



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

콤부차 대표 균주 3종을 이용한
감귤 발효액의 기능성 연구

濟州大學校 大學院

食 品 營 養 學 科

高 慧 明

2017 年 2 月



콤부차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액의 기능성 연구

指導教授 朴 晟 秀

高 慧 明

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016 年 12 月

高慧明의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

신 동 범



委 員

김 현 정



委 員

박 성 우



濟州大學校 大學院

2016 年 12 月



Anti-oxidative, anti-inflammatory, and
anti-cancer effects of Citrus Kombucha
fermented with 3 bacteria strains isolated
from traditional Kombucha

Hye-Myoung Ko

(Supervised by professor Sung-Soo Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2016. 12.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & NUTRITION
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	v
List of Abbreviations	vii
List of Tables	viii
List of Figures	ix
I. 서론	1
II. 이론적 배경	3
1. 감귤 콤부차 (Citrus Kombucha)	3
1) 콤부차	3
2) 녹차	4
3) 감귤	5
2. 산화와 염증	6
1) 염증	6
2) LPS 유도 염증경로(LPS inflammation pathway)	6
3. 방광암	9
1) 방광암	9

2) MAP kinase pathway	9
III. 재료 및 방법	12
1. 감귤콤부차 발효	12
2. 시료의 이화학적 특성	15
1) pH 및 산도	15
2) 총 당 및 환원당 정량	15
3. 시료의 기능적 특성	16
1) 항산화 측정	16
(1) DPPH 라디칼 소거능	16
(2) ABTS 라디칼 소거능	16
(3) 총 폴리페놀 함량	17
(4) ORAC assay	17
2) 항염 측정	18
(1) 세포 배양	18
(2) 세포 생존율(Cell counting)	18
(3) Nitric oxide (NO) 생성량	19
(4) 염증관련 사이토카인 생성량(Real-time PCR)	19
3) 항암 측정	22

(1) 세포 배양	22
(2) 세포 생존율(MTT assay)	22
(3) 세포 이동성 관찰(Scratch-wound healing assay)	23
(4) Annexin V 측정(FACS analysis)	23
(5) 단백질 발현 측정(Western immunoblot assay)	23
4. 통계분석	24
IV. 연구결과	25
1. 발효에 따른 시료의 이화학적 특성 변화	25
1) pH 및 산도의 변화	25
2) 총 당 및 환원당의 변화	27
2. 시료의 기능적 특성	29
1) 항산화 측정	29
(1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과	29
(2) ABTS 라디칼 소거능 측정 결과	30
(3) Total polyphenol 함량 측정 결과	31
(4) ORAC assay 측정 결과	32
2) 항염 측정	34
(1) 세포 생존율 측정(Cell counting)	34

(2) Nitric oxide (NO) 생성량 측정	36
(3) 염증관련 사이토카인 생성량 측정(Real-time PCR)	38
3) 항암성 측정	40
(1) RAW264.7 대식세포에 대한 CK-MOX의 세포 독성	40
(2) 방광암 세포(EJ, T24, 5637 cell)의 CK-MOX (Day 15) 농도별 처리에 따른 성장 억제율	42
(3) 방광암 세포(EJ, T24, 5637 cell)의 발효 기간별 CK-MOX 처리에 따른 성장 억제율	44
(4) 세포 이동성 관찰 결과	46
(5) Annexin V 측정 결과	50
(6) CK-MOX 처리에 따른 방광암 세포의 phospho-ERK 측정 결과	52
(7) U0126 처리와 세포 생존율의 변화	54
(8) U0126 처리와 p-ERK level의 변화	56
V. 고찰	58
VI. 요약 및 결론	62
VII. 참고문헌	64
<국문초록>	75

<Abstract>

Anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer effects of Citrus Kombucha fermented with 3 bacteria strains isolated from traditional Kombucha

Hye-Myoung Ko

Department of Food Science and Nutrition

Graduate School

Jeju National University

Supervised by Professor Sung-Soo Park

Dysregulation of the body's antioxidant defense system causes oxidative stress, chronic inflammation, and various diseases such as diabetes and cancer. Kombucha is slightly sweet and sour beverage that has strong antioxidant capacity. It has been shown that Kombucha protects the liver against oxidative stress and possesses anti-diabetic and anti-cancer effects. Despite its benefits to public health, commercialization of kombucha has been limited mainly due to non-defined nature of microbes used for fermentation. In this study, we investigated Citrus Kombucha (CK) produced by inoculating three different bacteria strains (*Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*; named as CK-MOX) isolated from traditional Kombucha. Fermentation was performed for 15 days with monitoring changes of physicochemical properties including pH, acidity, and total and reducing sugar contents. During fermentation, pH and total sugar content were gradually decreased while acidity was slightly increased. Antioxidant capacity, measured by DPPH, ABTS, Folin-Denis, and ORAC assays, markedly increased in post-fermented CK-MOX (Day 15) compared to the pre-fermented CK-MOX (Day 0). However, the total

polyphenol content was slightly decreased after fermentation. Biological properties including antioxidant and anti-cancer activities of CK-MOX were also investigated for three different bladder cancer cell lines (EJ, T24, and 5637 cells). To investigate the anti-inflammatory effect of CK-MOX on LPS-induced inflammatory RAW264.7 cells, nitric oxide (NO) production and inflammatory cytokine (TNF- α and IL-1 β) levels were measured. Treatment of post-fermented CK-MOX (Day15) inhibited NO production and reduced TNF- α and IL-1 β mRNA expression in LPS-induced RAW264.7 cells as compared with pre-fermented CK-MOX (Day 0). In addition, post-fermented CK-MOX (Day 15) markedly inhibited proliferation and migration of EJ, T24, and 5637 cells (human bladder carcinoma). Interestingly, treatment of post-fermented CK-MOX (Day 15) resulted in up-regulation of ERK. To distinguish whether up-regulation of ERK is the cause or the effect, we investigated the viability of cells in the presence of U0126, a MEK1/2 inhibitor. Pre-treatment of U0126 significantly restored cell viability against CK-MOX-induced cell death, which demonstrated that p-ERK may be a key regulator in the mechanism of CK-MOX-induced apoptosis of bladder cancer cells (EJ, T24, and 5637 cells). In conclusion, CK-MOX, fermented with defined composition of bacterial starters, showed antioxidant capacity, anti-inflammatory effects, and anti-cancer activity on EJ, T24, and 5637 bladder cancer cells.

List of Abbreviations

Abbreviation	Full name
ABTS	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
CK	Citrus Kombucha
CK-MOX	Citrus Kombucha fermented with 3 bacteria strains
CK-Ori	Citrus Kombucha fermented traditional way
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECL	Enhanced Chemiluminescent
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
IL-1 β	Interleukin 1 beta
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide
NO	Nitric oxide
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PCR	Polymerase chain reaction
p-ERK, phospho-ERK	Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase
RPMI-1640	Roswell park memorial institute medium-1640
SD	Standard deviation
TBS-T	Tris buffered saline - tween 20
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

List of Tables

Table 1. Sequences of primers for real-time PCR	21
Table 2. Changes in pH and total acidity of Citrus Kombucha during fermentation.	26
Table 3. Changes in total sugar and reducing sugar of Citrus Kombucha during fermentation.	28
Table 4. Antioxidant capacity of CK-Ori.	33
Table 5. Antioxidant capacity of CK-MOX.	33

List of Figures

Figure 1. Schematic diagram of the TLR4 signaling pathway.	8
Figure 2. Schematic diagram of the ERK signaling pathway.	11
Figure 3. A flow diagram for Citrus Kombucha preparation.	14
Figure 4. Effect of CK-MOX on cell viability in LPS-induced RAW264.7 macrophages.	35
Figure 5. Effect of CK-MOX on NO production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.	37
Figure 6 .Effect of CK-MOX on TNF- α mRNA production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.	39
Figure 7. Effect of CK-MOX on IL-1 β mRNA production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.	39
Figure 8. Effect of CK-MOX (Day 15) on viability of RAW264.7 cells.	41
Figure 9. Effect of CK-MOX (Day 15) on viability of bladder cancer cell (EJ, T24, 5637 cell).	43
Figure 10. Effect of CK-MOX on viability of bladder cancer cell (EJ, T24, and 5637 cells).	45
Figure 11. Effects of CK-MOX treatment on the migration of EJ cells.	47
Figure 12. Effects of CK-MOX treatment on the migration of T24 cells.	48
Figure 13. Effects of CK-MOX treatment on the migration of 5637 cells.	49
Figure 14. CK-MOX-induced apoptosis of bladder cancer cells as annexin V staining assay using flow cytometry.	51

Figure 15. Effect of CK-MOX on phospholylation of ERK protein expression i
n EJ, T24, and 5637 cells. 53

Figure 16. Effect of CK-MOX and U0126 on viabilty of EJ cells. 55

Figure 17. Effect of CK-MOX and U0126 on phospholylation of ERK protein
expression in EJ cells. 57

I. 서 론

콤부차는 약간 달고, 신맛이 나는 발효 음료로 당이 첨가 된 홍차 추출액에 acetic acid bacteria와 yeasts의 공생균체를 접종하여 약 14 일 간 발효하면 얻을 수 있다[1]. 기원전 220 년경 중국 진나라 때 해독과 활력을 북돋기 위해 사용 된 것이 기원으로 알려져 있으며, 제2차 세계대전 당시 독일, 프랑스, 남아프리카 등 세계 전역에 전해졌다[2]. 발효 된 콤부차에는 유기산, 당류, 비타민과 차의 폴리페놀이 함유 되어있다고 보고되었다[3]. 현재까지 연구를 통해 분리 된 콤부차의 균주는 대부분이 Acetic acid bacteria 이며[4], 그 중 *Acetobacter xylinum* 은 콤부차 상층부에 “Tea fungus”라 불리는 cellulose막을 형성하는 역할을 한다고 알려져 있다[5, 6]. 콤부차는 *E. coli*, *Sh. sonnei*, *Sal. typhimurium*, *Sal. enteritidis*, *Cm. jejuni*등 병원성 균에 대한 항균성, 산화적 스트레스로부터의 간 세포 보호작용, 위 궤양 치료 효과 및 항암능력을 갖는 것으로 나타났다[7-20].

감귤류는 hesperitin, naringenin, tangeretin, nobiletin 등의 플라보노이드류(flavonoids)와 β -carotein, β -cryptoxanthin, auraptene, 쿠마린, 리모넨 등 기능성 성분이 다량 함유 되어있으며[21], 종양유전자의 활성 저해, 콜레스테롤 저하, 혈당강하 작용, 항산화 작용, 노화억제작용, 지방간 억제작용 등 다양한 생리 기능적 효과를 갖고 있다[22-31].

ROS (reactive oxygen species) 즉, 활성산소종은 하나 또는 그 이상의 짝지어지지 않은 전자를 갖고 있는 자유 라디칼을 칭한다[32]. 체내에서 활성산소는 superoxide anion의 형태로 주로 존재하며, 미토콘드리아 전자전달 체계, 조면소포체에서 이루어지는 단백질 접힘 과정 세포 내 대사에 의해서 생성 된다[33]. 체내 항산화 방어 시스템에 의해 활성산소종은 효소적 또는 비효소적으로 환원되지만, 항산화 방어 시스템의 불균형 또는 파괴로 인한 산화적 스트레스는 protein kinases, ion channels의 활성화와 lipid peroxidation, DNA oxidation을 일으켜 체내 균형을 무너뜨리며, 만성염증을 유발하여 암, 당뇨, 심혈관계 질환 등 만성 질환을 야기 시킨다[34].

방광암은 다른 암과 비교하여 완치율이 높은 편이나 비교적 악성도가 낮은 표재성 방광암의 경우 70%에 달할 정도로 재발률이 높으며, 이 중 10~15%는 근침윤성 방광암으로 진행되기 때문에 재발 방지를 위한 철저한 예방과 관리가 필요하다[35]. 현재까지 알려진 방광암의 위험인자로는 담배, 흡연, 방향족 아민, 석탄, 비소 등[36]이 있으며, 차(다류)의 섭취 연관성에서 녹차의 섭취는 방광암에 대한 보호효과를 갖는 것으로 나타났다[37].

이에 본 연구에서는 전통적인 방식으로 배양된 콤부차에서 분리한 3가지 균주 *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*를 이용하여 발효시킨 감귤 발효액의 항산화 능력평가 및 방광암 세포주(EJ, T24, 5637 세포)에 대한 항암성 확인과 LPS를 처리한 RAW264.7대식세포에 대한 항염 효과 관찰 및 기전에 대한 연구를 통하여 감귤 발효액의 기능성 음료로서의 개발 가능성을 살펴보고자 하였다.

II. 이론적 배경

1. 감귤 콤부차 (Citrus Kombucha)

1) 콤부차

발효는 미생물이 효소를 이용해 유기물을 분해시키는 과정이다[38]. 일반적인 발효음료의 제조는 혐기 상태에서 시작되며, 우유에 유산균을 접종하여 배양하는 요구르트 등의 유산균 음료와 식물성 원료를 효모를 이용해 발효시킨 맥주, 와인 등의 효모음료가 있다[39, 40]. 이와 달리 콤부차는 호기적 상태에서 발효가 시작되며, 약 3일간 배양하게 되면 배양액 표면에 새로운 막이 형성된다. 이후 발효조 내부는 반 혐기 조건으로 바뀌고 배양액 상층부에는 ‘tea fungus’라 불리는 하얀 막이 생긴다[41].

콤부차는 주로 중국, 러시아, 독일 등에서 건강을 위해 음용 되는 발효차로 홍차 또는 녹차에 설탕을 첨가 한 뒤 acetic acid bacteria와 yeasts에 의해 형성된 공생 균체를 접종하여 약 14 일 간 발효하면 얻을 수 있다[1]. 콤부차는 시고 단맛이 나는 배양액과 윗부분에 떠오르는 하얀 막의 두 부분으로 나뉘며, 발효 결과 acetic, gluconic, glucuronic, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic, usnic 등의 유기산과 sucrose, glucose, fructose의 당류, vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂, C 뿐 아니라 미량의 아미노산, 에탄올과 같은 기타 물질이 형성된다고 밝혀져 있다[3,42].

콤부차는 항균성, 항산화, 항염성, 항암성 등 다양한 기능적 특성을 갖는 것으로 보고되었다[7-20]. Sreeramulu 등[17]은 중성의 pH조건에서 thermal denaturation 과정을 거친 콤부차가 *E. coli*, *Sh. sonnei*, *Sal. typhimurium*, *Sal. enteritidis*, *Cm. jejuni* 등 병원성 균에 대해 항균성을 나타낸다고 보고 하였으며, 또 다른 연구에서는 콤부차가 병원성 세균뿐 아니라 antifungal의 효과도 있음을 보고하였다.

Jayabalan 등[43]은 녹차, 홍차, 차폐기물을 이용해 만든 콤부차의 발효과정에 phenolic compounds와 reducing power의 증가를 통해 kombucha 발효에 따라 free radical scavenging 능력이 향상됨을 보고하였으며, Bhattacharya 등[10]의 연구에서 콤부차와 TBHP를 동시 처리한 세포에서 mitochondria dependent apoptotic signaling pathways를 막아 산화적 스트레스로부터 간세포 보호작용을 갖는 것으로 나타났다.

Indomethacin으로 유도한 gastric ulceration mouse model에서 4 일 간 발효한 Kombucha는 위궤양 또는 십이지장 궤양 치료에 사용되는 약물인 omeprazole과 비슷한 수준의 TBARS (Thiobarbituricacid, 산화반응생성물) 형성 감소 뿐 아니라 gastric mucin의 농도를 증가시킴으로서 궤양 치료에 효과적인 것으로 나타났다 [7]. 콤부차의 Ethyl acetate 분획물에서 분리된 dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate와 vetaxin은 hymanosteosarcoma 인 U2OS와 human renal carcinoma인 786-o cell의 mmp-2와 mmp-9의 활성을 저해시킴으로서 항암능력을 갖는 것으로 나타났다[15].

2) 녹차

차(Tea)는 차나무(Camellia sinensis)의 잎을 뜨거운 물에 우려내서 마시는 음료로 가공방법에 따라 녹차, 홍차, 우롱차로 구분된다[44]. 녹차(Green tea)는 수확 직후 덩거나 찌서 찻잎 내 폴리페놀(Polyphenol)의 산화를 저지한 불발효차이다 [45]. 녹차는 다른 기호음료와 비교하여 폴리페놀, 당, 유기산, 비타민, 질소 및 무기질 등을 많이 함유하고 있으며, 특히 홍차, 우롱차와 비교하여 많은 양의 카테킨(Catechin)이 함유되어 있다고 알려져 있다[46]. 카테킨은 플라보노이드 그룹(Flavonoids)에 속하며, 높은 항산화 능력 뿐 아니라 위 궤양억제 및 항암 능력이 뛰어난 것으로 보고되었다[44, 47-51]. 녹차에 함유된 주요 카테킨에는 epigallocatechin-3 gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3 galleate (ECG)등 이 있으며, 이 중 EGCG는 암의 전이에 필수적인 단백질 가수분해효소 중 하나인 UK (urokinase)의 활성을 농도 의존적으로 감소시킨다고 알려져 있다[49]. Rat 모델 실험에서 녹차의 폴리페놀은 암세포의 DNA, RNA, 단백질 합성을 조절함으로써 암 형성에 중요한 역할을 하는 Ornithine decarboxylase (ODC) 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다[51]. ODC는 방광종

양에서 높은 활성을 보이고, Epidermal growth factor 의해 유도된다[52]. 방광암 Chemo-prevention에서 녹차의 역할을 규명하기 위한 녹차 폴리페놀 추출물과 EGFR저해제 관련 연구가 지속되고 있다[53].

3) 감귤

감귤은 운향목 운향과(Rutaceae), 감귤나무아과(Aurantioideae)에 속하며[54], 국내에서 가장 많이 생산되는 감귤 품종은 온주말감(Satsuma mandarin)으로 제주도를 중심으로 이루어지고 있다[55]. 예로부터 감귤은 기침과 위장장애, 식욕부진, 구토 등에 효과가 있다고 알려져 약용으로 사용되기도 하였으며, 최근에는 감염성 질환이나 암 등을 예방한다고 보고되어 기능성 식품으로서 각광 받고 있다[29].

감귤류에는 당류와 vitamin C, Vitamin E, 엽산, 식이섬유소와 같은 영양 성분이 함유 되어 있으며[27], 감귤에 다량 함유된 vitamin C는 항산화 영양소로서 강한 항암물질로 알려져 있다[56]. 감귤류에 함유되어 있는 중요한 기능성 성분으로는 플라보노이드, 카로티노이드, 쿠마린, 테르펜, 리모노이드, 페닐프로파노이드, 아쿠리돈 등이 있으며, 특히 아쿠리돈과 리모노이드는 감귤류가 속하는 밀감과 식물에만 존재하는 특유성분이다[57].

감귤류에서 분리된 플라보노이드류는 약 60여종에 달하며[58] 그 중에서는 hesperetin, naringenin, tangeretin, nobiletin 등의 기능성 성분이 항암에 기여하는 것으로 알려져 있고, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 면역증강 등의 작용 또한 보고 되었다[59]. 감귤 플라바논(flavanone)에는 헤스페리딘(hesperidin), 나린진(naringin), 나리루틴(narifutin) 등이 있다. 헤스페리딘의 경우혈관 보호 작용을 한다는 보고가 있으며 나린진은 제1형 당뇨 마우스 모델에 혈당 개선 효과가 있는 것으로 나타났다. Carotinoid로서 β -carotene, β -cryptoxanthin과 auraptene 성분이 면역기능 향진과 발암 억제에 탁월한 효과가 있는 것으로 발표 되었다[22, 60-62]. 감귤 내 β -cryptoxanthin 은 male ICR mice에 N-butyl-N(4-hydroxybutyl)nitrosamine으로 유도된 urinary bladder carcinogenesis 를 저해 하는 것으로 나타났다. 그 외에 쿠마린, 리모넨 등에도 암유전자를 저해하는 작용이 있다고 밝혀지고 있다[25, 31, 63].

2. 산화와 염증

1) 염증(Inflammation)

염증(Inflammation)은 생체조직의 자극에 대한 반응 중 하나로 염증 반응의 목적은 세포손상의 억제와 조직재생에 있다[64]. 일반적으로 염증은 체내에서 스스로 조절되며, 빠르게 회복되는 것이 특징이나[65] 염증 반응의 불균형 시 체내 조직손상 뿐 아니라 동맥경화(atherosclerosis), 당뇨(diabetes mellitus), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 암(cancer) 등 각종 만성 염증성 질환의 발병을 유도한다[66, 67]. 염증은 크게 두 가지로 구분되는데 염증반응 초기에 일어나는 급성염증(acute inflammation)과 염증성 면역세포에서 분비되는 염증성 사이토카인과 ROS에 의해 유도되는 만성염증(chronic inflammation)으로 나눌 수 있다[67].

ROS(reactive oxygen species) 즉, 활성산소종은 하나 또는 그 이상의 짝지어지지 않은 전자를 갖고 있는 자유 라디칼을 칭한다[32]. 체내에서 활성산소는 superoxide anion의 형태로 주로 존재하며, 미토콘드리아 전자전달 체계, 조면소포체에서 이루어지는 단백질 접힘 과정 세포 내 대사에 의해서 생성 된다[33]. 체내 항산화 방어 시스템에 의해 활성산소종은 효소적 또는 비효소적으로 환원되지만, 항산화 방어 시스템의 불균형 또는 파괴로 인한 산화적 스트레스는 Protein kinases, ion channels의 활성화와 lipid peroxidation, DNA oxidation을 일으켜 체내 균형을 무너뜨리며[34], 염증성 질환에서는 면역 및 염증반응이 감소되지 않고, 면역 세포에서 분비하는 과도한 염증성 사이토카인(Cytokine)과 ROS (Reactive oxygen species)가 지방과 대장을 포함한 여러 조직에 만성적인 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[68].이에 염증으로 인해 분비되는 ROS와 RNS (Reactive nitrogen species)에 의한 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있는 항산화 물질에 대한관심이 증가하고 있다.

2) LPS 유도 염증경로(LPS inflammation pathway)

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 외막을 구성하는 물질로 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 생산하는 주요 염증 유발 물질이다[69].

LPS의 침입은 LPS binding protein과 단핵구(monocyte)나 대식세포(macrophage), 또는 호중구(neutrophil)의 세포 표면의 CD-14 (Cluster of differentiation 14)에 의해 감지되고, Toll like receptor 4 (TLR4)에 LPS가 결합하면 염증 반응을 일으키게 된다[70]. TLR4에 의해, NF- κ B의 활성을 억제하는 I κ B단백질의 인산화가 일어나고, 활성화 된 NF- κ B는 염증성 단백질 iNOS, COX-2와 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 등의 유전자의 발현을 조절하게 된다[71].

염증성 단백질인 iNOS (inducible NOS)와 COX-2 (Cyclooxygenase 2) 등의 발현이 증가되면 각각 NO와 PGE₂의 분비량이 증가되어 염증반응을 가속화 한다 [72, 73]. NO는 염증 반응 지표물질로 L-arginine으로부터 생성되며, 체내 염증 반응을 악화시켜 조직과 신경의 손상, 유전자 변이 등을 일으킨다[74].

사이토카인(cytokine)은 세포와 세포 사이 신호전달에 관여하는 당단백질로서 TNF- α , IL-1 β , IL-6등이 존재하고, 활성화 된 대식세포 혹은 다양한 염증관련 세포에서 생성되며, 혈관 투과성향상, chemokine 발현 유도, T-cell과 B-cell의 활성 조절 및 apoptosis 유도물질의 발현 증가 등에 영향을 미친다[75]. TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)는 내인성 발열 유전자로 발열, 세포 사멸, 악액질, 염증을 유도하고 종양 형성 및 바이러스 복제를 억제할 뿐 아니라 IL-1 (Interleukin-1) 및 IL-6 (Interlukin) 생산에 관여하는 것으로 알려져 있다[76]. IL-1 β 는 interleukin 1 family에 속하며, 세포 증식, 분화 및 세포 사멸을 포함하는 다양한 세포 활동에 관여한다[77].

대식세포의 LPS에 의해 유도된 염증반응 메커니즘은 Figure 1과 같다.

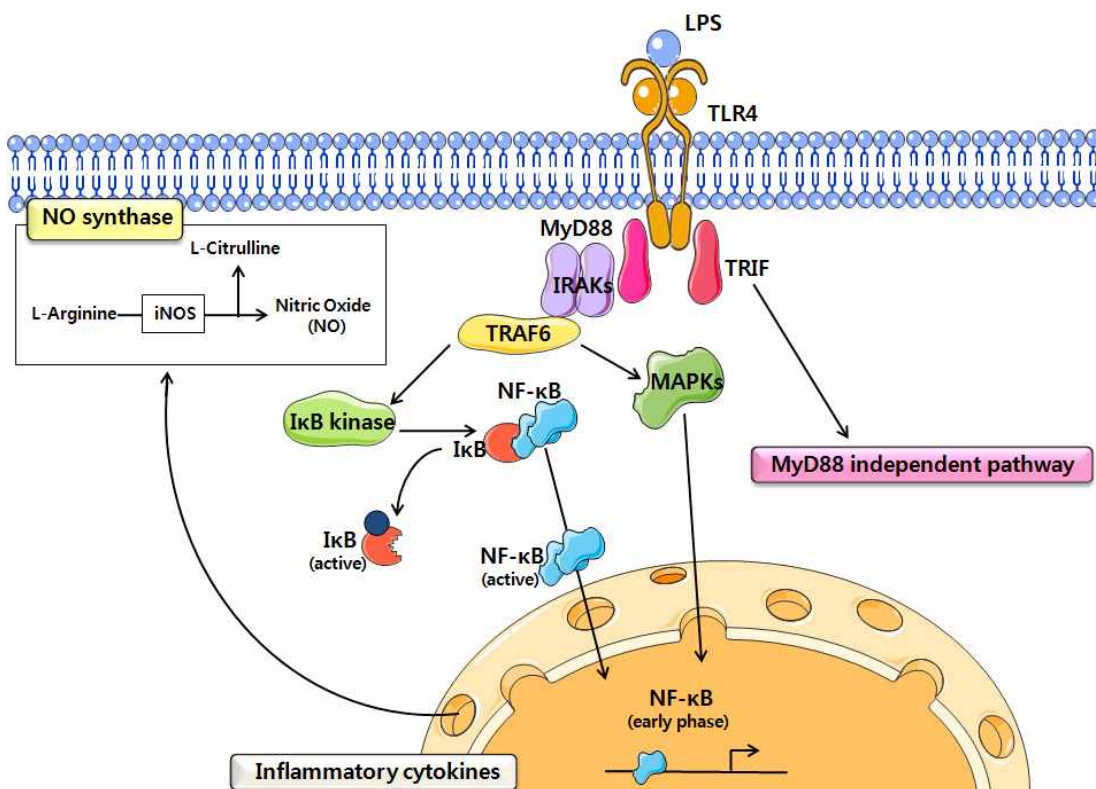


Figure 1. Schematic diagram of the TLR4 signaling pathway. The activation of TLR4 signals through MyD88-dependent is triggered by MyD88 recruitment of TRAF6 and IRAKs and TRAF6 complex results activation of phosphorylates Iκβ and NF-κB. NF-κB translocates to the nucleus to promote the transcription of pro-inflammatory genes such as IL-1β,IL-6, and TNF-α.; LPS: Lipopolysaccharide, TLR4: Toll-like receptor4, TRIF: Toll/interleukin-1 receptor(TRI) domain-containing adaptor protein inducing interferon beta, IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase, TRAF: Tumor necrosis factor(TNF) receptor associated factors, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, NF-κB:Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

3. 방광암

1) 방광암

보건복지부 발표(http://www.mohw.go.kr/front_new/index.jsp)에 따르면 2013년 우리나라 전체 암 발생 총 225,343건 중 방광암은 3,762 건으로 전체 암 발생율의 1.7%를 차지하였다. 4.1:1의 비율로 여성보다 남성에게서 발병률이 높은 것으로 나타났으며, 수명 연장에 따라 방광암의 전체 및 여성의 발병률은 증가 추세이다[78]. 방광암은 다른 암과 비교하여 완치율이 높은 편이나 비교적 악성도가 낮은 표재성 방광암의 경우 70%에 달할 정도로 재발률이 높으며, 이 중 10~15%는 근침윤성 방광암으로 진행되기 때문에 철저한 예방과 관리가 필요하다[35]. 중앙암등록본부(http://www.ncc.re.kr/main.ncc?uri=manage02_1) 자료에 의하면 방광암의 5년 상대생존율은 남녀 전체 76.5%로 보고되었으며, 남자가 78.3%, 여자가 69.2%로 나타났다.

현재까지 알려진 방광암의 위험인자로는 담배, 흡연, 방항죽 아민, 석탄, 비소 등이 있으며, 식이요인과 관련하여 가공육 또는 고지방식을 한 경우 적게는 37%에서 많게는 41%까지 방광암 발생률이 증가하는 것으로 나타났다[79]. 방광암 예방인자로 과일과 채소의 섭취 방광암의 발병률을 약 10% 낮추며[80], vitamin A와 E의 섭취는 방광암의 낮은 발병률과 관련 있는 것으로 나타났다[81]. 차(다류)의 섭취 연관성에서 녹차의 섭취는 방광암에 대한 보호효과를 갖는 것으로 나타났다[37].

2) MAP kinase pathway

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 외부의 신호를 핵으로 전달하는데 중요한 역할을 하는 serine-threonine protein kinases이며, 세포의 증식, 유전자 발현, 분화, 분열, 세포 생존 및 사멸등 대부분의 세포 기능을 조절한다[82]. MAPKs는 ERKs (Extracellular signal-related kinases), JNKs (c-jun NH₂-terminal kinases), p38의 MAPK과 MAPK kinase (MAP2K), MAPK kinase kinase (MAP3K)로 구성된다[83]. MAPKs는 mitogens, osmotic stress, 열, 염증성 사이토카인 등에 의해 촉진되며, MAPK/ERK 경로에서 Ras는 Raf를

활성화 시키고 MAP2K와 MAPK 를 차례(RAS/RAF/MEK/ERK)로 활성화 시킨다[84].

Vaqar Mustafa Adhami 등[46]에 따르면 녹차의 폴리페놀 경구 투여가 마우스 전립선 모델의 전립선암의 발생 및 진행을 억제하며, p-ERK1/2, phosphatidylinositol 3'-kinase, p-AKT의 증가가 이와 관련 있다는 결과를 보고하였으며, 녹차 내의 기능성 물질로 널리 알려진 EGCG를 투여한 Apcmin/+ mice 모델¹⁾에서 활성화 된 ERK1/2의 수준의 저하는 종양 형성을 억제 하는 것으로 나타났다[50].

MAPkinase signaling pathway는 Figure 2 에 나타내었다.

1) Apcmin/+ mice : 인간의 장 발암을 유전적으로 모방한 실험용 동물(mouse)

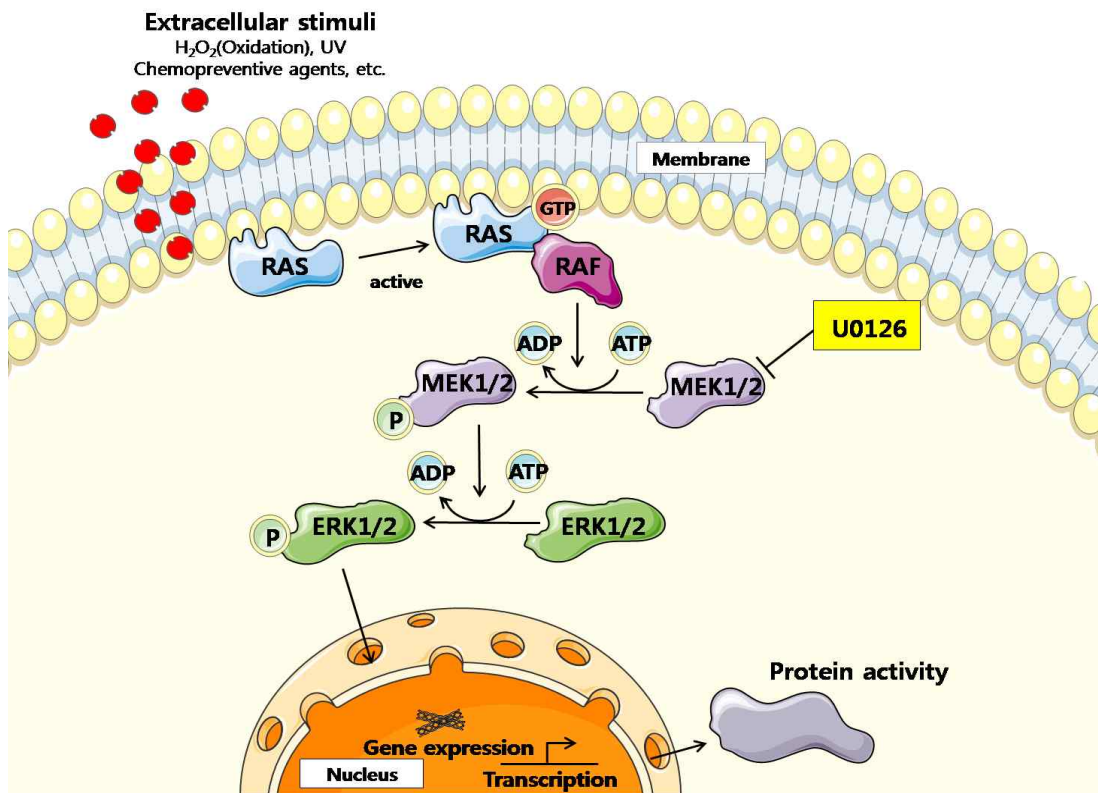


Figure 2. Schematic diagram of the ERK signaling pathway. MAPK/ERK pathway is signaling pathway from the cell surface to the nucleus. MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase)s are proteins Serine/threonine Kinases that are activated in response to the extracellular stimuli and mediate signal transduction. The signal starts when a extracellular stimuli binds to the receptor. Ras activates RAF kinase. RAF kinase phosphorylates and activates MEK1 and MEK2. MEK phosphorylates and activates ERK1 and ERK2 (extracellular signal-regulated kinase).

Ⅲ. 재 료 및 방 법

1. 감귤콤부차 발효

본 실험에서 사용한 콤부차는 민간에서 분양하여 판매하는 것을 인터넷 (www.aucton.co.kr)으로 구매하여 사용하였다. 콤부차 및 감귤 콤부차 제조에는 현미녹차(동서식품, Seoul, Korea), 설탕(CJ제일제당, Seoul, Korea)를 사용하였으며 감귤액은 제주지방개발공사에서 지원 받아 사용하였다.

감귤 콤부차는 Figure 3에 따라 제조 하였으며, 전통적인 방법으로 배양한 콤부차와 3종 균주를 이용하여 배양한 콤부차의 베이스는 동일하게 제조하였다.

증류수 1500 mL을 끓인 뒤 녹차 티백 5개를 10분간 우려낸다. 설탕 150g과 감귤액 60g을 첨가 하여 교반한 뒤 균주 접종을 위해 얼음물에 담가 온도를 30℃ 이하로 낮추었다.

1) Original Citrus Kombucha.(CK-Ori)

감귤 콤부차에 접종하기 위한 전배양 액과 패티클은 김청이 등[87]의 방법에 따라 제조 하였고, 감귤 콤부차 베이스 750 mL에 전배양 액 75 mL과 전배양 pellicle 20 g을 접종한 뒤 30℃ 배양기에서 15일간 발효하였으며, 매 3일 마다 샘플링을 실시하였다.

2) Citrus Kombucha fermented with 3 strains(CK-MOX)

배양에 사용 된 3종 균주는 *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans* 로 한국미생물보존센터 (KCCM)에서 분양받아 이용하였다. 배지 30 mL에 각각의 균주 single colony를 넣고, 48시간 배양 한 뒤, 원심분리기 (Aventi J-E, Beckman coulter, California, USA)를 이용하여 배양액을 제거 (18000 ×g, 10 min)한 균주를 감귤 콤부차 베이스 750 mL에

접종하였다. 30℃ 배양기에서 15 일 간 발효하였으며, 매 3 일 마다 샘플링을 실시하였다.

실험에는 발효액을 18000 xg로 10분간 원심 분리 후 상등액을 주사기용 필터유닛을 (0.45 µm, EMD Millipore Inc. Darmstadt, Germany) 이용하여 여과한 후 사용하였다.

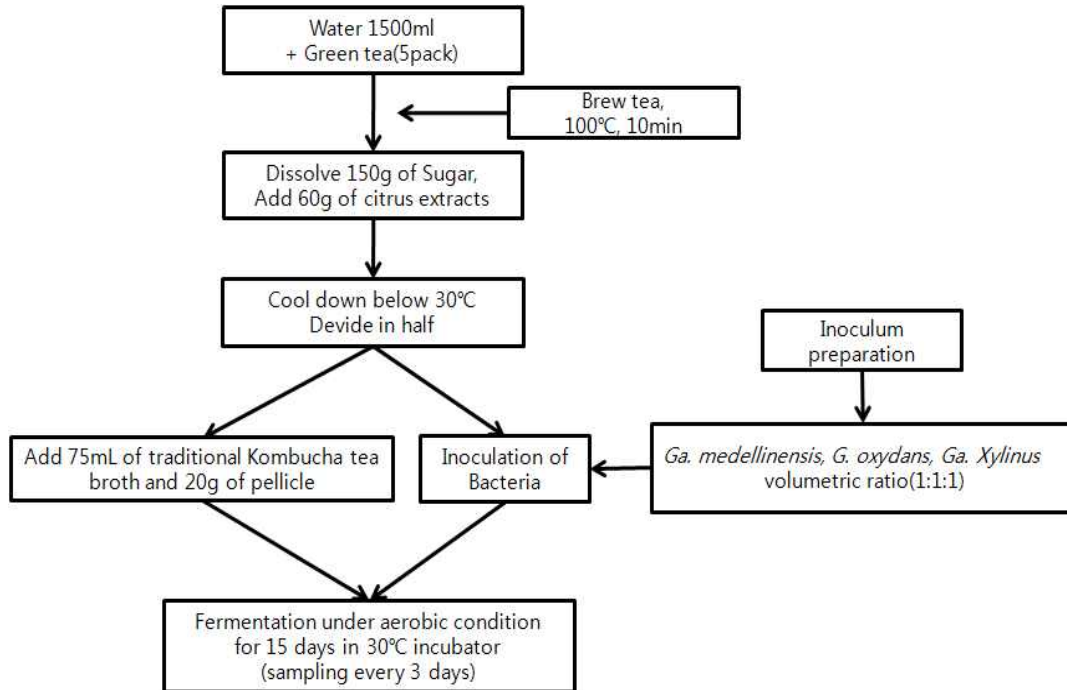


Figure 3. A flow diagram for Citrus Kombucha preparation.

2. 시료의 이화학적 특성

1) pH 및 산도 측정

pH측정은 50 mL 코니칼 튜브에 담긴 시료 20 mL을 pH meter (FEP20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 각 3번 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

산도[85]는 중화 적정법을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL을 10배 희석 한 뒤 1% phenolphthalein 지시약을 2~3방울을 가하고, 0.1N NaOH로 pH 8.3에 도달할 때까지 중화적정 하여 소비된 0.1N NaOH의 양 (mL)을 측정한 후 다음 식에 따라 초산으로 산도를 계산하였다. 산도는 각 3번 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

$$\text{Acidity}(\% \text{ of acetic acid}) = 0.1N \text{ NaOH 소비량} \times 0.1N \text{ NaOH 역가} \times 0.006 \times \text{희석배수} (10)$$

2) 총 당 및 환원당 정량

총 당 정량에는 페놀-황산법(Phenol-sulfuric acid)법[86]을 응용하여 이용하였다. 감귤 콤부차 200배 희석액 1 mL과 5% 페놀 1 mL를 시험관에 넣고 황산 5 mL 첨가, 교반한 뒤 30분간 방치한다. microplate reader (Versa Max, Orleans, USA) 를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 glucose 당량으로 나타내었다.

환원당 정량에는 DNS (Dinitrosalicylic acid)법[87]을 이용하였다. 콤부차 100배 희석액 3 mL와 reagent A (NaOH 1 g, DNS 1 g, Na₂SO₃ 0.05 g, phenol 0.2 mL, Distilled water 100 mL) 3 mL를 시험관에 넣고 100°C 항온수조에서 15분간 반응시킨 후 reagent B (Rochelle salt 4 g, Distilled water 100 mL) 1 mL를 넣고 냉각시킨다. microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 glucose 당량으로 나타내었다.

3. 시료의 기능적 특성

1) 항산화 측정

(1) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH radical scavenging assay[88]는 빠르고 간단하게 시료의 항산화 능력을 측정할 수 있는 방법으로 DPPH free radical form 인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 은 dimer 를 형성 하지 않는 안정한 organic nitrogen radical 이며, ethanol 에 용해되어 진한 보라색을 띤다. Radical 형태의 DPPH 는 수소 공여능이 있는 항산화 물질과 혼합되면 보라색을 잃고 옅은 노란 빛을 띄게 되며, 비가역적으로 환원되어 non-radical 형태의 화합물인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine 으로 전환된다. 색 변화의 증가는 시료의 DPPH radical scavenging activity 가 높음을 의미한다.

감귤 콤부차의 DPPH 라디칼 소거능 측정은 최인영 등[89]의 방법을 응용하여 측정하였다. 10배 희석한 시료 200 uL에 에탄올에 녹여 제조한 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 용액 800 uL를 첨가하여 혼합한 후 암소에서 20분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정하여 ascorbic acid 당량으로 나타내었다.

(2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS radical scavenging assay는 DPPH assay와 함께 많이 사용되는 항산화 능력 측정 방법이다. 용해 즉시 사용할 수 있는 DPPH와 달리 ABTS는 효소 (peroxidase, myoglobin) 또는 화학 물질 (이산화망간, 과황산칼륨, ABAP) 등에 의해 라디칼을 생성하여 사용하여야 한다. 또 반드시 유기 용매를 사용하여야 하는 DPPH와는 달리 ABTS는 물과 유기용매를 모두 사용할 수 있기 때문에

hydrophilic 또는 lipophilic 시료의 자유 라디칼 소거 능력을 측정 할 수 있다 [90].

ABTS 라디칼 소거능은 Roberta 등[91]의 방법을 응용하여 측정하였다. 메탄올에 녹인 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 12시간 이상 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성 시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 10배 희석 시료 100 uL 와 ABTS 용액 900 uL를 첨가하여 혼합한 뒤 암소에서 30분간 방치 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 사용하여 735 nm에서 측정 하여 ascorbic acid 당량으로 나타내었다.

(3) Total polyphenol 함량 측정

감귤 발효액의 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[92]을 이용하여 측정하였다. 폴리페놀은 다양한 생리활성 기능이 알려져 있으며, 특히 활성산소를 제거에 탁월 할 뿐 아니라 지질 과산화에 의한 노화 및 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 예방 작용을 보인다[93, 94].

10배 희석 시료 50 μ L, 증류수 450 μ L, Folin&Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 20 μ L, 25% sodium carbonate 용액 480 μ L를 순서대로 넣고, 교반 한 후 암소에서 1 시간 방치한 뒤 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 총 플라보노이드 함량 분석은 tannic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 계산하였다.

(4) ORAC(Oxygen radical absorbance capacity) assay

ORAC assay는 ,2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의해 생성된 free radical에 대한 항산화 물질의 라디칼 소거 능력을 시료와 대조군에 fluorescent 결합시켜 시간 경과에 따른 peroxy radical의 생성과 소멸을 형광 값의 감소율을 측정하는 방법으로 식품 내 존재하는 hydrophobic 성분과 hydrophilic 성분 모두에 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지고 있

다[95].

ORAC value는 Ou 등[96]의 방법을 응용하여 비교 측정하였다. 본 실험에서 사용한 시료와 표준물질 및 시약은 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)용액에 희석하여 사용하였다. 96- black well plate에 50배로 희석된 시료 25 μ L와 40 nM fluorescein (대정화금, Gyeonggi-do, Korea) 120 μ L를 혼합하고 측정 직전 150 mM 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 55 μ L를 첨가하였다. fluorescence microplate reader (Spectra Max i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 37°C 에서 excitation은 485 nm, emission은 520 nm에서 2분 간격으로 총 1시간 동안 측정하였다. 측정값은 각 시료의 area under curve(AUC)를 구한 후 trolox의 표준곡선에 대입하여 나타내었다.

2) 항염 측정

(1) 세포 배양

실험에 사용된 RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 배지에 10% FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany)을 추가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) 세포 생존율 측정(Cell counting)

감귤 발효액 처리에 따른 세포 독성 여부를 확인하기 위하여 trypan blue로 염색한 세포의 수를 세는 cell counting method[97]를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. Trypan blue는 염색 용액으로 chromophore가 세포막을 통과 할 수 없기 때문에 손상되거나 죽은 세포에만 반응하는 원리를 이용한 방법이다[96].

RAW264.7 대식세포를 12-well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주한 뒤 12

시간 배양하고, LPS (1 µg/mL)와 감귤콤부차 발효 기간별 (Day 0, 3, 6, 9, 12, 15)시료를 5 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포는 0.25% trypsin을 이용해 harvest 한 뒤 trypan blue (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 1:4의 비율로 혼합하고 hemocytometer를 이용하여 계수 한 뒤 LPS와 CK 모두를 처리하지 않은 무처리군의 세포 생존율을 100%로 하여 상대적인 세포생존율(cell viability)을 계산하여 나타내었다.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{\text{처리군의 평균 세포수}(cells/mL)}{\text{대조군의 평균 세포수}(cells/mL)} \times 100$$

(3) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO synthase에 의하여 생성되는 nitric oxide (NO)는 nitrate (NO³⁻)와 nitrite (NO²⁻)로 변환된다. 때문에 총 NO³⁻/NO²⁻의 측정치를 세포 배양액 내 염증에 의한 NO 생성의 marker로서 이용할 수 있다. 12-well plate에 RAW264.7 대식세포를 5×10⁴ cells/well의 농도로 분주한 뒤 12시간 배양하고, LPS (1 µg/mL)와 감귤콤부차 발효 기간별(Day 0, 3, 6, 9, 12, 15)시료를 5 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 측정은 배양 상등액 100 µL에 Griess reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 동량 처리하여 15분간 암소에서 반응 시킨 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 sodium nitrite (Hayashi, Osaka, Japan)를 이용한 표준곡선에 대입하여 계산하였다.

(4) 염증관련 사이토카인 생성량 측정

가. 시료의 처리

6-well plate에 RAW264.7 대식세포를 2×10⁵ cells/well의 농도로 분주한 뒤 12시간 배양하고, LPS (1 ug/mL)와 CK-MOX 발효 전(Day 0)과 발효 후(Day 15) 시료를 5 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다.

나. RNA추출, 정제 및 정량

세포의 RNA는 E-zol (PhileKorea, Daejeon, Korea)을 이용하여 추출하였다. 1 mL의 E-zol 을 넣고 균질화 한 뒤 0.2 mL의 chloroform을 섞고 18000×g로 2분 간 4°C에서 원심분리 하여 chloroform 층을 X-RNA Clean-up Kit (PhileKorea, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제 하였다. RNA 정량에는 Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하였으며, RNase-free water에 1 ng/μL로 희석하여 실험에 이용하였다.

다. 측정

Cyclescript reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA 를 만든 뒤 Accupower 2X GreenStar qPCR Master Mix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 프로토콜에 따라 섞어 준비하였다. 측정에는 CFX96™ Real-Time System (Bio-rad, California, USA)를 사용하였으며, 측정 조건은 95°C 5분, 95°C 15초, 60°C 30초, 40 cycle이다. 실험에 사용 된 primer sequence는 Table 1과 같다.

Table 1. Sequences of primers for real-time PCR[108]

		Sequences(5'-3')
mGAPDH ¹⁾	Forward	GGA-GGA-ACC-TGC-CAA-GTA-TG
	Reverse	TGG-GAG-TTG-CTG-TTG-AAG-TC
mTNF- α	Forward	TGG-CCC-AGA-CCC-TCA-CAC-TCA-G
	Reverse	ACC-CAT-CGG-CTG-GCA-CCA-CT
mIL-1 β	Forward	GGA-GAA-CCA-AGC-AAC-GAC-AAA-ATA
	Reverse	TGG-GGA-ACT-CTG-CAG-ACT-CAA-AC

1) GAPDH:Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, m:mouse

3) 항암성 측정

(1) 세포 배양

실험에 사용된 T24, EJ, 5637 세포는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 배지에 10% FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany)을 추가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) 세포생존율 측정(MTT assay)[98]

MTT 분석은 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 보라색을 띠는 비 수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사방법이다.

감귤 발효액의 세포 독성 여부를 확인하기 위하여 96-well plate에 RAW264.7 대식세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. LPS (1 µg/mL)와 시료를 농도별(0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/mL)로 처리 하여 24, 48시간 후에 MTT 분석을 실시하였다.

방광암 세포(EJ, T24, 5637 세포)에 대한 성장억제 능력 확인을 위해 96-well plate 방광암 세포를 3000 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 시료를 조건에 따라 처리하여 24, 48시간 후에 MTT 분석을 실시하였다.

본 연구에서는 MTT 시약(Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 PBS에 5 mg/mL의 농도로 제조하여 -20°C에 보관하면서, 사용 직전 0.5 mg/mL의 농도로 배지에 희석하여 사용하였다. 상층액을 제거 한 뒤 배지에 희석한 MTT 시약을 넣고 2시간 처리 후 상층액을 제거하여 DMSO (Bio basic, Ontario, Canada)로 각 well에 생성된 MTT formazan을 1시간 동안 용해한 뒤 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{\text{시료처리군의 평균 흡광도}}{\text{대조군의 평균 흡광도}} \times 100$$

(3) 세포 이동성 관찰(Scratch-wound healing assay)

세포를 6-well plate에 분주, 24시간 배양 후 200 μ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 뒤 상층의 배지를 제거하고, 시료를 처리하여 도립현미경으로 2일간 세포의 이동성을 관찰하였다.

$$migration\ inhibition\ rate(\%) = \frac{New\ scratch\ width}{Original\ scratch\ width} \times 100$$

(4) Annexin V 측정(FACS analysis)

세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 6-well plate에 분주 한 뒤, 농도로 24~72시간 시료 처리 후 배지를 포함한 시료처리 샘플 모두를 tube에 옮겨 $200 \times g$ 에서 2분간 원심분리 하였다. 상층액 제거 후 세포 pellet을 차가운 PBS를 이용하여 1회 세척 한 뒤, PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD biosciences, California, USA)를 이용하여 측정하였다. 1x cold binding buffer를 이용하여 1×10^6 cells/mL의 농도로 희석 후 5 μ L PE annexin v를 더하고, 25°C에서 15분 방치한 후 1x binding buffer 400 μ L를 추가 한 뒤 75 μ L를 cassette (Moxi flow cytometry, ORFLO, Cambridge, USA)에 넣고 FACS (Moxi flow cytometry, ORFLO, Cambridge, USA)로 측정 하였다.

(5) 단백질 발현 측정(Western immunoblot assay)

특정 단백질의 발현 확인을 위해 western immunoblot을 실시하였으며, 방광암 세포 EJ, T24, 5637 세포에 시료 처리 후 RIPA-lysis buffer (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea)와 protease inhibitor 혼합액을 이용하여 균질화, 최대 속도에서 10분간 원심 분리(Micro 17R, Hanil, Gyeonggi-do, Korea)하여 상층액을 분리하였다. 단백질정량은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, Illinois,

USA)를 이용하였으며, 30 μ g의 단백질을 포함한 시료를 SDS page gel에 의해 세분하고, Nitrocellulose blotting membrane (GE healthcare life science, USA)에 transfer를 실시하였다. ponceau S (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea) 용액을 이용해 transfer 상태를 확인 한 뒤 5% skim-milk로 blocking 하였다. 1차 항체 p-ERK와 ERK(Cell signaling technology, Massachusetts, USA)는 1:1000의 비율로 희석하여 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 2차 항체(Cell signaling technology, Massachusetts, USA)는 1:3000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 측정에는 WESTAR ETA C ultra 2.0 ECL solution (Cyanagen, Bologna, Italy)을 반응시킨 후 Fusion Solo (Vilber lourmat, Marne, France)를 이용하였다.

4. 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 통계 프로그램 SPSS Version 18.0을 이용하여 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었으며, $p < 0.05$ 수준에서 scratch wound healing assay 결과는 T-Test, 그 이외의 모든 실험 결과는 one-way ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test로 각 실험 군의 유의적 차이를 검증하였다.

IV. 연구 결과

1. 발효에 따른 시료의 이화학적 특성 변화

1) pH 및 산도 측정

각각의 발효액은 시간이 지남에 따라 유의적으로 pH는 감소하고 산도는 증가하는 것으로 나타났으며, 측정 결과는 Table 2에 나타내었다.

CK-Ori는 CK-MOX와 비교하여 pH와 산도의 급격한 변화가 관찰 되었다. 발효 전 pH 3.79에서 발효 3일째 pH 2.69로 감소하였고, 발효 기간이 지남에 따라 지속적으로 pH는 유의적으로 감소하였으나 미미한 차이를 보였다. CK-MOX의 pH변화는 발효기간이 지남에 따라 유의적으로 감소하여 15일 째 배양액의 pH는 2.99 ± 0.02 로 나타났다.

산도는 중화 적정법을 사용하여 초산으로 나타내었으며, 발효가 진행됨에 따라 증가 하여 발효 전과 비교하여 CK-Ori는 약 2.7%, CK-MOX는 약 1.5%의 초산에 해당하는 산이 생성된 것으로 관찰 되었다.

Table 2. Changes in pH and total acidity of Citrus Kombucha during fermentation.

Fermentation period (Day)	pH		Acidity (%)	
	CK-Ori ¹⁾	CK-MOX ²⁾	CK-Ori	CK-MOX
0	3.79±0.02 ^a	3.79±0.02 ^a	0.17±0.00 ^f	0.17±0.00 ^e
3	2.69±0.00 ^b	3.73±0.00 ^b	0.99±0.00 ^e	0.18±0.00 ^e
6	2.62±0.01 ^c	3.45±0.02 ^c	1.67±0.02 ^d	0.54±0.00 ^d
9	2.59±0.01 ^{cd}	3.37±0.03 ^d	1.87±0.03 ^c	1.04±0.02 ^c
12	2.59±0.01 ^d	3.27±0.01 ^e	2.63±0.02 ^b	1.37±0.05 ^b
15	2.54±0.02 ^e	2.99±0.02 ^f	2.73±0.02 ^a	1.51±0.00 ^a

Values are means ± SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

1) Ori: Citrus Kombucha fermented in traditional method.

2) MOX: Citrus Kombucha fermented with 3 bacteria strains.

2) 총 당 및 환원당의 변화

시료의 총 당 및 환원당의 변화는 Table 3에 나타내었다.

CK-Ori 시료의 발효 기간에 따른 총 당의 변화는 발효 전(Day 0) 3.77 mg glucose/mL 에서 발효 후 2.57 mg glucose/mL 로 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 발효 3 일째 총 당의 양이 크게 감소 되어 6 일째 시료(Day 6)와 15 일째 시료(Day 15)의 유의적 차이는 관찰되지 않았다. CK-MOX 시료 또한 발효 후(Day 15) 2.46 mg glucose/mL 로 발효 전(Day 0)과 비교하여 유의적으로 감소하였다.

CK-Ori 시료의 환원당 량은 발효 기간이 지남에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, CK-MOX 시료의 환원당 량은 유의적인 차이가 있었으나 발효 기간과의 연관성은 관찰 되지 않았다.

Table 3. Changes in total sugar and reducing sugar of Citrus Kombucha during fermentation.

Fermentation period (Day)	Total sugar		Reducing sugar	
	(mg glucose/mL)		(mg glucose/mL)	
	CK-Ori ¹⁾	CK-MOX ²⁾	CK-Ori	CK-MOX
0	3.77±0.23 ^a	3.77±0.23 ^a	0.09±0.00 ^d	0.09±0.00 ^a
3	3.42±0.17 ^b	3.29±0.21 ^b	0.08±0.00 ^d	0.02±0.00 ^d
6	2.92±0.08 ^c	2.90±0.06 ^c	0.14±0.00 ^c	0.02±0.00 ^d
9	2.57±0.06 ^c	2.69±0.07 ^{cd}	0.18±0.00 ^b	0.03±0.00 ^c
12	2.49±0.26 ^c	2.29±0.23 ^d	0.18±0.00 ^b	0.06±0.00 ^b
15	2.57±0.11 ^c	2.46±0.05 ^d	0.21±0.01 ^a	0.04±0.00 ^c

Values are means ± SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

1) Ori: Citrus Kombucha fermented in traditional method.

2) MOX: Citrus Kombucha fermented with 3 bacteria strains.

2. 시료의 기능적 특성

1) 항산화 측정

(1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과

본 실험에서는 각 시료의 DPPH radical scavenging activity 를 L-ascorbic acid 와 대조하여 μg ascorbic acid equivalent 로 나타내었다.

CK-Ori 의 DPPH 라디칼 소거능은 발효 진행에 따라 유의적으로 증가하였으며, 발효 전(Day 0) 125 μg ascorbic acid/mL 에서 발효 후 427 μg ascorbic acid/mL 로 관찰 되었고(Table 4), CK-MOX 발효 후(Day 15)시료의 DPPH 라디칼 소거능은 발효 전(Day 0)과 비교하여 약 2 배 증가한 280 μg ascorbic acid 로 나타났다(Table 5).

(2) ABTS 라디칼 소거능 측정 결과

ABTS 라디칼 소거능은 ascorbic acid 당량으로 나타내었다.

ABTS 측정 결과에서 CK-Ori와 CK-MOX는 비슷한 경향성을 보이며 발효 기간이 지남에 따라 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났다(Table 4-5).

CK-Ori와 CK-MOX ABTS 라디칼 소거능은 3일째 가장 크게 증가하여 각각 675, 697 μg ascorbic acid/mL로 나타났으며, 발효 기간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 또 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과는 DPPH 측정 결과와 달리 발효 완료된 CK-MOX의 라디칼 소거능이 더 높은 것으로 나타났다.

(3) Total polyphenol 함량 측정 결과

CK-Ori의 폴리페놀 함량은 발효 기간이 지남에 따라 유의하게 증가하였으며, 발효 전(Day 0) 181 μg tannic acid/mL, 발효 후 280 μg tannic acid/mL로 나타났다. CK-MOX는 CK-Ori와 반대의 결과 치를 보였는데 발효 전과 비교하여 발효 후(Day15) 시료의 폴리페놀 양은 감소하여 135 μg tannic acid/mL으로 나타났다(Table 4-5).

(4) ORAC assay 측정 결과

CK-Ori의 ORAC 측정 값은 발효 전 (Day 0) 5.93 μM trolox equivalent와 비교하여 발효 후 (Day 15) 15.58 μM trolox equivalent로 유의하게 증가하였으며, CK-MOX시료의 ORAC 측정 결과 발효 전(Day 0) 5.93 μM trolox equivalent와 비교하여 발효 후 (Day 15) 7.51 μM trolox equivalent로 유의적으로 증가하였으나 발효 12일 째 (Day 12) 의 시료가 8.35 μM trolox equivalent로 가장 높은 것으로 나타났다(Table 4-5).

Table 4. Antioxidant capacity of CK-Ori¹⁾.

Fermentation period (Day)	DPPH radical scavenging activity (μg ascorbic acid/mL)	ABTS radical scavenging activity (μg ascorbic acid/mL)	Total phenolic content (μg tannic acid/mL)	ORAC assay (mM Trolox)
0	125 \pm 17 ^f	91 \pm 14 ^d	181 \pm 1 ^c	5.93 \pm 0.15 ^e
3	199 \pm 14 ^e	438 \pm 42 ^c	160 \pm 4 ^c	5.44 \pm 0.19 ^e
6	284 \pm 15 ^d	518 \pm 17 ^b	184 \pm 23 ^c	8.91 \pm 0.22 ^d
9	314 \pm 6 ^c	562 \pm 18 ^b	218 \pm 12 ^b	10.97 \pm 0.34 ^c
12	368 \pm 8 ^b	672 \pm 52 ^a	237 \pm 3 ^b	13.27 \pm 0.48 ^b
15	427 \pm 1 ^a	675 \pm 31 ^a	280 \pm 1 ^a	15.58 \pm 0.77 ^a

Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

1) Ori: Citrus Kombucha fermented in traditional method.

Table 5. Antioxidant capacity of CK-MOX.¹⁾

Fermentation period (Day)	DPPH radical scavenging activity (μg ascorbic acid/mL)	ABTS radical scavenging activity (μg ascorbic acid/mL)	Total phenolic content (μg tannic acid/mL)	ORAC assay (mM Trolox)
0	125 \pm 17 ^c	91 \pm 14 ^d	181 \pm 1 ^a	5.93 \pm 0.15 ^d
3	135 \pm 1 ^c	599 \pm 46 ^{bc}	175 \pm 5 ^a	5.80 \pm 0.25 ^d
6	149 \pm 22 ^c	602 \pm 35 ^{bc}	175 \pm 8 ^a	6.65 \pm 0.14 ^c
9	227 \pm 20 ^b	558 \pm 13 ^c	144 \pm 2 ^{ab}	7.74 \pm 0.16 ^b
12	241 \pm 21 ^b	634 \pm 31 ^b	146 \pm 8 ^{ab}	8.35 \pm 0.19 ^a
15	280 \pm 6 ^a	697 \pm 20 ^a	135 \pm 1 ^b	7.51 \pm 0.37 ^b

Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

1) MOX: Citrus Kombucha fermented with 3 bacteria strains.

2) 항염 측정

(1) 세포 생존율 측정(Cell counting)

RAW264.7 대식세포에 염증 유도를 위한 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 발효 기간별 샘플링 한 CK-MOX (5 mg/mL)를 동시 처리하여 세포 생존율을 비교한 결과 무처리 군 대비 모든 군 간의 유의적 차이가 없음을 확인하였다 (Figure 4).

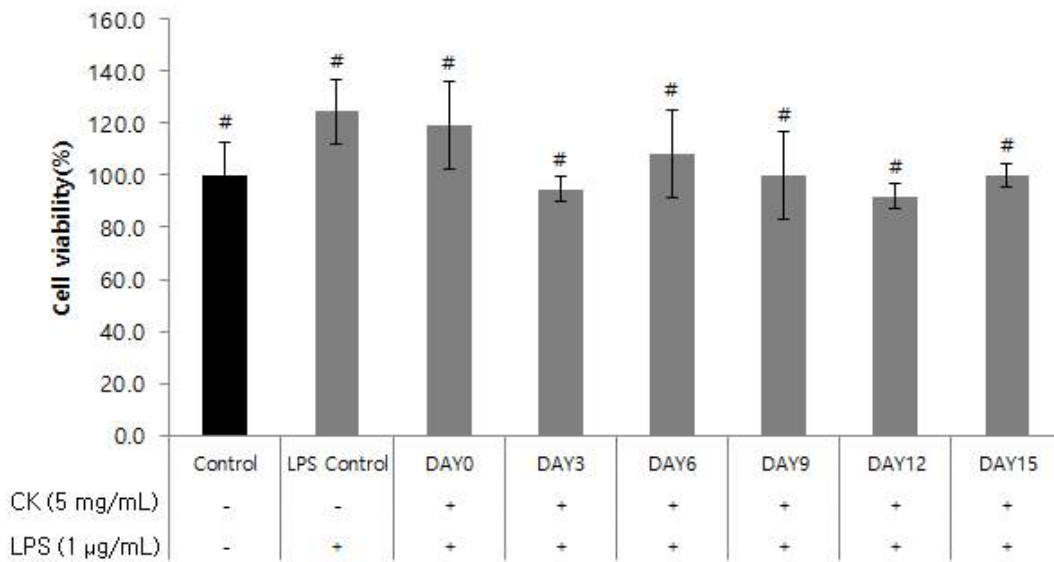


Figure 5. Effect of CK-MOX on cell viability in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Values are means \pm SD of three independent experiments. #, not significant versus control.

(2) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 대식세포에 염증 유도를 위한 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 발효 기간별 샘플링 한 CK-MOX (5 mg/mL)를 동시 처리하여 배지 내의 NO 농도를 비교한 결과 (Figure 5) 무처리 군 대비 발효 후 (Day 15) 시료를 처리한 군에서 유의적으로 NO 생성량이 낮은 것을 확인 하였다.

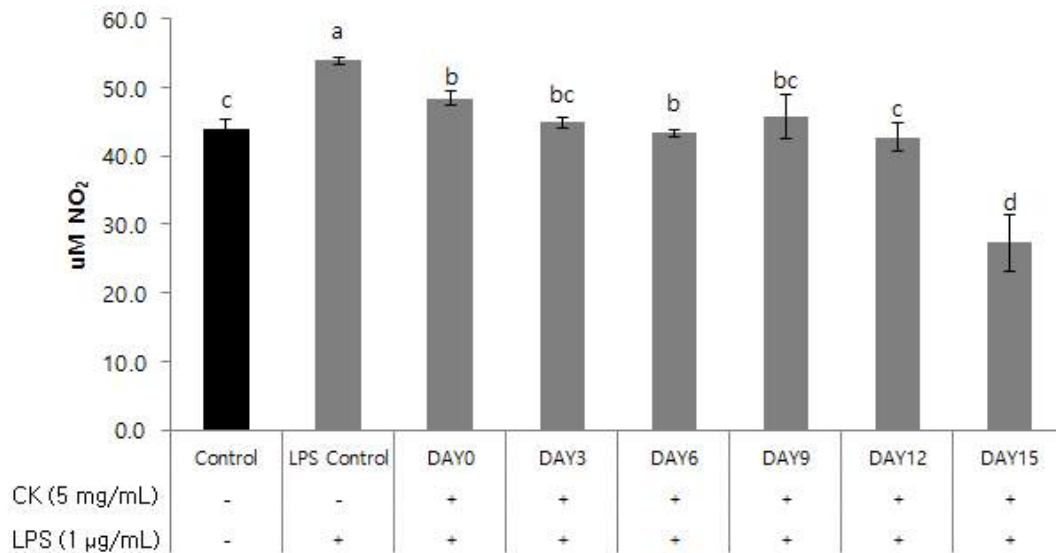


Figure 6. Effect of CK-MOX on NO production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 염증관련 사이토카인 생성량 측정(Real-time PCR)

LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에 대한 CK-MOX를 처리가 염증성 사이토카인의 mRNA level 수준에서 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time PCR 실험을 진행하였고 측정값을 Fold change로 나타내었다.

그 결과 발효 후 (Day 15) 시료를 처리 하였을 경우 LPS로 유도 된 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현이 큰 폭으로 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 6-7).

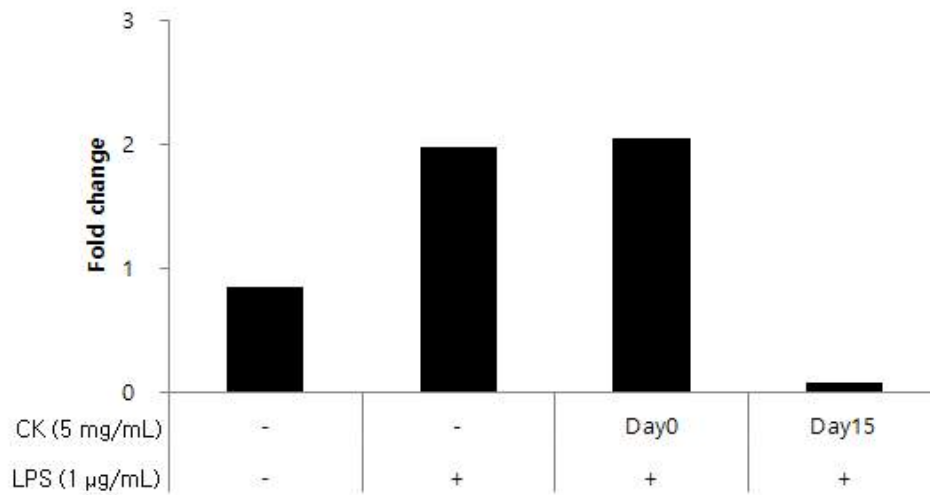


Figure 6. Effect of CK-MOX on TNF- α mRNA production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.

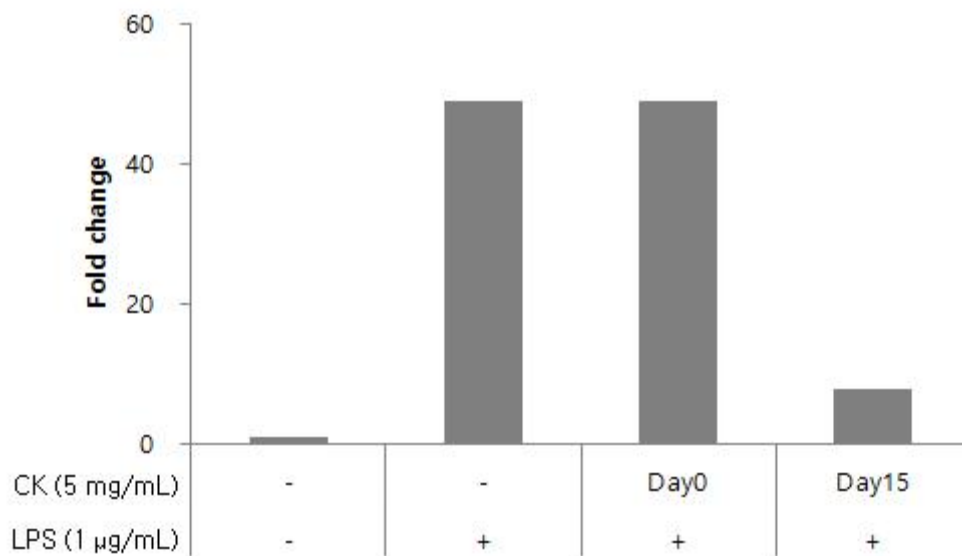


Figure 7. Effect of CK-MOX on IL-1 β mRNA production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.

3) 항암성 측정

(1) RAW264.7 대식세포에 대한 CK-MOX의 세포 독성

곰부차 유래 3종 균주를 이용하여 발효한 감귤 발효액 (CK-MOX) 의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성을 확인하기 위하여 발효 후 (Day 15) 시료를 농도별로 처리하여 MTT assay를 실시하였다.

시료처리 후 24-48시간 관찰한 결과 발효 후 (Day 15) 시료 15 mg 과 20 mg 처리 군에서 유의적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타나 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 최대 농도인 10 mg/mL에서 이후의 실험을 수행하였다 (Figure 8).

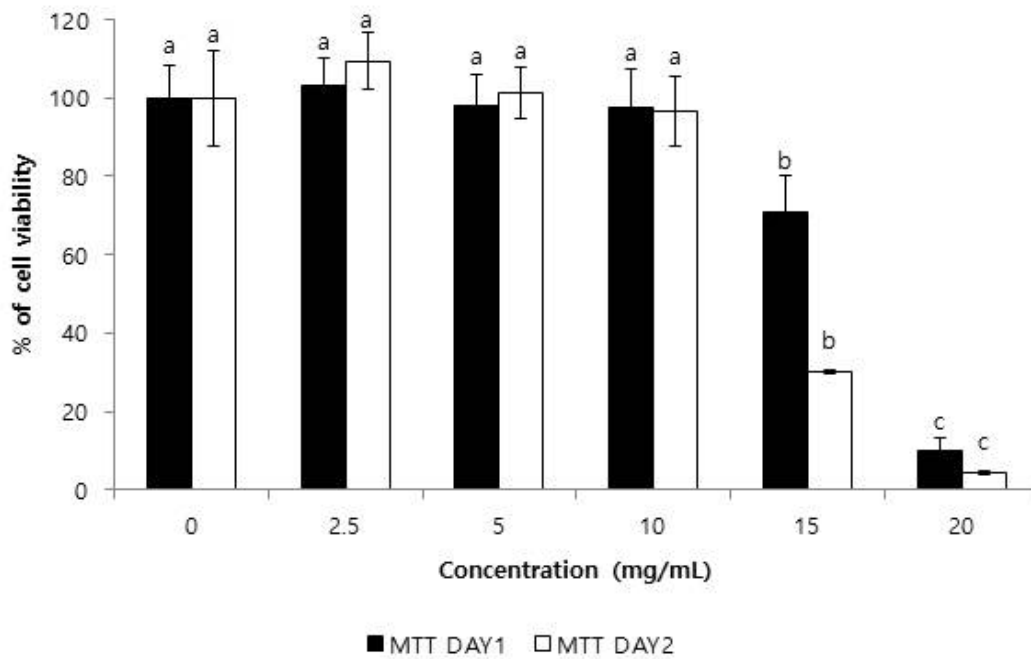


Figure 8. Effect of CK-MOX (Day 15) on viability of RAW264.7 cells. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(2) 방광암 세포(EJ, T24, 5637 cell)의 CK-MOX (Day 15) 농도별 처리에 따른 성장 억제율

CK-MOX의 방광암 세포에 대한 생존 억제율을 확인하기 위하여 발효 후 (Day 15) 시료 0~10 mg을 농도별로 처리하여 48시간 후 MTT assay를 실시하였으며 결과 값은 무처리 군 (0 mg/mL) 의 생존율과 대조한 비율로 나타내었다 (Figure 9).

T24를 제외한 EJ, 5637 세포에서는 0~5 mg 처리군의 생존률의 감소가 없었으나, 발효 후 (Day 15) 시료 10 mg/mL 농도로 처리한 군에서 EJ, T24 5637 세포 생존율이 각각 68, 54, 75%로 유의적인 감소를 보였다 따라서 CK-MOX의 처리는 방광암 세포주 성장을 억제 하는 것으로 나타났다.

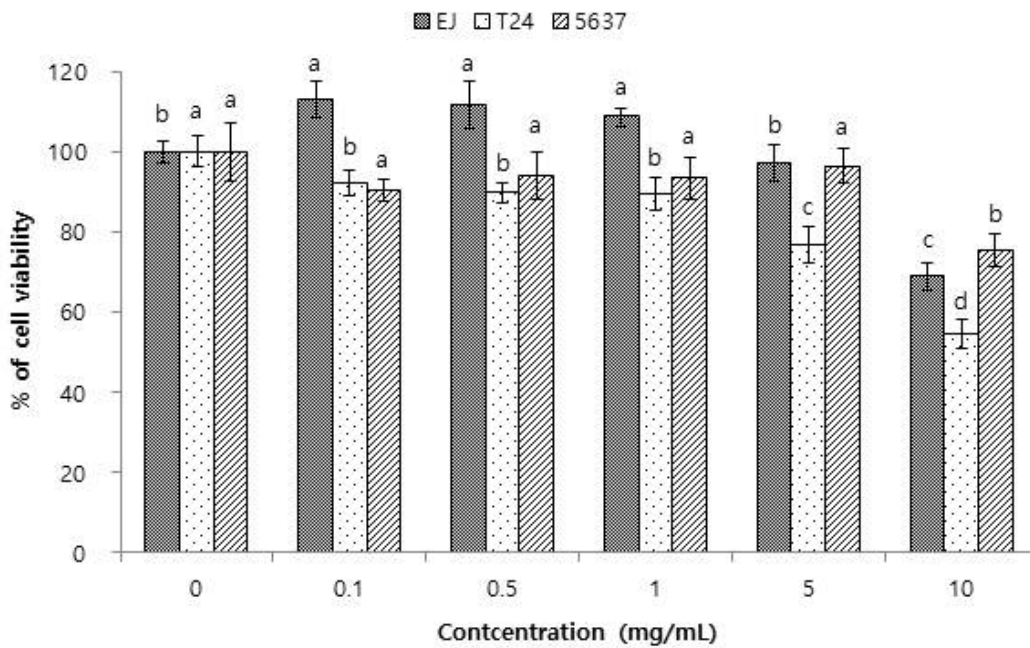


Figure 9. Effect of CK-MOX (Day 15) on viability of bladder cancer cell (EJ, T24, 5637 cell). Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3). 방광암 세포 (EJ, T24, 5637 cell) 의 발효 기간별 CK-MOX 처리에 따른 성장 억제율

CK-MOX의 발효 기간에 따른 방광암 세포에 대한 생존 억제율의 변화를 확인하기 위하여 발효 기간별 (Day0, 3, 6, 9, 12, 15) 시료를 앞선 실험에서 성장 억제 효과를 보였던 10 mg/mL의 농도로 처리하여 48시간 뒤의 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 성장 억제율은 무처리 군 (Control) 의 생존율과 대조한 비율로 나타내었다.

방광암 세포주 EJ 세포는 3일간 발효한 시료 (Day 3) 에서 약 48% 성장이 억제되었으며, 6일간 발효한 시료 (Day 6) 에서 가장 낮은 값의 세포 생존율이 관찰 되었으나 3일간 발효한 시료 (Day 3) 처리 군과의 유의적 차이는 없었다. T24 세포는 EJ, 5637 세포와 비교하여 세포 성장이 크게 억제 되는 것으로 확인 하였으며 발효 후 (Day 15) 시료 처리군의 세포 생존율은 18%로 나타났다. 5637 세포의 경우 발효 기간이 증가함에 따라 세포 생존율이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 위의 결과를 토대로 이후의 실험은 세 가지 세포주 모두에 세포 성장억제 효과가 50%이상 존재하는 발효 15일 째 시료 (Day 15) 를 10 mg/mL의 농도로 처리하여 진행하였다.

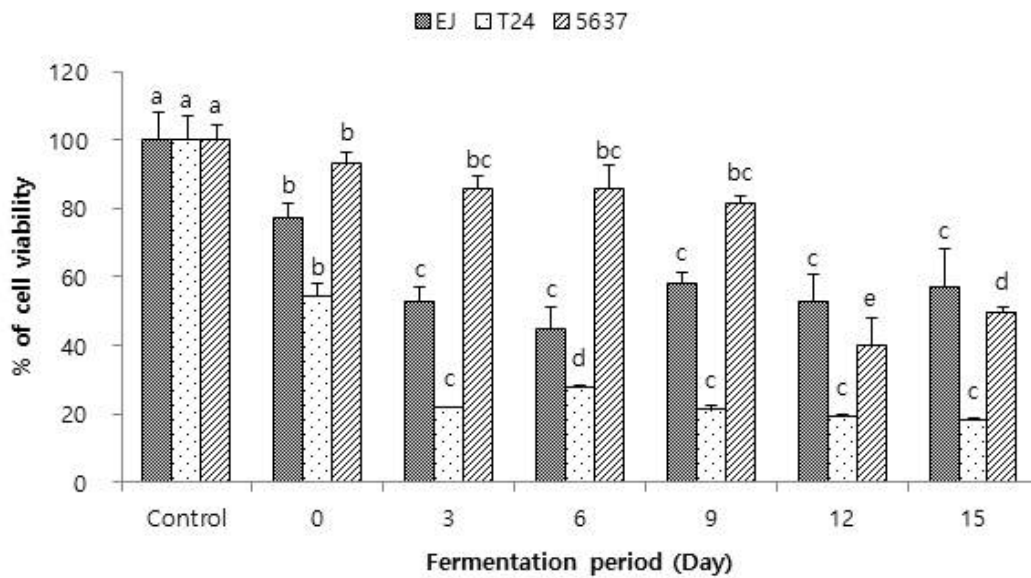


Figure 10. Effect of CK-MOX on viability of bladder cancer cell (EJ, T24, and 5637 cells). Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(4) 세포 이동성 관찰(Scratch-wound healing assay)

Scratch wound healing assay는 세포의 이동 (cell migration) 을 관찰할 수 있는 간단한 실험 방법으로 본 연구에서는 CK-MOX의 방광암세포 (EJ, T24, 5637 cell) 에 대한 세포 이동 및 성장억제 능력을 확인하고자 하였다.

초기 측정값을 기준으로 24시간 48시간 각각 측정한 값의 비율을 다시 대조군과 비교하여 migration inhibition rate (%)으로 나타내었다.

EJ 세포에 대조군 (Control), 발효 전 시료 (Day 0) 처리군, 발효 후 시료 (Day 15)처리 군으로 나누어 24시간과 48시간, 2회 관찰한 결과 대조군 (Control) 또는 발효 전 시료 (Day 0) 처리 군과 비교하여 발효 후 시료 (Day 15) 처리 군에서 48시간 배양 후 유의하게 cell migration이 억제 되는 것으로 나타났다 (Figure 11).

T24 세포 실험 결과에서는 24시간 배양 시 대조군 (Control) 대비 발효 전 시료 (Day 0) 처리 군에서 cell migration을 약간 억제하는 것으로 나타났으나 이외의 결과들은 유의성을 보이지 않았다 (Figure 12).

5637 세포에 CK-MOX를 처리한 결과 24시간, 48시간 모두 대조군 (Control) 대비 발효 후 (Day 15) 시료 처리 군에서 유의하게 cell migration을 억제하는 것으로 나타나 5637 세포의 이동성 억제에 CK-MOX 발효 후 시료 (Day 15) 의 처리가 효과 있음을 확인하였다 (Figure 13).

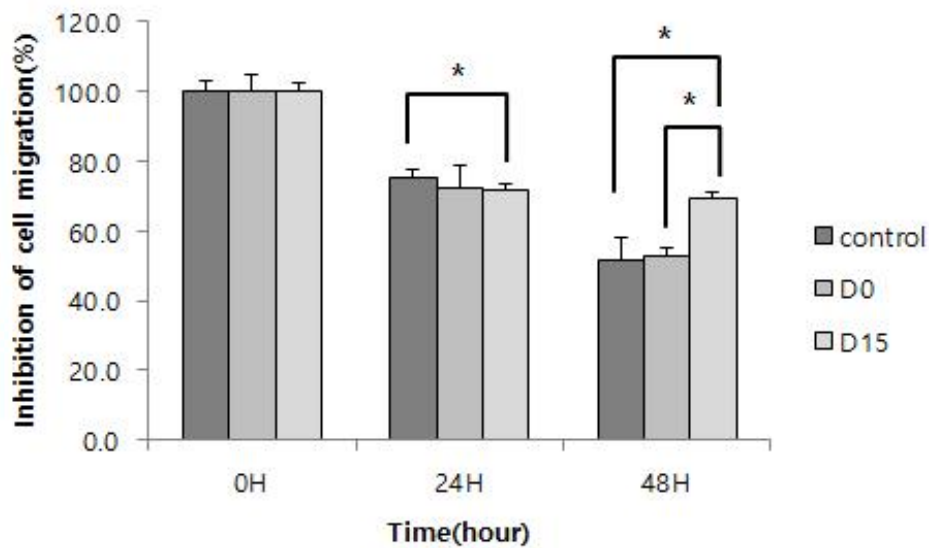
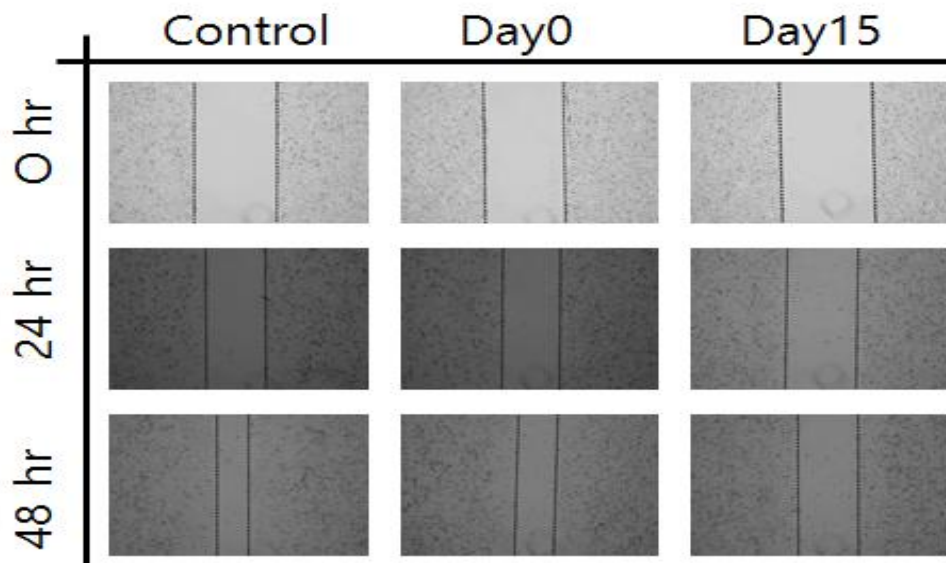


Figure 11. Effects of CK-MOX treatment on the migration of EJ cells. Values are means \pm SD of three independent experiments; *, indicate significant differences between samples determined by T-test ($p < 0.05$).

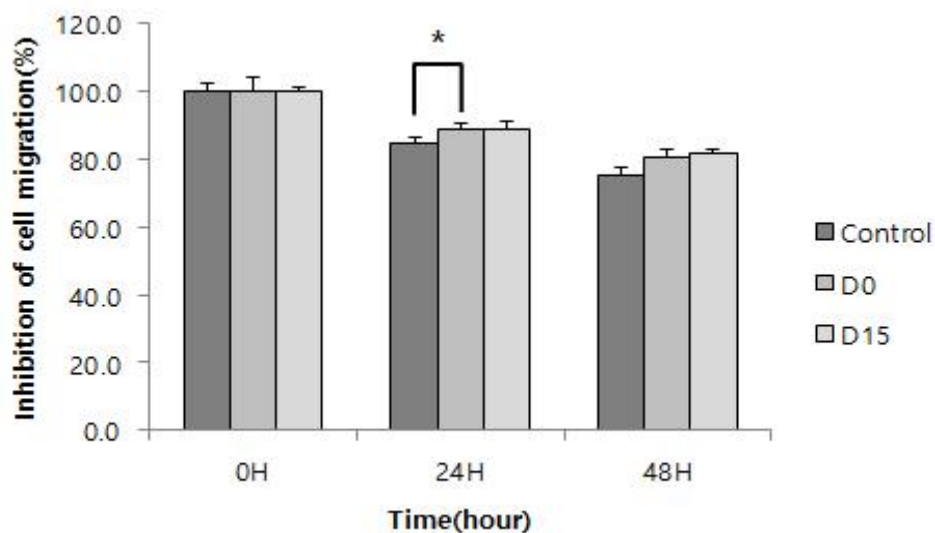
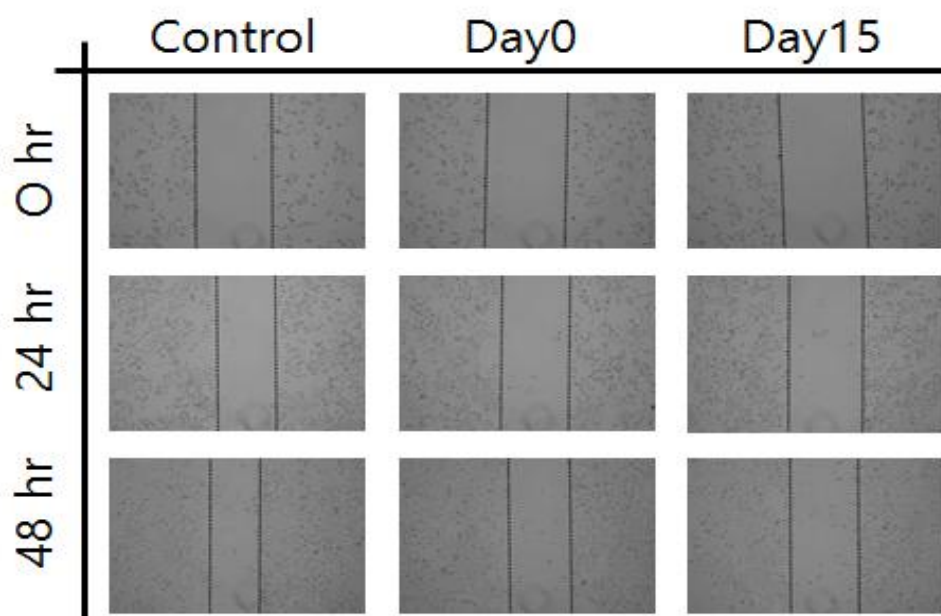


Figure 12. Effects of CK-MOX treatment on the migration of T24 cells. Values are means \pm SD of three independent experiments; *, indicate significant differences between samples determined by T-test ($p < 0.05$).

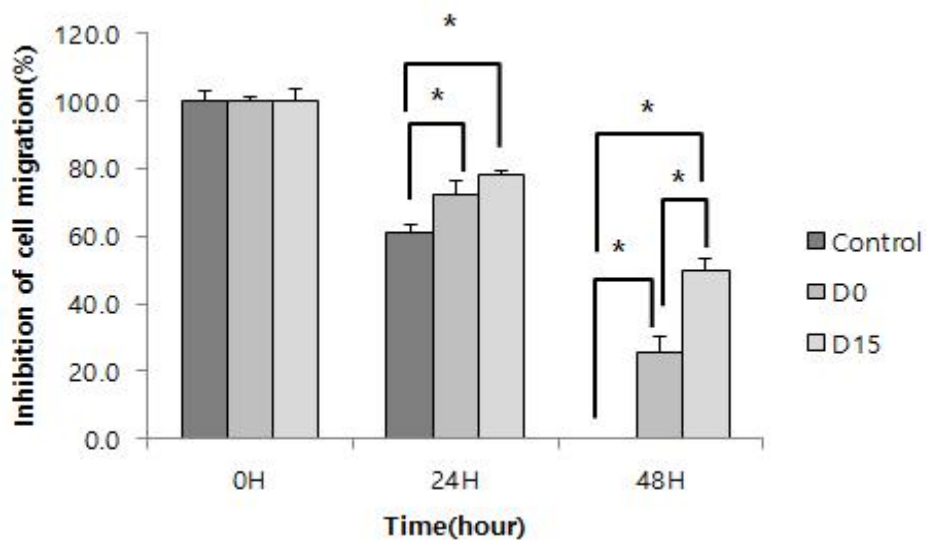
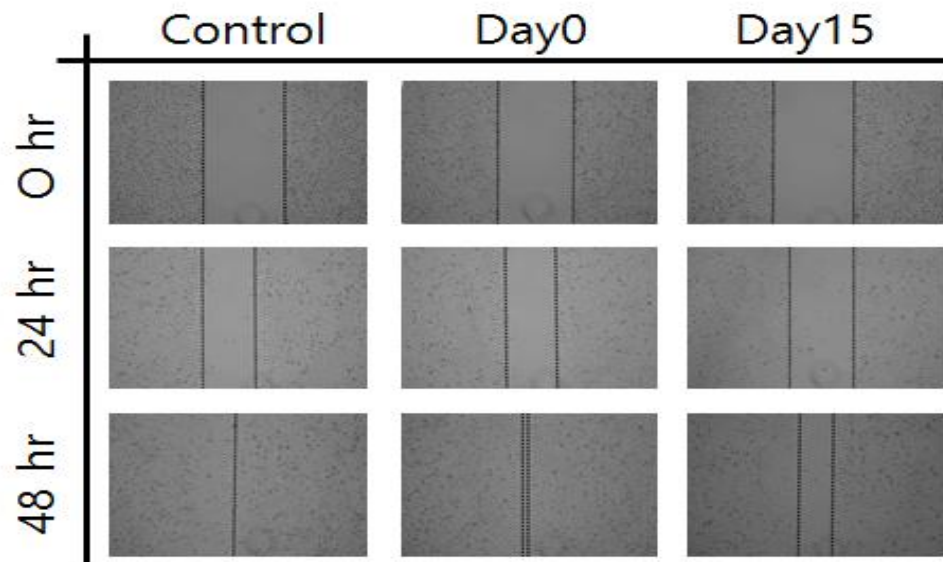


Figure 13. Effects of CK-MOX treatment on the migration of 5637 cells. Values are means \pm SD of three independent experiments; *, indicate significant differences between samples determined by T-test ($p < 0.05$).

(5) Annexin V 측정 (FACS analysis)

Annexin V는 apoptosis가 진행되고 있는 세포의 세포막에 결합한다. apoptosis가 진행되면 세포막 안쪽의 phosphatidyl serin이 세포막 외부로 노출하게 되는데 이때 phosphatidyl serin과 annexin V가 결합하는 원리이다.

CK-MOX 처리에 의한 apoptosis에 의한 세포 사멸율은 Figure 14에 나타내었다. 대조군과 CK-MOX Day 0 처리 군과의 유의적인 차이는 없었으나 발효 후 시료 (CK-MOX Day 15) 처리 군에서 유의적으로 apoptotic cell의 비율이 늘어나는 것으로 관찰 되었다.

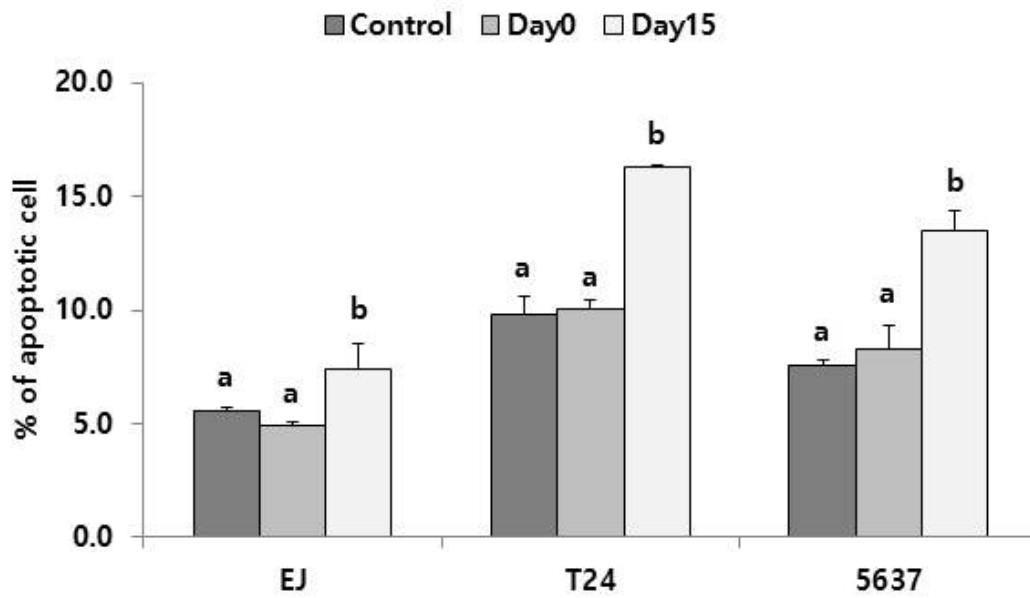


Figure 14. CK-MOX-induced apoptosis of bladder cancer cells as annexin V staining assay using flow cytometry. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(6) CK-MOX 처리에 따른 방광암 세포의 phospho-ERK 발현 측정(Western immunoblot assay)

western immunoblot은 항원-항체 반응을 통해 특정 단백질의 발현 여부를 확인하는 실험이다. 본 실험을 통해 CK-MOX에 의한 방광암 세포 사멸 (apoptosis) 에 phospho-ERK의 발현이 어떻게 변화하는지 관찰하고자 하였다.

EJ, T24, 5637세포에 각각 10 mg/mL 농도의 CK-MOX 발효 전 (Day 0) 시료와 발효 후 (Day 15) 시료를 처리한 뒤 24시간, 48시간 배양하여 p-ERK의 발현 정도를 측정하였다.

그 결과 세 가지 세포주 모두에서 발효 후 시료 10 mg/mL의 농도로 48시간 처리할 경우 p-ERK level이 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 15).

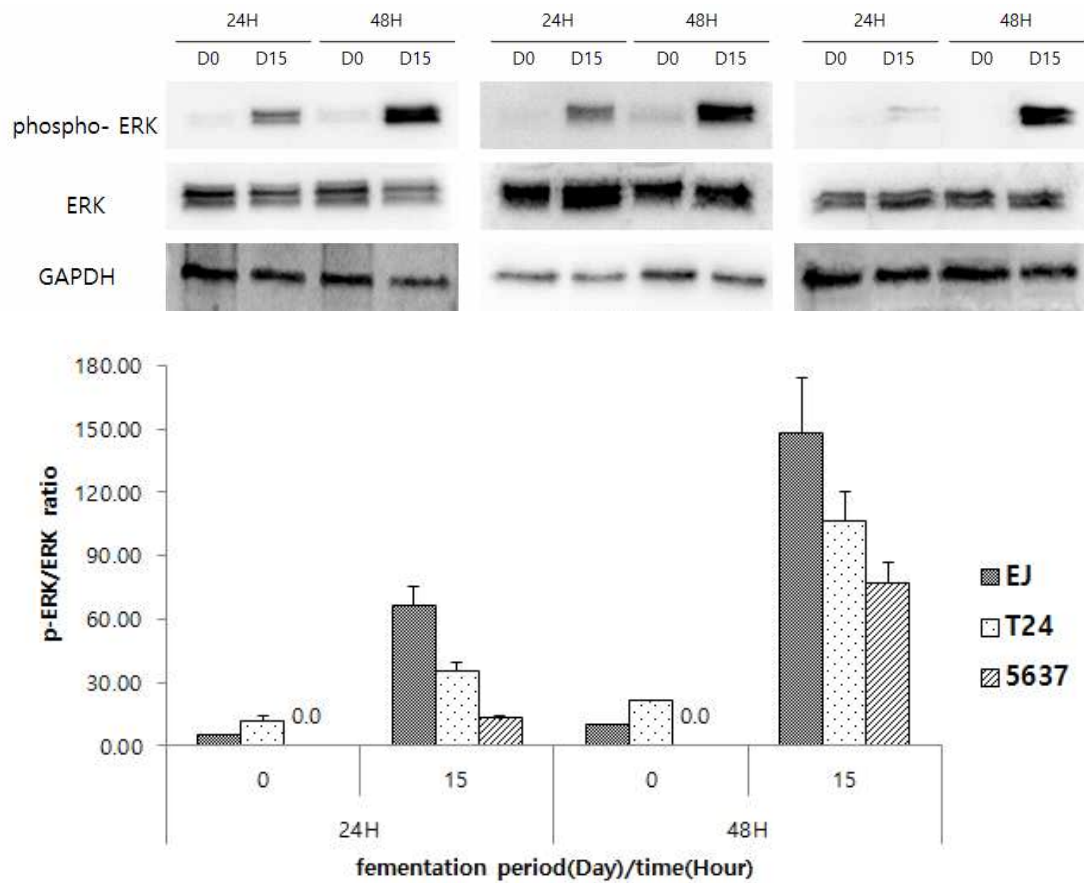


Figure 15. Effect of CK-MOX on phospholylation of ERK protein expression in EJ, T24, and 5637 cells. Values are means \pm SD of three independent experiments.

(7) U0126 처리와 세포 생존율의 변화

현재까지 결과를 종합해 볼 때 CK-MOX 발효 후(Day15)시료의 처리는 p-ERK 발현 증가에 의한 방광암 세포주 EJ, T24, 5637의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이번 실험에서는 MEK1/2를 억제하는 U0126의 처리를 통해 p-ERK level의 증가가 방광암 세포 생존률 저하에 원인인지 결과인지 확인하고자 하였다.

MTT assay를 이용한 세포 생존률 측정 결과 (Figure 16) 대조군과 비교하여 CK-MOX Day 0, Day15 처리 군에서 유의적으로 세포 사멸이 증가하였고, U0126를 CK-MOX와 동시 처리하여 p-ERK 발현을 억제하였을 때 Day 0 처리 군에서는 유의한 변화가 없었으나 Day15 처리 군에서는 유의하게 세포 생존률이 증가하는 것으로 나타나 U0126에 의한 p-ERK level 억제가 세포 생존과 관련성이 있음을 보였다.

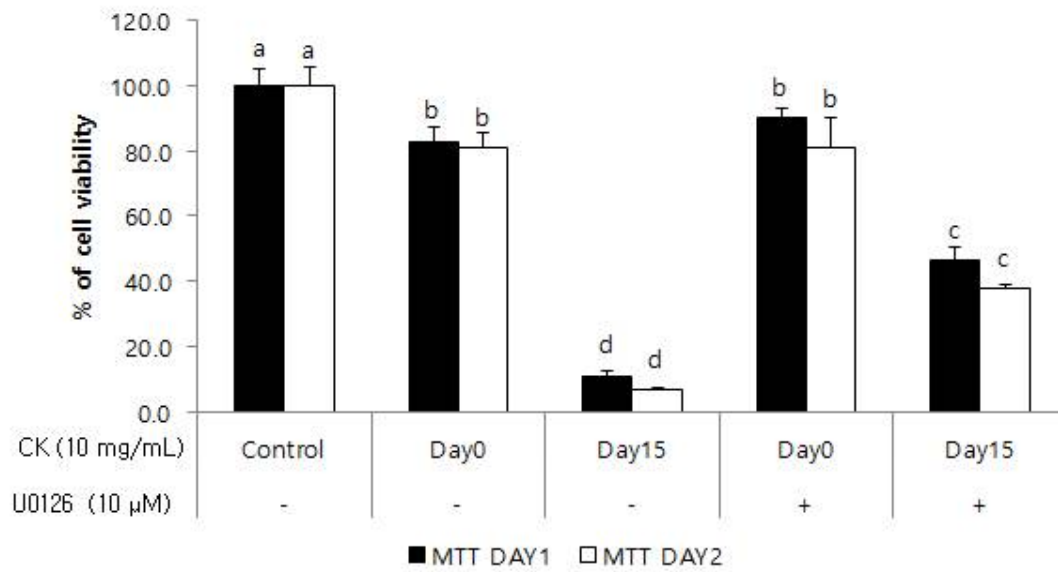


Figure 16. Effect of CK-MOX and U0126 on viability of EJ cells. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(8) U0126 처리와 p-ERK level의 변화

MEK 1/2 억제제 U0126의 처리가 실제 p-ERK 발현을 감소시키는지 western immunoblot을 통해 확인하였다.

그 결과는 Figure 17에 제시하였다. 10 μ M의 U0126의 처리는 p-ERK 수준을 농도 의존적으로 낮추었고, Day 0 처리 군에서 p-ERK은 약간 감소하는 것으로 나타났으나, Day 15 처리 군에서는 크게 증가 하였다. U0126를 CK-MOX 시료와 동시 처리하였을 경우, Day0 처리 군에선 변화가 없었으나 Day 15 처리 군에서 p-ERK level이 상승 하는 것으로 나타났다.

결과적으로 p-ERK level의 상승은 방광암 세포주 EJ의 세포사멸과 연관이 있음을 확인하였다.

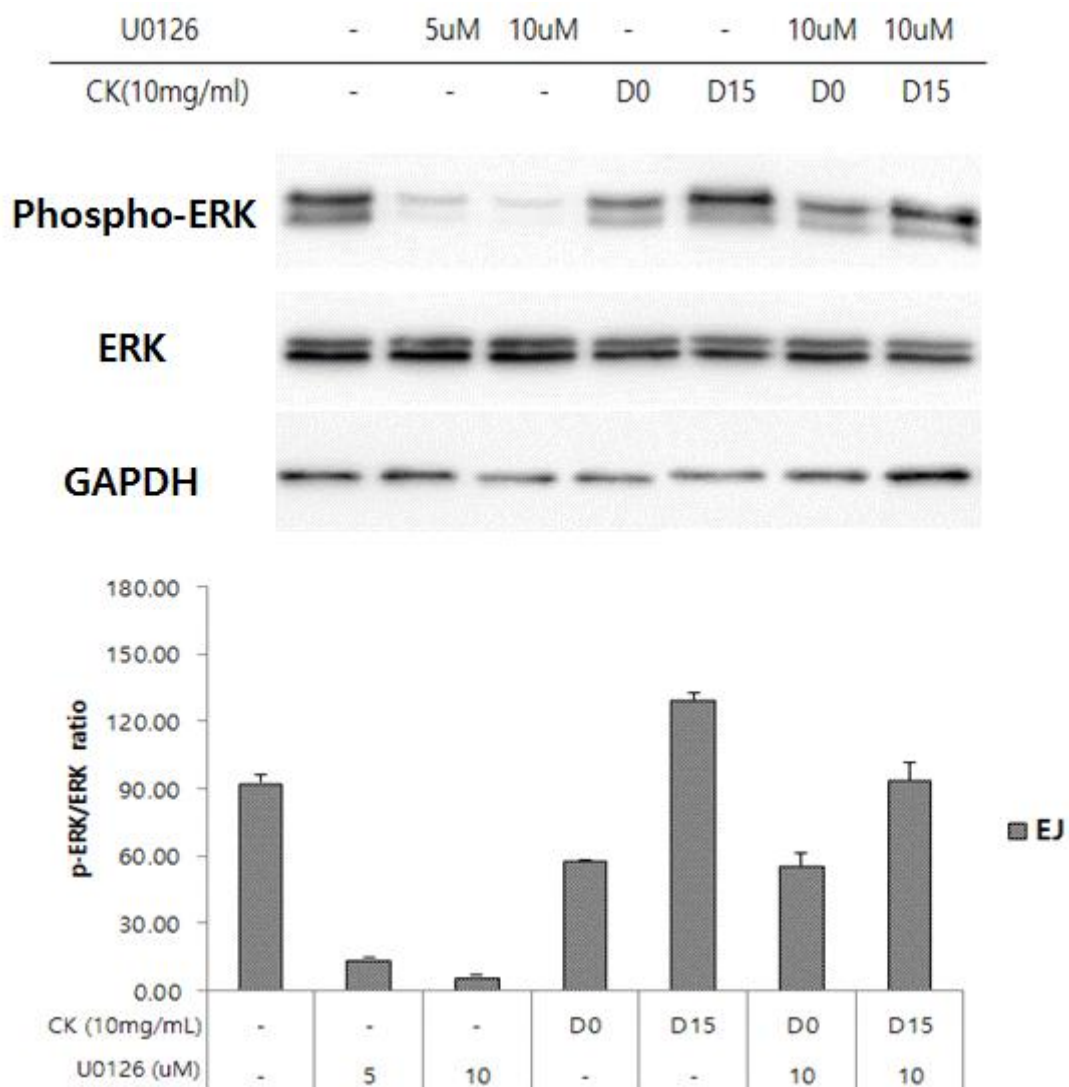


Figure 17. Effect of CK-MOX and U0126 on phosphorylation of ERK protein expression in EJ cells. Values are means \pm SD of three independent experiments.

V. 고 찰

콤부차(Kombucha, K)는 중국 진나라 기원의 초산균과 효모 공생군체에 의한 발효 음료로 산화적 스트레스에 대한 간 보호효과, 항당뇨 및 항암효과를 갖는다. 감귤은 플라보노이드가 풍부하며, 종양유전자의 활성 저해, 노화억제, 지방간 억제 등의 기능이 알려져 있다. 김청이 등[99]은 감귤액을 첨가한 감귤 콤부차(Citrus Kombucha, CK)의 천연물 소재 유래 발효음료의 건강 기능성 소재로서의 가치를 확인 하였는데 CK는 K와 비교하여 항산화 능력과 방광암 세포주(T24, 5637 세포)에 대한 성장 억제 효과 크며, 특히, CK를 처리한 T-24 세포에서 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현 감소와 pro-apoptotic protein인 cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3 및 cleaved PARP의 증가에 따른 apoptosis가 유도 되는 것으로 나타났다. 그러나 규정되지 않은 균종을 이용한 전통적인 방법으로 생산 된 CK는 품질 유지에 한계가 있다. 이에 본 연구는 감귤 콤부차의 산업화를 위한 발효 균주 표준화를 위하여 콤부차에서 분리 된 3가지 균주를 이용한 감귤 발효액(CK-MOX)의 전통적인 방법으로 배양한 감귤 콤부차(CK-Ori)와의 이화학적 특성을 비교하고, 표준화 된 감귤 발효액(CK-MOX)의 기능적 특성을 탐색하고자 하였다.

발효기간에 따른 이화학적 특성 변화를 비교하기 위하여 감귤과 녹차 혼합액에 당을 첨가 한 뒤 반으로 나누어 각각 전통적 배양균과 콤부차 유래 3종 균주를 접종하여 15일간 발효하였으며, 매 3일마다 샘플링을 실시하였다. CK-MOX 발효에 사용 된 균주는 본래(本來)의 콤부차 pellicle 과 broth내의 미생물 동정 결과 97%를 차지했던, *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*이며, *Ga. xylinus*는 배양액 윗부분에 떠오르는 불투명한 cellulose 막을 형성한다고 알려져 있다[99]. *Ga medellinensis*는 *Ga. xylinus*와 함께 *Ga. xylinus*속에 속하며, 유전자 형에 따라 *Ga. xylinus*와 같이 cellulose를 형성하기도 하나 본 실험에서는 cellulose non-producing *Ga medellinensis*를 사용하였다[100]. *G oxydans*의 경우 발효 과정에서 비타민 C 합성에 사용 되는 전구물질인 L-sobose를 생성을 하는 것으로 알려져 있다[100].

발효에 따라 CK-Ori와 CK-MOX의 pH와 총 당의 함량은 유의적으로 감소하였고, 산도는 유의적으로 증가하였다. 일반적으로 초산 발효는 당이 혐기적 조건에서 알코올로 변하고, 다시 알코올이 호기적 조건에서 산으로 변형되는 과정을 거쳐 이루어진다[101]. 이에 반해 콤부차는 호기적 조건에서 발효를 시작하며, 발효 약 3일 쯤 배양액 윗부분에 불투명한 셀룰로오즈 막이 형성되어 발효조 내부를 반 혐기 상태로 유지하는 것이 특징이다. 콤부차는 acetic, gluconic, glucuronic, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic, usnic acid 등의 유기산이 발효에 의해 생성된다고 알려져 있으며, 산도의 변화는 유기산 증가에 따른 것으로 보인다. 총 당과, PH의 감소는 콤부차 발효가 잘 진행되었음을 보여준다. CK-Ori의 경우 환원당이 발효 기간이 지남에 따라 유의적으로 증가하였으며, CK-MOX의 환원당량은 유의적인 변화는 있었으나 발효 기간과의 연관성은 보이지 않았다. 이는 균주의 성장에 따른 당 이용의 차이에 따른 것으로 추측되는데, 안용근[102]은 동아를 첨가한 홍삼식초 제조 시 총 당과 환원당의 변화 경향은 일치하지 않으며, 발효 완료시에는 발효 초기에 비해 환원당의 함량이 증가하였는데, 발효 초기에는 균주가 당류를 왕성하게 이용하면서 함량이 일시적으로 감소하기 때문이라 보고한 바 있다.

발효 기간에 따라 CK-Ori, CK-MOX 모두 DPPH, ABTS 라디칼 소거능은 증가하는 것으로 나타났으나 같은 원리를 이용한 실험이었음에도 불구하고 두가지 실험에서 CK의 라디칼 소거능 패턴은 다르게 나타났다. 이는 즉시 사용할 수 있는 DPPH 라디칼과 달리 ABTS는 효소 (peroxidase, myoglobin) 또는 화학 물질 (이산화망간, 과황산칼륨, ABAP)등에 의해 라디칼을 생성하여 사용하여야 하며, 반드시 유기 용매를 사용하여야 하는 DPPH와는 달리 ABTS는 물과 유기용매를 모두 사용할 수 있기 때문에 hydrophilic 또는 lipophilic 시료의 자유 라디칼 소거 능력을 측정할 수 있다는 차이[91]에서 나온 결과물로 보여진다.

CK-Ori의 총 페놀 함량은 발효 기간에 따라 유의적으로 증가하였으나, CK-MOX는 유의적으로 감소하는 것으로 나타나 두 시료 간 차이를 보였다.

서로 다른 기원의 콤부차를 동일한 조건으로 배양한 결과 서로 다른 항산화 능력을 갖고 있으며 발효 기간에 따라 항산화 효과가 다르다고 보고[13]와 식초의 경우 초산 발효과정에서 강력한 페놀 분해 및 변형으로 인해 폴리페놀 함량이 감소한다는 보고[103], pH에 의해 페놀산 중 카테킨류가 분해 된다는 결과도 있

었으나[104] 녹차의 카테킨의 경우 낮은 pH에서 안정적이며[105], 녹차, 홍차, 차 폐기물을 이용해 만든 콤부차의 발효과정에 phenolic compound와 reducing power의 증가를 통해 kombucha 발효에 따라 free radical scavenging 능력이 향상 된다는 보고[43]도 있었다. 또 콤부차 발효 기간 동안 폴리페놀 조성의 변화가 일어나는 것으로 나타나[42] 이를 토대로 볼 때 발효에 의한 pH 변화와 starter의 차이가 총 폴리페놀의 함량과 조성변화에 영향을 미쳤을 것이라 생각 된다.

NO는 생체 내의 혈관 확장, 신경전달, 면역반응 등의 생리적인 기능을 조절하는 역할을 담당하지만 과발현 된 NO는 염증반응을 높이고, 세포와 조직에 손상을 일으켜 만성 염증을 일으키게 된다[76]. LPS로 유도한 RAW264.7 대식세포에 독성을 보이지 않았던 농도로 발효 기간별 샘플링 하였던 CK-MOX를 처리한 결과 발효 전(Day0)시료와 비교하여 발효 후 (Day 15) 시료는 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 NO의 형성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으며, LPS 단독 처리 군과 비교 하여 15일간 발효한 시료 (Day 15) 처리 군에서 염증 관련 인자로 알려진 TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 양이 감소하는 것으로 나타났다. TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)는 내인성 발열 유전자로 발열, 세포 사멸, 악액질, 염증을 유도하고 종양 형성 및 바이러스 복제를 억제할 뿐 아니라 IL-1 (Interleukin-1) 및 IL-6 (Interlukin) 생산에 관여하는 것으로 알려져 있다 [106]. IL-1 β 는 interleukin 1 family에 속하며, 세포 증식, 분화 및 세포 사멸을 포함하는 다양한 세포 활동에 관여한다[107]. 따라서 TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 양의 감소는 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 염증을 완화하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 Real-time PCR을 이용하여 mRNA 수준에서 염증성 사이토카인의 발현 정도를 측정하였으나 정확한 결과를 위해 추후의 연구에서 단백질 수준에서 염증성 사이토카인의 발현을 확인해야 할 것으로 생각된다.

방광암 세포주 EJ, T24, 5637의 세포 생존율은 CK-MOX 처리에 농도 의존적으로 낮아졌으며, 발효 전 (Day 0)과 비교하여 발효 후 (Day 15) 시료는 방광암 세포주 EJ, T24 5637 cells의 이동성을 각각 69, 81, 49% 억제하는 것으로 나타났다. Apoptosis 유래 Annexin V 실험결과 발효 후 (Day 15) 시료처리 군은 발효 전 (Day 0) 시료 처리 군과 비교하여 apoptosis로 인한 세포의 사멸률이 더 높게 나타났으며, 15일간 발효한 시료의 처리는 방광암 세포주 (EJ, T24, 5637

세포) 의 p-ERK level을 증가시키는 것으로 나타났다. p-ERK에 의한 세포 사멸은 MEK1/2 inhibitor인 U0126를 처리 했을 때 감소하는 것으로 보아 콤부차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액 (CK-MOX) 의 방광암 세포 사멸에 p-ERK가 깊이 관여함을 알 수 있다.

본 연구 결과 콤부차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액 (CK-MOX) 은 높은 항산화능력과 항염증 효과 및 EJ, T24, 5637 방광암 세포의 p-ERK 수준을 상향 조절 함으로서 성장 억제력을 갖는 것으로 나타나 콤부차 유래 3종 균주를 이용한 감귤 발효액의 기능성 음료로서의 개발 가능성을 확인 하였다.

VI. 요약 및 결론

본 연구는 감귤 콤부차의 산업화를 위한 발효 균주 표준화를 위하여 콤부차에서 분리된 3가지 균주를 이용한 감귤 발효액 (CK-MOX)의 전통적인 방법으로 배양한 감귤 콤부차 (CK-Ori)와의 이화학적 특성을 비교하고, 표준화 된 감귤 발효액 (CK-MOX)의 기능적 특성을 탐색하고자 하였다.

발효기간에 따른 이화학적 특성 변화를 비교하기 위하여 감귤과 녹차 혼합액에 당을 첨가 한 뒤 콤부차 유래 3종 균주를 접종하여 15일간 발효하였으며, 매 3일마다 샘플링을 실시하였다. CK-MOX 발효에 사용 된 균주는 본래 (本來)의 콤부차 pellicle 과 broth내의 미생물 동정 결과 97%를 차지했던, *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*을 KCCM에서 분양 받아 이용하였다.

1. CK-Ori와 CK-MOX는 발효기간이 지남에 따라 pH는 감소하였고, 산도는 증가하였다. 콤부차는 acetic, gluconic, glucuronic, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic, usnic acid 등의 유기산이 발효에 의해 생성된다고 알려져 있으며, pH와 산도의 변화는 유기산 증가에 따른 것으로 보인다.
2. 총 당의 함량은 3일 째 급격하게 감소하였으며 이 후 발효 기간에 따라 유의적으로 감소하였다. 환원당은 변화가 있었으나 발효기간과의 연관성은 없었다.
3. DPPH, ABTS 라티칼 소거능 ORAC assay를 통한 항산화 능력 측정 결과 발효에 따라 항산화 능력이 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 CK-MOX의 Total phenol contents는 미량 감소 (0.181~0.135 mg tannic acid/mL) 하였다.
4. LPS-induced RAW264.7 Macrophages에 기간별 감귤 발효액을 5 mg/mL의 농도로 처리한 결과 세포 독성은 나타나지 않았으며, 발효 전 (Day 0) 시료와 비교하여 발효 후 (Day15) 시료는 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 NO

의 형성을 억제 (53.86~27.33 uM NO₂)하였다.

6. Real-time PCR을 통한 염증성 cytokine 측정 결과 15일간 발효한 시료 (Day 15) 처리 군에서 염증관여 인자로 알려진 TNF- α , IL-1 β 의 생성량이 감소하여 CK-MOX가 염증완화에 효과가 있는 것으로 나타났다.
7. 방광암 세포주의 생존율은 감귤발효액 처리에 농도 의존적으로 낮아졌으며, 발효 전 (Day 0) 과 비교하여 발효 후 (Day 15) 시료는 방광암 세포주 EJ, 5637 cells의 이동성을 각각 69, 49% 억제하는 것으로 나타났다.
8. Apoptosis 유래 Annexin V 실험결과를 보면 발효 후 (Day 15) 시료는 발효 전 (Day 0) 시료와 비교하여 apoptosis로 인한 세포의 사멸률이 더 높게 나타났다.
9. 15일간 발효 한 시료의 처리는 방광암 세포주 (EJ, T24, 5637 세포) 의 p-ERK level을 증가시켰다.
10. p-ERK에 의한 세포 사멸은 MEK1/2 inhibitor인 U0126를 처리 했을 때 감소하는 것으로 보아 콤투차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액의 방광암 세포 사멸에 p-ERK가 원인으로서 작용함을 알 수 있다.

본 연구 결과 콤투차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액 (CK-MOX) 은 높은 항산화능력과 항염증 효과 및 EJ, T24, 5637 방광암 세포의 p-ERK 수준을 상향 조절 함으로서 성장 억제력을 갖는 것으로 나타나 콤투차 유래 3종 균주를 이용한 감귤 발효액의 기능성 음료로서의 개발 가능성을 확인 하였다.

VII. 참 고 문 헌

1. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(4):538–50.
2. Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*. 2000;33(6):409–21.
3. Bauer Petrovska B, Petrushevska Tozi L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International journal of food science & technology*. 2000;35(2):201–5.
4. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International journal of food microbiology*. 2016;220:63–72.
5. Pokalwar S, Mishra M, Manwar A. Production of Cellulose by *Gluconacetobacter* sp. *Recent Research in Science and Technology*. 2010;2(7).
6. Castro C, Cleenwerck I, Trček J, Zuluaga R, De Vos P, Caro G, et al. *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013;63(3):1119–25.
7. Banerjee D, Hassarajani SA, Maity B, Narayan G, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. *Food & function*. 2010;1(3):284–93.
8. Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E. Antimicrobial effect of kombucha analogues. *LWT—Food Science and Technology*. 2012;47(1):71–7.

9. Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A, Ammar E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*. 2013;37(2):231-6.
10. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology ISP*. 2011;18(3):221-34.
11. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*. 2013;60:328-40.
12. Četojević-Simin DD, Velićanski AS, Cvetković DD, Markov SL, Mrđanović JŽ, Bogdanović VV, et al. Bioactivity of lemon balm kombucha. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(5):1756-65.
13. Chu S-C, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 2006;98(3):502-7.
14. Gharib OA. Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. *Chinese medicine*. 2009;4(1):1.
15. Jayabalan R, Chen P-N, Hsieh Y-S, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells--Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011;10(1):75-82.
16. Murugesan G, Sathishkumar M, Jayabalan R, Binupriya A, Swaminathan K, Yun S. Hepatoprotective and curative properties of Kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(4):397-402.
17. Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(6):2589-94.

18. Srihari T, Arunkumar R, Arunakaran J, Satyanarayana U. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2013;3(1):53-8.
19. Xiao-qing Z, Yi-lun C, Ya-wei Z, Xuan L. The Changes of Antioxidant Capability of Kombucha Tea During Fermentation. *Food and Fermentation Industries*. 2010;11:034.
20. Yang, Z. W., Ji, B. P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009;89(1):150-156.
21. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*. 2007;104(2):466-79.
22. Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouseff RL. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1996;60(1):34-40.
23. Bok S-H, Lee S-H, Park Y-B, Bae K-H, Son K-H, Jeong T-S, et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *The Journal of nutrition*. 1999;129(6):1182-5.
24. Chen Z, Li J, Jiang J, Yan M, He B. Effect of pure total flavonoids from citrus on hepatic SIRT1/PGC-1 α pathway in mice with NASH. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. 2014;39(1):100-5.
25. Hirata T, Fujii M, Akita K, Yanaka N, Ogawa K, Kuroyanagi M, et al. Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009;17(1):25-8.

26. Miller JA, Thompson PA, Hakim IA, Chow H-HS, Thomson CA. d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*. 2011;5(1):31-42.
27. Nagy S. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980;28(1):8-18.
28. Nordby HE, Nagy S. Comparative citrus fatty acid profiles of triglycerides, monogalactosyl diglycerides, steryl esters and esterified steryl glucosides. *Lipids*. 1971;6(8):554-61.
29. Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2002;11(1):79-84.
30. Whang H-J, Yoon K-R. Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1995;27(6):950-7.
31. Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(6):2009-14.
32. Devasagayam T, Tilak J, Bolor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*. 2004;52(794804):4.
33. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997;82(2):291-5.
34. Valle I, Álvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*. 2005;66(3):562-73.
35. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*. 2006;49(3):466-77.
36. Health UDo, Services H. The health consequences of smoking: a report of

- the Surgeon General. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2004;62.
37. Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Prevention of bladder cancer: a review. *European urology*. 2006;49(2):226-34.
 38. 이지혜, 엄영란, 심기석, 전원경, 이재훈, 마진열. 마우스를 이용한 발효쌍화탕의 급성독성 실험. *대한한방내과학회지*. 2009;30(4).
 39. Nykänen L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1986;37(1):84-96.
 40. Savaiano DA, AbouElAnouar A, Smith DE, Levitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *The American journal of clinical nutrition*. 1984;40(6):1219-23.
 41. 최미애, 김정옥, 최경호. 배양액 제조에 사용된 당의 종류와 농도 및 배양 온도가 Tea Fungus 발효 홍차의 pH 변화와 Total Acids 생성에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 1996;28(3):405-10.
 42. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007;102(1):392-8.
 43. Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*. 2008;109(1):227-34.
 44. Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. *Nutrition Reviews*. 2000;58(1):1-10.
 45. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*. 2006;25(2):79-99.
 46. Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral

- Consumption of Green Tea Polyphenols Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I - Induced Signaling in an Autochthonous Mouse Model of Prostate Cancer. *Cancer research*. 2004;64(23):8715-22.
47. Bushman JL. Green tea and cancer in humans: a review of the literature. *Nutrition and cancer*. 1998;31(3):151-9.
48. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive medicine*. 1992;21(3):334-50.
49. Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*. 1997;387(6633):561.
50. Ju J, Hong J, Zhou J-n, Pan Z, Bose M, Liao J, et al. Inhibition of intestinal tumorigenesis in *Apcmin/+* mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer research*. 2005;65(22):10623-31.
51. Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Mehta R, Bagheri D, et al. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis*. 2000;21(1):63-7.
52. Messing E, Hanson P, Ulrich P, Erturk E. Epidermal growth factor--interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *The Journal of urology*. 1987;138(5):1329-35.
53. Xiang L-P, Wang A, Ye J-H, Zheng X-Q, Polito CA, Lu J-L, et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients*. 2016;8(8):458.
54. 김철웅, 송은. 감귤분말 첨가량에 따른 인절미의 품질 특성. *韓國食品營養學會誌*. 2009;22(2):293-301.
55. 김창명. 제주 감귤 산업의 발전 전략. *식품저장과학*. 2006;5(2):2-11.
56. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual review of Nutrition*. 1992;12(1):139-59.
57. 김영용. 감귤의 기능성 성분과 건강증진 효과. *論文集*. 2003;32(-):197-225.

58. 문상욱, 강신해, 진영준, 박지권, 이영돈, 이영기, 김세재. 감귤의 발효와 발효 산물의 기능적 특성. 한국식품과학회지. 2004;36(4):669-76.
59. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. Medicinal research reviews. 2003;23(4):519-34.
60. 최영훈, 이영재, 이선이, 채치원, 박석만, 김상숙, 안현주, 한창훈, 홍현주. 당유자 유래 Flavonoids 농축액이 첨가된 감귤 음료의 쥐 비만 및 혈중 지질에 미치는 영향. 원예과학기술지. 2012;30(2):214-9.
61. Morand C, Dubray C, Milenkovic D, Lioger D, Martin JF, Scalbert A, et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. The American journal of clinical nutrition. 2011;93(1):73-80.
62. Jung UJ, Choi M-S. Beneficial Effect of Naringin on Glucose Regulation in Type 1 Diabetic Mice. Journal of Agriculture & Life Science Vol.49(3):133-43.
63. Miyazawa K, Miyamoto S, Suzuki R, Yasui Y, Ikeda R, Kohno H, et al. Dietary β -cryptoxanthin inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. Oncology reports. 2007;17(2):297-304.
64. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2012;43:385-406.
65. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation and pain. International anesthesiology clinics. 2007;45(2):27.
66. Gan WQ, Man S, Senthilselvan A, Sin D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. Thorax. 2004;59(7):574-80.
67. 송무식, 조동희, 전귀옥, 박미연, 최해윤, 김종대. 定喘化痰降氣湯이 Xylene 으로 유발된 마우스의 급성 염증에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):875-81.
68. Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E,

- Salles J, et al. Chemokine expression in inflamed adipose tissue is mainly mediated by NF- κ B. *PLoS One*. 2013;8(6):e66515.
69. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas, Krisztina, Casal, Enriqueta, Cappello, Francesco, Carvalho, Joana. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4.
70. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(4):403-11.
71. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
72. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
73. Lieb K, Engels S, Fiebich BL. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochemistry international*. 2003;42(2):131-7.
74. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30(3):377-86.
75. Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(11):5768-72.
76. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans role of oxidative stress. *Circulation*. 2002;106(16):2067-72.
77. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune

- and inflammatory disease. *Current opinion in drug discovery & development*. 2001;4(5):635-50.
78. Se Young C, In Ho C. 비근침윤성 방광암의 재발과 진행을 예측하는 임상, 병리적 예후 인자. *The Korean Journal of Urological Oncology*. 2015;13(1):1-10.
79. Piyathilake C. Dietary factors associated with bladder cancer. *Investigative and Clinical Urology*. 2016;57(Suppl 1):S14-S25.
80. Larsson SC, Andersson S-O, Johansson J-E, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008;17(9):2519-22.
81. Jacobs EJ, Henion AK, Briggs PJ, Connell CJ, McCullough ML, Jonas CR, et al. Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women. *American journal of epidemiology*. 2002;156(11):1002-10.
82. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochemical Journal*. 2005;392(2):249-61.
83. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011;75(1):50-83.
84. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research*. 2000;56:127-55.
85. 정남혁, 조윤희, 구송이, 정용진, 권중호. 한국, 중국, 일본 시판 천연발효 쌀 식초의 이화학적 품질 및 항산화 활성. *한국식품영양과학회 학술대회발표집*. 2015:276.
86. 김지영, 이영현. 팽화차조 첨가에 따른 조 막걸리의 양조 중 pH, 산도, 색도, 아미노산, 환원당, 총당 및 알코올 함량 변화. *한국식품과학회지*. 2010;42(6):727-32.

87. Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*. 1960;1(2):127-32.
88. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2004;26(2):211-9.
89. 최인영, 송영주, 이왕휴. 주요 허브 추출물의 항산화성 및 항균활성. *원예과학기술지*. 2010;28(5):871-6.
90. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999;26(9):1231-7.
91. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(11):419-21.
92. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(10):4290-302.
93. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*. 1994;11:41-66.
94. Zou J-G, Wang Z-R, Huang Y-Z, Cao K-J, Wu JM. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *International journal of molecular medicine*. 2003;11(3):317-20.
95. 김성환, 김영목. ORAC Assay 에 의한 인삼의 항산화 활성 연구. *동아시아식생활학회지*. 2007;17(3):393-401.
96. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(10):4619-26.
97. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001:A3. B. 1-A3. B. .

98. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
99. 김청이, 신승식, 박성수. 감귤 콤부차 발효액의 인체 방광암세포에 대한 성장 억제와 Apoptosis에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 2016;45(10):1422-9.
100. Feng S, Sun C, Zhang Z, Zhu K, Zhang H, Gao Y. Effects of *Bacillus megaterium* on growth and 2KGA synthesizing of *Gluconobacter oxydans* in vitamin C two-step fermentation process. *Wei sheng wu xue za zhi*. 1997;18(1):6-9.
101. 최명효, 심혜진, 김경화, 강민정, 서원택, 신정혜. 흑마늘 첨가 형태에 따른 식초의 품질특성. *농업생명과학연구*. 2016;50(4):179-90.
102. 안용근. 동아홍삼식초에 관한 연구-2. *한국식품영양학회지*. 2001;14(3):239-44.
103. Andlauer W, Stumpf C, Fürst P. Influence of the acetification process on phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(8):3533-6.
104. Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(6):2101-10.
105. 박영현, 원은경, 손동주. 원보: 녹차 카테킨류의 pH 에 대한 안정성 연구. *한국식품위생안전성학회지*. 2002;17(3):117-23.
106. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *TNF Pathophysiology*. 11: Karger Publishers; 2010. p. 1-26.
107. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(2):103-10.
108. TuS, BhagatG. Overexpression of interleukin 1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid derived suppressor cells in mice. *cancer cell*. 2008;14(6):408.

<국문초록>

콤부차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액의 기능성 연구

高 慧 明

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 朴 晟 秀

콤부차는 약간 달고, 신맛이 나는 발효 음료로 높은 항산화 능력, 산화적 스트레스에 대한 간 보호 효과, 항 당뇨 및 항암효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 본 연구에서는 콤부차 유래 3가지 균주를 이용하여 발효시킨 감귤 발효액(CK-MOX)의 항산화 능력 평가, 방광암 세포주에 대한 항암성 확인 및 LPS를 처리한 RAW264.7대식세포에 대한 항염성 효과를 알아보려고 하였다.

전통적인 방법으로 배양 된 콤부차에서 분리한 3가지 균주를 감귤 농축액과 녹차추출물 혼합액에 접종하여 15일간 발효하며, 매 3일마다 샘플링을 실시하였다. 발효 기간에 따른 이화학적 특성 변화를 살펴보기 위하여 pH, 산도, 총 당 및 환원당을 측정하였으며, 발효 기간이 지남에 따라 pH와 총 당의 함량은 발효 전 (Day 0)과 비교하여 발효 후(Day15) 유의적으로 감소하였고, 산도는 유의적으로 증가하였다.

항산화 능력 평가를 위해 DPPH, ABTS radical scavenging assay, Folin-Denis assay 및 ORAC assay를 실시하였다. 그 결과 발효 기간이 지남에 따라 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 ORAC 측정 결과는 발효 전과 비교하여 유의적으로 증가하였으며, 총 폴리페놀 함량은 미량 감소하였다.

LPS로 유도한 RAW264.7 대식세포의 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Nitric oxide (NO) 생성량을 측정한 결과 CK-MOX의 처리는 NO 형성을 약 50% 억제하는 것으로 나타났으며, LPS 단독 처리 군과 비교하여 15일간 발효한 시료(Day15) 처리 군에서 염증관여 인자로 알려진 TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

세 개의 방광암 세포주(EJ, T24, 5637 cells)에 대한 세포 성장 억제능력은 MTT, Annexin V assay, 이동성 변화, western immunoblot으로 측정하였다. 방광암 세포주의 생존율은 CK-MOX 처리에 농도 의존적으로 낮아졌으며, 발효 전

(Day0)과 비교하여 발효 후(Day15) 시료는 EJ와 5637 세포의 이동성을 각각 69, 49% 억제하는 것으로 나타났다. Apoptosis 유래 Annexin V 실험결과 발효 후(Day15)시료처리 군은 발효 전(Day0) 시료 처리 군과 비교하여 apoptosis로 인한 세포의 사멸률이 더 높게 나타났으며, 15일간 발효 한 시료의 처리는 방광암 세포주(EJ, T24, 5637 세포)의 p-ERK level을 증가시키는 것으로 나타났다. p-ERK에 의한 세포 사멸은 MEK1/2 inhibitor인 U0126를 처리 했을 때 감소하는 것으로 보아 콤투차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액(CK-MOX)의 방광암 세포 사멸에 p-ERK가 깊이 관여함을 알 수 있다.

본 연구 결과 콤투차 대표 균주 3종을 이용한 감귤 발효액(CK-MOX)은 높은 항산화능력과 항염증 효과 및 EJ, T24, 5637 방광암 세포의 p-ERK 수준을 상향 조절 함으로서 성장 억제력을 갖는 것으로 나타나 콤투차 유래 3종 균주를 이용한 감귤 발효액의 기능성 음료로서의 개발 가능성을 확인 하였다.