mL, 최저치는 17년 3월에 3.7 μg/mL로 기록되었다. C2 (sweroside)는 평균 4 μg/mL의 함량을 보였으며, 최고치는 17년 11월에 6.4 μg/mL, 최저치는 18년 7월에 1.5 μg/mL로 기록되었다. 두 성분이 각각 최고치로 기록되는 시기에 나머지 성분의 함량은 미미한 수준으로 확인되었으며, 이는 두 성분이 환경에 따라 서로 상호 보완적으로 성분 함량이 조절되는 것으로 판단된다. 특히, 두 성분이 동시에 평균치 이상으로 유지되는 시점은 2년 연속 3, 4월로 각각 약 7 μg/mL (C1) 및 5 μg/mL (C2)를 유지하는 것으로 확인되었다.

17년 3월 시료의 경우, 추출물의 유효성이 가장 뛰어난 시기로 주성분의 함량 변화가 효능에 영향을 미치는 것으로 보이지만, C1의 함량이 가장 높은 16년 12월(15 μg/mL)의 효능이 최고치가 아닌 점을 감안하면 C1과 C2가 평균치 이상 혼합되어 함량이 유지될 때 그 효능이 증가할 것으로 추측된다. 따라서 추출물 내 C1의 함량을 5 ~ 10 μg/mL로 유지하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 이를 바탕으로 재배 환경을 검토해본 결과, 2, 3 및 7 ~ 9월경 수온의 변화가 크게 있었음을 확인할 수 있었으며, 유사 환경 조성을 통한 재현성 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 3.2. 어리연꽃 추출물의 항노화 효과

### 3.2.1. CCD-986sk 및 HaCaT 세포 내에서의 세포 생존율

어리연꽃 추출물의 CCD-986sk 및 HaCaT 세포에 대한 세포 생존율과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MMT assay를 수행하였다. 어리연꽃 추출물은 CCD-986sk



**Figure 4.** HPLC chromatogram of extracts of *N. indica*. C1 :3,7-di-O-methylquercetin-4'-O-β-glucoside, C2 : sweroside.

및 HaCaT 두 세포에 대하여 모두 최대 100 µg/mL 농도까지 세포독성을 나타내지 않았으며 이 결과를 바탕으로 효능시험 농도를 설정하였다.

3.2.2. 환경 유해물질에 의한 세포 손상 회복 효과

최근 이슈화되고 있는 환경 유해물질에 대하여 어리연꽃 추출물의 세포 손상 방어 효과를 측정하였다. 이를 위해 benzo[α]pyrene, ammonium nitrate, formaldehyde 3종을 환경 유해물질 대체물질로 선정하여 이로 인한 손상된 세포의 회복 효과를 확인하였다. Benzo[α]pyrene의 경우, 담배연기의 주요 성분이기도 하며 동물의 피부세포 적용 시, 암세포 유도를 일으킬 수 있을 정도의 강한 유해물질로 알려져 있다[26]. Ammoniumnitrate 시 미세먼지 내 함유되어 있는 질산염의 물질로 질소계 비료에 주로 사용되는데, 이러한 ammonium nitrate는 반복해서 섭취할 경우, 체내 축적되어 고정색소성 홍반(erythema dyschroicum perstans)과 같은 피부질환을 일으킨다는 연구결과가 있다[27]. Formaldehyde는 강한 접착 성질을 갖고 있기 때문에 빌딩건축자재물에 사용되는 베니어판, 다양한 보드, 바닥재 및 실내인테리어 접착제 등에 폭넓게 이용되며, 새 가구 등은 실내공기의 주된 오염원이 된다[28]. 또한 피부 세포에 대하여는 keratinocyte와 fibroblast에서 100 µM

이하의 농도에서 DNA 손상을 일으키며 UVA에 의한 손상된 DNA의 회복을 지연시킨다는 연구결과가 보고된 바 있다 [29]. 시험 결과, benzo[α]pyrene 및 ammonium nitrate로 세포 손상을 유도한 그룹에서 어리연꽃 추출물 75 µg/mL의 농도에서 각각 14% 및 22%의 세포 활성이 개선되었으며, formaldehyde로 세포 손상을 유도한 그룹에서는 어리연꽃 50 µg/mL 농도에서 12%의 세포 활성이 개선되었음을 확인할 수 있었다(Figure 5). 따라서 어리연꽃 추출물의 경우, 최근 대두되는 환경 오염물질로 인한 피부 세포를 포함한 다양한 세포들과 이들의 DNA 손상을 억제할 수 있는 잠재적 가능성을 가지고 있다고 판단된다.

3.2.3. 항염증 효과

HaCaT 세포 내에서의 PGE<sub>2</sub> 및 TNF-α 저해 활성을 측정 한 결과, 어리연꽃 추출물 25 µg/mL의 농도에서 각각 55% 및 30%의 효과를 보이며 모두 농도의존적으로 우수한 저해 활성능을 나타내었다(Figure 6). 또한, 동일한 농도에서 COX-2 protein의 발현 억제 측정 결과에서도 61%의 우수한 효과를 확인하였다(Figure 7). 피부 투과 장벽이 손상되면, 표피 내에서 TNF-α 등과 같은 사이토카인의 발현이 증가된다고 알려져 있으며[30], PGE<sub>2</sub>는 가장 잘 알려

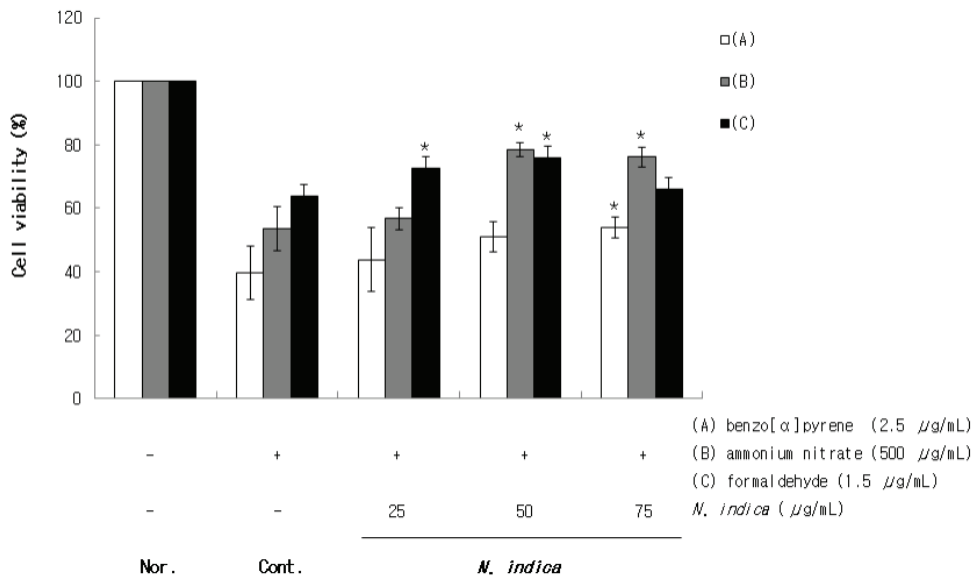
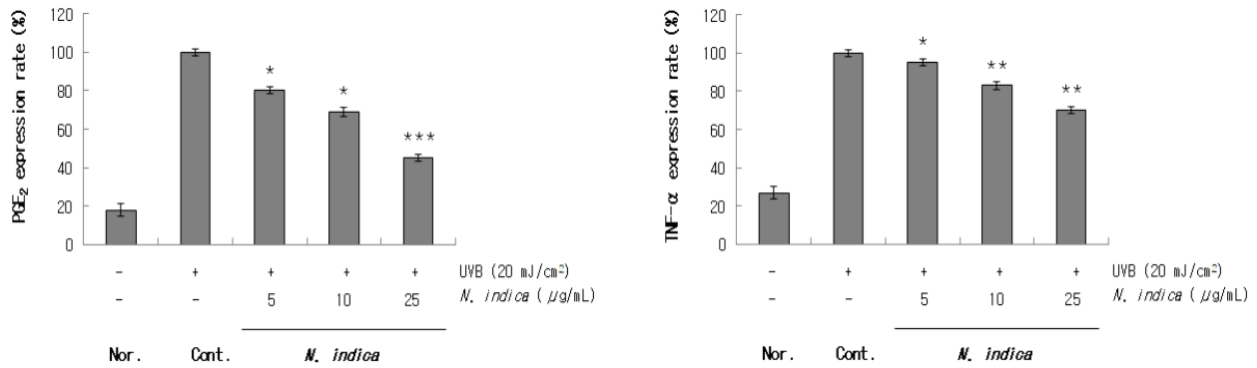
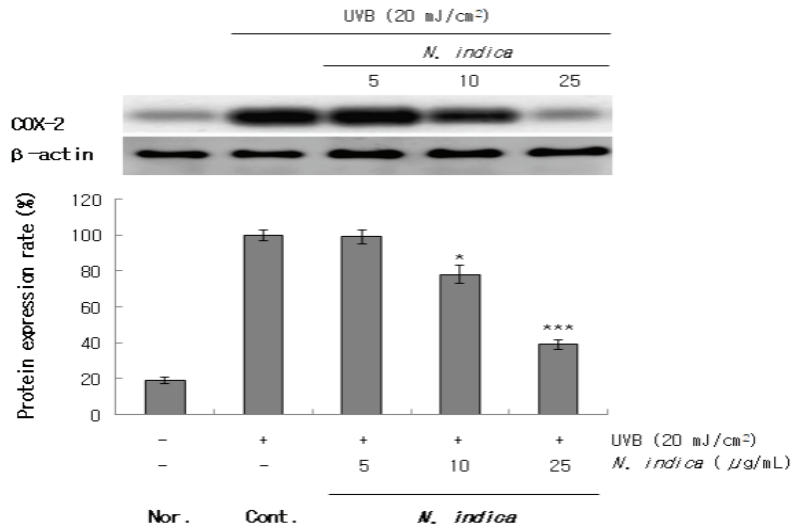


Figure 5. Recovery effect of *N. indica* extract when inducing HaCaT cells damage by (A) benzo[α]pyrene (B) ammonium nitrate (C) formaldehyde. Nor : normal control group, Cont. : pollutant stimulated group with benzo[α]pyrene 2.5 µg/mL, nitrate 500 µg/mL, formaldehyde 1.5 µg/mL, *N. indica* : pollutant stimulated and *N. indica* extract treated group. Data are means ± SD, N = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 compared with the control group.



**Figure 6.** Inhibition of PGE<sub>2</sub> and TNF-α production in HaCaT cells of *N. indica* extract. Nor : normal control group, Cont. : UVB-irradiated group, *N. indica* : UVB-irradiated and *N. indica* extract treated group. Data are means ± SD, N = 3, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 compared with the control group.



**Figure 7.** Inhibitory effect of *N. indica* extract on COX-2 protein expression in HaCaT cells. Nor : normal control group, Cont. : UVB-irradiated group, *N. indica* : UVB-irradiated and *N. indica* extract treated group. Data are means ± SD, N = 3, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 compared with the control group.

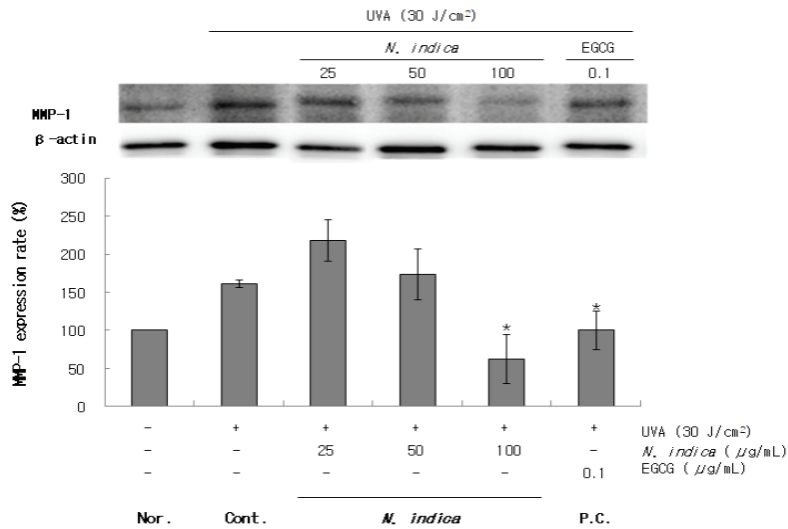
진 염증 반응의 매개체로서의 역할뿐만 아니라, Th2 type 면역반응을 촉진하고 Th1 type의 면역반응은 억제하며, 대식세포에서 TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-12 등의 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 생성을 촉진하는 면역반응의 조절자로서의 역할이 많은 연구에서 밝혀졌다[31]. PGE<sub>2</sub>의 합성은 COX에 의해 촉진되는데, 이 중 염증 자극에 의해 발현되는 COX-2에 의해 생성되며 이를 통해 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다[32]. 또한, Blotman 등(1982)의 연구에 따르면 PGE<sub>2</sub>는 치주염(periodontitis)과 같은 염증질환에서 MMPs의 생성을

유도하여 조직 손상에 관여하는 것으로 알려졌다[33]. 따라서 어리연꽃 추출물의 경우, 세포 내 염증 매체 신호전달물질의 생성을 억제하여 세포를 보호하는 염증 예방 및 노화 억제 효과를 갖는 것으로 판단된다.

### 3.2.4. 콜라겐 분해 효소(MMP-1) 억제 효능

어리연꽃 추출물의 피부세포 내 MMP-1 생성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 100 μg/mL의 어리연꽃 추출물의 처리군에서 UVA를 처리한 대조군 대비 99%의 MMP-1 발현을 감소를 보이며, UVA에 의한 MMP-1 발현을 충분히





**Figure 8.** MMP-1 inhibitory activity of *N. indica* extract in CCD-986sk cells. Nor : normal control group, Cont. : UVA-irradiated group, *N. indica* : UVA-irradiated and *N. indica* extract treated group, P.C. : positive control group. Data are means  $\pm$  SD, N = 3, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 compared with the control group.

억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 8). MMP-1은 matrix metalloproteinases의 한 종으로 extracellular matrix (ECM)의 피부 상처 치유에 있어 repair 및 remodeling의 과정에 대하여 비활성화된 조직의 제거, 각화 세포 이동 중 표피-중간 체세포간 상호 작용, 혈관 형성, 성숙 과정에서의 새로 합성된 결합 조직의 remodeling 관여, 성장인자의 발현 조절 등 다양한 분야에 관여하는 것으로 알려져 있다[34]. 또한, MMP-1은 각기 다른 유형의 상처에서 각화 세포를 이동시킴으로써 특이적으로 발현되며 이들은 일반적인 외상 상처나 화상으로 인한 상처에도 관여하는 것으로 알려져 있다[35,36]. 하지만, 자외선 등에 의해 피부 노화가 진행됨에 따라 이들 발현은 비정상적으로 이루어지며 피부 내 matrix를 구성하는 collagen을 분해하여 주름과 처짐을 발생한다는 것이 잘 알려져 있다. 따라서 어리연꽃 추출물은 자외선에 의하여 피부 세포 내 주름 형성에 영향을 주는 MMP-1 단백질의 과발현을 억제하여 피부 노화를 예방하는 효과를 갖는다고 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 최근 각광을 받고 있는 친환경 아쿠아포닉스 기술을 이용하여 지속가능한 신규 항노화 화장품 소재의 발굴을 위해 국내에 자생하는 수생식물인 어리연꽃의 표준화 연구 및 효능 연구를 수행하였다. 그 결과, 어리

연꽃은 근경번식을 하며 부엽형태의 담액식 재배가 적합하였다. 재배에 영향을 미치는 영양 성분은 질산염과 칼륨으로 각각 80 μg/mL과 63.5 μg/mL의 농도가 적절하며, 환경적 주요 요인으로 수온은 25 °C가 최적 조건으로 확인되었다. 아쿠아포닉스에서 시기별로 재배한 어리연꽃의 유효/지표성분에 대한 정량 분석을 실시한 결과, 3, 4월의 자연광 상태에서 주성분 2종(3,7-di-O-methylquercetin-4'-O-β-glucoside (C1) 및 sweroside (C2))의 함량이 약 5 μg/mL 이상 일정하게 유지되었으며, 이를 최적의 원료 재배 조건으로 설정하고 동일 환경에서 지속가능한 원료 확보가 가능하도록 표준화 조건을 설정하였다.

뿐만 아니라 *in vitro* 세포 실험에서 50 ~ 75 μg/mL 농도의 어리연꽃 추출물이 피부 세포 손상을 유발시키는 외부 인자인 benzo[a]pyrene, ammonium nitrate, formaldehyde로부터 피부 손상을 12 ~ 22%의 개선하였다. 또한, 25 μg/mL의 농도에서 염증 발현에 관여하는 PGE<sub>2</sub>, TNF-α, 그리고 COX-2의 신호전달 물질을 각각 55%, 30%, 61% 억제함으로써 결과적으로 피부 노화 및 손상 억제에 효과적인 것을 확인할 수 있었다. 이는 염증 매개의 다양한 질환에도 효과적일 것으로 판단되어 향후 다양한 질병 치료 및 예방에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

종합적으로 국내 최초로 자연의 훼손을 극소화하는 아쿠아포닉스 기술로 연중 표준화된 화장품 원재료의 수급이 가능하게 되었으며, 어리연꽃은 국내 대표 친환경 항노

화 화장품 신소재로의 활용가치가 있는 것으로 판단된다. 또한, 향후 본 연구를 기초로 아쿠아포닉스 기술에 다양한 천연 소재를 적용하여 지속가능한 화장품 신소재 개발 및 제품화 연구에 기여 하고자 한다.

### Acknowledgement

연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호HN15C0103).

### Reference

1. M. McCrink, Pollution: A global threat, *Environ Int*, **68**, 162 (2014).
2. C. Wilcox, E. V. Seville, and B. D. Hardesty, Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**(38), 11899 (2015).
3. F. Perera, Pollution from Fossil-fuel combustion is the leading environmental threat to global pediatric health and equity: solutions exist, *Int J Environ Res Public Health*, **15**(1), 16 (2018).
4. A. P. K. Tai, M. V. Martin, and C. L. Heald, Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution, *Nat. Clim. Change*, **4**, 817 (2014).
5. R. Stegmann, Global pollution....Time to act, *Waste Manag.*, **66**, 1 (2017).
6. M. Petraru and M. Gavrilescu, Pollution prevention, a key to economic and environmental sustainability, *Environ. Eng. Manage. J.* **9**(4), 597 (2010).
7. J. Lee, Study of the strategies for sustainable urban community, *The Geographical Journal of Korea*, **49**(2), 187 (2015).
8. S. W. Yoon and D. K. Lee, The development of the evaluation model of climate changes and air pollution for sustainability of cities in Korea, *Landsc. Urban Plan.* **63**(3), 145 (2003).
9. I. Tanabe, Double-ECO model technologies for an environmentally-friendly manufacturing, *Procedia CIRP*, **48**, 495, (2016).
10. J. Cherniwchan, Economic growth, industrialization and the environment, *Resour. Energy Econ.*, **34**(4), 442 (2012).
11. S. Félix, J. Araújo, A. M. Pires, and A. C. Sousa, Soap production: A green prospective, *Waste Manag.*, **66**, 190 (2017).
12. S. Bom, J. Jorge, H. M. Ribeiro, and J. Marto, A step forward on sustainability in the cosmetics industry: a review, *J. Clean. Prod.* **225**, 270 (2019).
13. B. Yep and Y. zheng, Aquaponic trends and challenges - a review, *J. Clean. Prod.*, **228**, 1586 (2019).
14. B. König, R. Junge, A. Bittsanszky, M. Villarroel, and T. Komives, On the sustainability of aquaponics, *Ecocycles*, **2**(1), 26 (2016).
15. Z. Hu, J. W. Lee, K. Chandran, S. Kim, A. C. Brotto, and S. K. Khanal, Effect of plant species on nitrogen recovery in aquaponics, *Bioresour. Technol.* **188**, 92 (2015).
16. H. J. Ha and G. S. Jeong, A Study on the application of aquaponics in Korea, *JFMSE*, **29**(4), 1225 (2017).
17. S. J. Choo, Y. H. Kim, I. J. Ryoo, G. H. Xu, and I. D. Yoo, Application as a cosmeceutical ingredient of *Euryale ferox* seed extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(4), 309 (2009).
18. M. Song, J. T. Bae, G. S. Lee, Y. H. Zhang, and H. B. Pyo, A study on the *Azolla imbricata* using as a cosmetic active ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **36**(1), 71 (2010).
19. Y. A. Kim, D. H. Kim, J. M. Yu, C. B. Park, T. S. Park, and B. J. Park, Anti-wrinkle effects of extracts and solvent fractions from *Nymphoides peltata* on CCD-986sk, *J. Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), 357 (2017).
20. D. H. Kim, Y. A. Kim, J. M. Yu, C. B. Park, B. J. Park, and T. S. Park, Inhibitory effect of *Nymphoides indica* extract on  $\alpha$ -MSH induced melanin synthesis, *J. Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), 327 (2017).
21. Y. A. Kim, D. H. Kim, C. B. Park, T. S. Park, and B. J. Park, Anti-aging effects of sweroside isolated from *Nymphoides indica*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(2), 103 (2018).

22. Y. A. Kim, D. H. Kim, C. B. Park, T. S. Park, and B. J. Park, Anti-inflammatory and skin-moisturizing effects of a flavonoid glycoside extracted from the aquatic plant *Nymphoides indica* in human keratinocytes, *Molecules*, **23**(9), 2342 (2018).
23. A. Amin, A. Upadhyay, M. Zafar, P. Cos, L. Maes, S. Apers, V. Exarchou, and L. Pieters, Antibacterial, antifungal, cytotoxic, antioxidant and antidiabetic compounds from *Nymphoides indica* the first comprehensive phytochemical and pharmacological study, *Planta Med.* **80**, P1L115 (2016).
24. P. K. Agarwal, NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry* **31**(10), 3307 (1992).
25. D. Prasad, V. Juyal, R. Singh, V. Singh, G. Pant, and M. S. Rawat, A new secoiridoid glycoside from *Lonicera angustifoli*, *Fitoterapia*, **71**(4), 420 (2000).
26. B. Ruggeri, M. Dirado, S. Y. Zhang, B. Bauer, T. Goodrow, and A. J. P. Kleinszanto, Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**(3), 1013 (1993).
27. S. Jablonska, Ingestion of ammonium nitrate as a possible cause of erythema dyschromicum perstans (ashy dermatosis), *Dermatologica.*, **150**(5), 287 (1975).
28. H. S. Thomas and R. M. Sixto, A survey of typical exposures to formaldehyde in houses area residences, *Am Ind Hyg Assoc J*, **46**(6), 313 (1985).
29. G. Emri, D. Schaefer, B. Held, C. Herbst, W. Zieger, I. Horkay, and C. Bayerl, Low concentrations of formaldehyde induce DNA damage and delay DNA repair after UV irradiation in human skin cells, *Exp. Dermatol.*, **13**(5), 305 (2004).
30. T. Biedermann, M. Rocken, and J. M. Carballido, TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **9**(1), 5 (2004).
31. S. G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps, Prostaglandins as modulators of immunity, *Trends Immunol.*, **23**(3), 144 (2002).
32. M. E. Turini and R. N. DuBois, Cyclooxygenase-2: a therapeutic target, *Annu. Rev. Med.*, **53**, 35 (2002).
33. F. Blotman, P. Poubelle, J. Chaintreuil, M. Damon, O. Flandre, A. Crastes de Paulet, L. Simon, Mononuclear phagocytes, prostanoids and rheumatoid arthritis, *Int. J. Immunopharmacol.*, **4**(2), 119 (1982).
34. A. J. Gearing, P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, T. M. Leber, M. Mangan, K. Miller, P. Nayee, K. Owen, S. Patel, W. Thomas, G. Wells, L. M. Wood, and K. Woolley, Processing of tumour necrosis factor- $\alpha$  by metalloproteinases, *Nature*, **370**(6490), 555 (1994).
35. M. Inoue, G. Kratz, A. Haegerstrand, and M. Stahle-Backdahl, Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization, *J. Invest. Dermatol.*, **104**(4), 479 (1995).
36. G. P. Stricklin, L. Liying, V. Jancic, B. A. Wenczak, and L. B. Nanney, Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds, *Am. J. Pathol.*, **143**(6), 1657 (1993).