

감귤과 녹차의 추출액으로 제조한 콤부차의 생리 활성 및 일반 세포 독성

— 연구노트 —

신승식 · 고혜명 · 김청이 · 박성수

제주대학교 식품영양학과

Bioactivity and Cytotoxicity of Kombucha Fermented with Extracts from Green Tea and Citrus Peel

Seung-Shick Shin, Hye-Myoung Ko, Chung-I Kim, and Sung-Soo Park

Department of Food Science & Nutrition, Jeju National University

ABSTRACT Kombucha (K) is a fermented beverage made from black tea by symbiotic micro-organisms of bacteria and yeasts. To enhance bio-activities of K, we produced citrus/green tea Kombucha (CK) by adding extracts of citrus peel and green tea obtained from Jeju Island. ORAC assays showed that anti-oxidative capacity of CK increased by approximately 3-folds compared to K. We examined anti-cancer properties of extracts from citrus peel and/or green tea using 5637 human bladder cancer cells and B16F10 murine melanoma cells. Proliferation of B16F10 cells was markedly inhibited at concentrations higher than 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$. At a concentration of 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, anti-cancer activities of extracts were in the order of citrus peel < green tea < combination of both. Interestingly, a combination of both extracts showed a synergistic effect on inhibition of growth of cancer cells. CK fermented with citrus peel and green tea extracts showed enhanced anti-cancer activity compared to K. Cytotoxicity of CK on RAW 264.7 murine macrophages was negligible up to 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Taken together, these results indicate that citrus Kombucha is safe to be developed as a functional beverage.

Key words: citrus Kombucha, ORAC, bladder cancer, melanoma

서 론

콤부차는 국내에서는 홍차버섯으로 알려졌으며, 세균과 효모의 공생균체 발효에 의해 얻어지는 발효 음료로 주로 홍차와 설탕을 주원료로 한다. 콤부차는 고대 중국의 진나라로부터 기원되었고 해독작용과 강장효과가 높아 “신성한 차”로 불렸다고 하며, 이후 서기 414년경에 한국을 거쳐 일본으로 전해졌고 현재는 주로 러시아 지역을 중심으로 “Tea Kvass”라는 이름으로 불리며 많이 음용되고 있다(1). 콤부차의 생리활성 및 공공 보건에 미치는 영향과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 대표적으로 활성산소 생성 억제력을 통한 항산화력(2), 항균성(3), 항암성(4), 상처치료 효과(5), 간 기능 보호(6-8) 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 이 중 콤부차의 항암 활성에 대한 연구를 살펴보면 Jayabalan 등(9)은 콤부차 추출물의 여러 용매 분획물에 대한 항암 활성을 측정된 결과 ethyl acetate 분획물에서 강력한 항암 활성을 관찰하였고, 물질의 정제 및 분리를 통하여 말론산과 vitexin이 유효 성분임을 밝혀낸 바 있다. Srihari 등(4)은

인체 전립선암인 PC-3를 이용하여 콤부차의 항암 활성을 측정하였는데 표적 분자들 중 특히 interleukin 8과 VEGF의 mRNA 발현이 현저히 감소함을 확인한 바 있으며, *in vivo* 신생 혈관 생성에 관여하는 것으로 알려진 matrix metalloproteinases-2와 -9의 활성이 크게 저하됨을 확인하였다.

그러나 콤부차의 다양한 생리활성에도 불구하고 산업계에서의 응용 및 활용도는 현저하게 낮는데, 그 주된 원인은 콤부차의 발효가 미생물의 공생체를 통해 이루어지므로 사용되는 미생물의 정확한 균종 및 분포가 확립되지 않아 발생하는 미생물 안전성 및 발효 산물의 정상 세포에 대한 독성 여부를 들 수 있다. 특히 콤부차의 세포 독성에 관한 연구 결과는 일치되지 않으며, 많은 논란이 있다. 한 예로 미국의 Centers for Disease Control and Prevention(CDC)은 1995년 미국의 Iowa 주에서 콤부차 음용으로부터 발생한 2건의 임상 사례를 보고한 바 있는데 정확한 원인은 파악이 되지 않았으나 콤부차의 낮은 산도에 따른 세포 독성의 가능성을 제시한 바 있고(10), Srinivasan 등(11)은 콤부차를 음용한 후 발생한 환자 4명의 임상 사례를 통하여 콤부차의 독성 가능성을 제시하였으나 이 연구에서도 그의 직접적인 원인은 밝혀지지 않았다. 또 다른 연구들에서는 콤부차의 세포 독성이 없음을 보고하였는데, Bhattacharya 등(12)은

Received 4 August 2016; Accepted 14 October 2016

Corresponding author: Sung-Soo Park, Department of Food Science & Nutrition, Jeju National University, Jeju 63243, Korea
E-mail: foodpark@jejunu.ac.kr, Phone: +82-64-754-3552

실험용 쥐를 이용한 실험에서 kg당 2 mL 혹은 증류수에 1%(v/v)를 첨가한 콤부차를 3개월 동안 먹인 후 장기 독성, 체중 등을 조사한 결과 독성이 없음을 보고한 바 있다. 미국 FDA에서도 콤부차가 GMP(Good Manufacturer's Practice) 과정을 거쳐 생산되면 소비자가 섭취하기에 적합하며 독성이 없다고 확인한 바 있으며(13), 기존에 보고된 세포 독성들도 높은 산도, 과량의 섭취, 비위생적 생산 등과 관련 되었을 수 있다고 보고하였다. 이에 본 연구에서는 콤부차의 산업화, 표준화 및 안전성 확보를 위하여 감귤 및 녹차의 추출액을 함유한 콤부차의 세포 독성을 확인하였고, 이 연구를 통해 콤부차의 대량 생산 및 산업화를 위하여 꼭 확보해야 할 세포 안전성에 관한 데이터를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

콤부차 배양

본 실험에서 사용한 콤부차는 local domestic Kombucha이며, 민간에서 분양하여 판매하는 것을 인터넷으로 구매하여 사용하였다(www.auction.co.kr).

콤부차는 녹차티백(Dongsuh Co., Seoul, Korea) 추출액 900 mL에 설탕 90 g을 교반한 후 전배양을 통해 얻은 배양액 100 mL와 pellicle 20 g을 넣어 30°C 조건으로 10일간 배양하였고, 감귤 콤부차는 콤부차 배양과 동일한 과정에 전배양을 통해 얻은 배양액 100 mL에 녹차 추출액 700 mL, pellicle 20 g, 감귤피(남해상사, Jeju, Korea) 추출액 200 mL에 acetic acid 500 μ L를 첨가하여 콤부차와 동일한 조건에서 배양하였다.

시료처리

일반 콤부차(K)와 감귤/녹차 콤부차(CK)는 원심분리 후 상등액을 사용하였고, 세포실험에는 상등액을 주사기용 필터 유닛(pore size 0.45 μ m, EMD Millipore Inc., Billerica, MA, USA)을 이용하여 여과한 후 RPMI-1640(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 희석하여 사용하였다. 감귤피 추출액은 감귤피 10 g에 200 mL 증류수를 첨가하는 비율로 10분간 열탕 추출하였다. 녹차 추출액은 녹차 티백(1.5 g, 설록원, Jeju, Korea) 한 개에 300 mL의 증류수를 첨가하는 비율로 10분간 열탕 추출하였다. 각 시료는 세포 성장 억제에 필요한 만큼 필터 유닛(0.45 μ m, EMD Millipore Inc.)으로 여과하여 사용하였다.

세포배양

실험에서 사용한 B16F10 마우스 피부악성종양 세포주, 5637 인간 방광암 세포주와 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 RPMI-1640(Sigma-Aldrich Co.) 배지에 10% FBS(Gibco Inc., San Francisco, CA, USA)와 1% penicillin(Gibco Inc.)을 넣고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

ORAC assay

일반 콤부차와 감귤/녹차 콤부차의 ORAC(oxygen radical absorbance capacity) value는 Ou 등(14)의 방법을 응용하여 비교 측정하였다. 본 실험에서 사용한 시료와 표준물질 및 시약은 75 mM phosphate buffer(pH 7.4) 용액에 희석하여 사용하였다. AAPH(150 mM)는 실험 직전에 37°C에서 15분간 incubation 한 다음, 96-well plate에 100 배로 희석된 시료 25 μ L와 fluorescein(40 nM) 120 μ L를 혼합하고 측정 시 AAPH(150 mM) 25 μ L를 첨가하였다. 측정은 fluorescence microplate reader(Spectra Max i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 37°C에서 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.

세포 독성 실험(MTT assay)

감귤/녹차 콤부차(CK) 처리에 따른 B16F10 피부암 세포주, 5637 인간 방광암세포주와 RAW 264.7 마우스 대식세포의 증식 억제 정도를 측정하기 위해 96-well plate에 각 세포주를 3×10^3 /well로 분주하여 배양한 후 CK의 농도를 달리하여 24시간 배양하였다. 그 후 5 μ g/mL MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co.) 시약을 10 μ L씩 처리하여 1시간 반응시키고 배지를 제거한 후 DMSO를 100 μ L씩 분주하여 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군(무처리군)의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

통계처리

본 실험은 독립적으로 3번 이상 반복실험을 하였다. 실험 결과는 통계분석용 프로그램 SPSS Version 18.0 Package Program(IBM, New York, NY, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 계산하고 t-test 분석, ANOVA 분석 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 처리군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

일반 K와 CK의 항산화력 비교

일반적으로 발효 생산되는 콤부차(K)와 감귤 및 녹차의 추출액을 첨가한 콤부차(CK)의 항산화력을 비교하였다. 각 시료의 항산화력은 ORAC를 측정하여 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 앞선 연구들에 의하면 콤부차는 높은 항산화력으로 인하여 활성산소로부터 세포를 보호하는 기능이 뛰어나다고 알려져 있다. Bhattacharya 등(12)은 당뇨 모델 생쥐를 이용한 실험에서 콤부차를 먹인 후 항산화력을 측정하였는데, 발효시키지 않은 차를 먹인 대조군에 비해

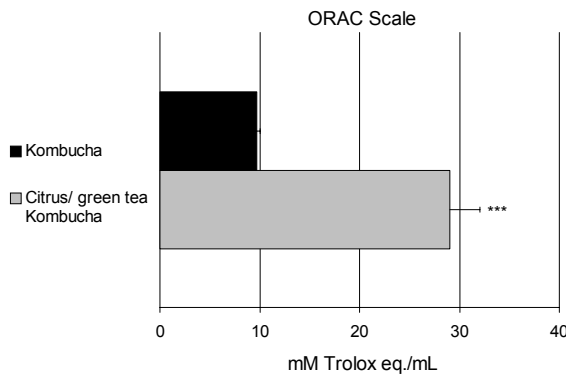


Fig. 1. Comparison of antioxidant capacity between general Kombucha (K) and citrus/green tea Kombucha (CK). ****P*<0.001.

콤부차를 먹인 생쥐의 간세포 내 glutathione 감소를 현저하게 억제하였음을 보고한 바 있다. 본 연구에서 제조된 감귤/녹차 추출액 함유 콤부차의 경우는 일반 발효 콤부차의 항산화력과 비교할 때 약 3배가량 증가하는 것으로 나타났으며, 이 항산화력의 증가는 녹차 및 감귤피 내에 강력한 항산화물질이 존재함을 나타낸다고 할 수 있다. 실제로 감귤피 및 녹차의 항산화력 증진 효과는 기존의 많은 연구들에서도 보고된 바 있다(15-17). 추후 이 항산화력의 증가를 가져오는 물질들에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

마우스 유래 피부 악성종양 및 인체 유래 방광암 세포주에 대한 성장 억제

감귤피와 녹차 추출액을 함유한 콤부차의 항산화력이 일반 콤부차보다 월등히 높아진 결과를 기초로 하여 각 성분의 항암성을 측정하였다. 녹차 추출액, 감귤피 추출액, 그리고 그 혼합액의 암세포주 성장 억제 정도를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 각 시료는 0~20 µL/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였고, Fig. 2와 같이 무침가군에 대한 백분율로 나타내었다. MTT assay의 결과를 보면 감귤피 추출물보다 녹차 추출물의 항암 효과가 상대적으로 높았으며, 각 성분의

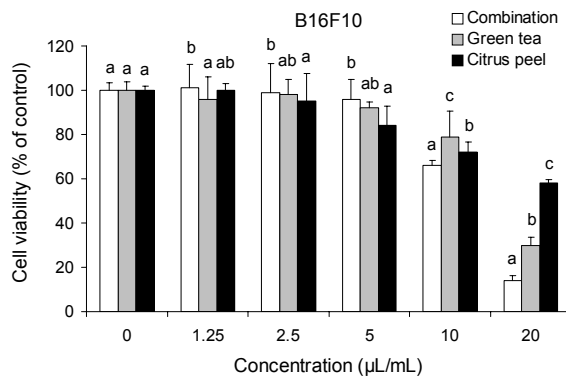


Fig. 2. Anti-cancer activities of extracts from citrus peel, green tea, and combination (citrus peel and green tea) against the proliferation of B16F10 murine melanoma cells. Values with different letters (a-c) are significantly different within each concentration at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

단일 처리군보다는 혼합액의 처리군에서 월등히 높은 항암성을 나타내었다. 특히 감귤/녹차 혼합액은 20 µL/mL의 농도에서 80% 이상의 피부악성종양 세포주의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 각 추출물의 단일 효과와 비교할 때 현저한 상승효과를 나타낸 것으로, 각 성분은 서로 다른 기작으로 암세포의 성장을 저해하고 있음을 알 수 있다.

인체 유래 방광암 세포주인 5637에 대한 항암성도 함께 측정되었으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 5637 방광암 세포주에 대한 항암성은 감귤 추출액보다 녹차 추출액에서 강하게 나타났으며, 혼합액의 항암성은 녹차 추출액의 항암성과 비슷하게 나타났다. 이 결과를 토대로 보면 방광암에 대한 항암성은 주로 녹차 성분에 의해 나타난다고 볼 수 있다. 방광암 세포주에 대한 결과에서도 약 20 µL/mL의 농도에서 60% 이상의 세포가 사멸되었으며, 세포의 50% 사멸을 나타내는 IC₅₀는 10~20 µL/mL 농도 사이에 존재함을 알 수 있다. 앞선 피부암세포에 대한 결과와 비교할 때 5637 인간 방광암 세포주에서는 상승효과가 나타나지 않은 것으로 볼 때 추출물의 작용 기작은 5637 방광암 세포와 B16F10 피부암세포에 대해 서로 다르다는 것을 추론할 수 있다.

인체 유래 방광암 세포주 5637에 대한 CK의 항암성

CK의 발효에 사용되는 성분 중 감귤피 추출액과 녹차 추출액 각각의 항암성 측정 결과를 토대로 두 성분을 함유한 콤부차를 10일간 배양하였다. 이후 배양액을 45 µm 필터로 제균한 후, 방광암 세포주에 대한 성장 억제 정도를 MTT assay를 통하여 측정하였고, 그 결과는 Fig. 4와 같다. CK는 K와 비교하여 유의적으로 5637 방광암 세포주에 대해 높은 항암 활성을 나타내었고, 농도 의존적인 항암 활성을 나타내었다. 그러나 흥미롭게도 IC₅₀ 값은 단일 성분들의 항암성 측정값과 비교할 때 증가한 것으로 나타났다. 이는 발효 과정 중에 단일 성분들의 파괴가 진행된 것으로 생각되며, 실제로 녹차 성분 중 강한 항암 활성을 나타낸다고 알려진 EGCG의 생리적 활용도(bio-availability)가 시간에 따라

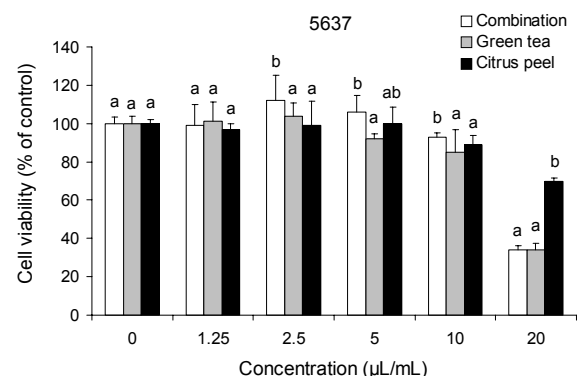


Fig. 3. Anti-cancer activities of extracts from citrus peel, green tea, and combination (citrus peel and green tea) against the proliferation of 5637 human bladder cancer cells. Values with different letters (a-c) are significantly different within each concentration at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

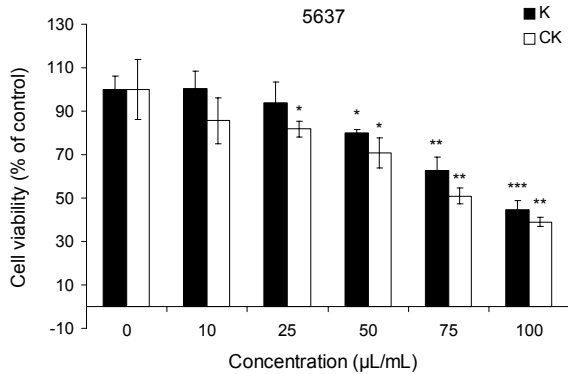


Fig. 4. Comparison of anti-cancer activity between general Kombucha (K) and citrus/green tea Kombucha (CK) against 5637 human bladder cancer cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control.

감소한다는 보고를 통해서도 추론할 수 있다(18). 녹차와 감귤의 기능성분이 일반 콤부차로 이행되어 증진된 생리활성 음료를 개발할 수 있을 것으로 생각하였고, 차후 각 성분의 화학적 안정성을 확보할 수 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

마우스 유래 대식세포주에 대한 독성

암세포에 대한 성장 억제 결과를 기초하여 본 암세포 성장 저해능이 일반 세포 독성에 기인한 것이 아닌지를 살펴보기 위해 비사멸화(immortalization)된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하여 세포독성을 확인하였고 그 결과는 Fig. 5와 같았다. K 혹은 CK는 RAW 264.7 세포에 대하여 전체적으로 낮은 세포 독성을 나타내었고, CK는 K보다 오히려 세포 독성이 낮게 나타났다. 방광암 및 피부암 세포주와 다르게 RAW 264.7 세포는 100 µL/mL의 농도에서도 세포 독성이 현저하게 낮았다. 이상의 실험 결과로 볼 때 감귤과 녹차의 추출액을 첨가하여 발효시킨 콤부차는 항암성이 일반 콤부차보다 높게 나타났으며, 녹차와 감귤피의 추출액이 상승효과(synergistic effect)를 나타내는 것으로 확인되었고, 마우스 대식세포를 이용한 독성실험에서 나타

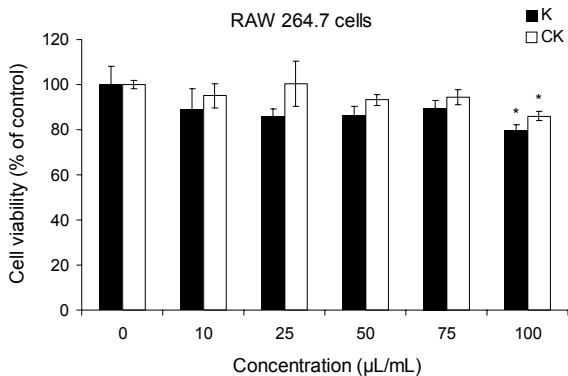


Fig. 5. Cytotoxicity of K and CK on murine macrophage cell line RAW 264.7. * $P < 0.05$ vs Control.

난 결과로 볼 때 일반 세포에 대한 독성은 낮을 것으로 판단되었다. 또한, 미생물 발효 기능성 음료의 산업화를 위해서 확보되어야 할 중요한 사항 중 한 가지는 일반 세포에 대한 독성 여부이며, RAW 264.7 대식세포를 사용하여 일반 세포 독성을 확인한 사례(19)에 기초하여 본 연구에서도 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 일반 세포에 대한 독성의 정도를 조사하였다. 그 결과 CK는 암세포에 적용된 농도의 약 2배에서도 세포 독성이 크지 않았다. 더 많은 실험 데이터가 확보되어야 하겠지만, 본 연구의 결과로 비추어 볼 때 CK는 항암 기능성 음료로 개발될 수 있는 가능성을 나타냈다고 볼 수 있다.

요 약

콤부차는 미생물의 공생체에 의해 제조되는 신맛이 강한 음료로 최근에는 “장수 식품”의 하나로 주로 러시아를 비롯한 서방 국가들에서 많이 음용되어온 기능성 음료이다. 본 연구에서는 일반적으로 제조되는 콤부차의 기능성을 제주 특산물인 감귤의 과피 추출액과 녹차의 추출액을 첨가한 후 콤부차를 발효시켜 각 성분이 가지는 기능성을 이행시킬 목적으로 감귤/녹차 콤부차를 제조하였고, 제조된 감귤/녹차 콤부차의 기능성을 항암성 중심으로 일반 콤부차와 비교 평가하였다. 또한, 콤부차의 산업화, 표준화 및 안전성 확보를 위하여 일반 세포에 미치는 독성의 정도를 RAW 264.7 마우스 대식세포를 이용하여 조사하였다. 그 결과 일반 콤부차보다 감귤/녹차 콤부차는 항산화력이 약 3배 증가하였으며, 항암성도 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 특히 일반 세포에 대한 독성은 현저히 낮아진 것으로 나타났으며, 이는 감귤/녹차 콤부차의 안전한 항암 기능성 음료로의 개발 가능성을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 교육인적자원부에서 시행한 지역혁신창의인력양성사업(2014H1C1A1073112)의 지원으로 수행된 연구 결과입니다.

REFERENCES

1. Dufresne C, Farnworth E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Res Int* 33: 409-421.
2. Gharib OA. 2009. Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. *Chin Med* 4: 23.
3. Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. 2000. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J Food Prot* 63: 976-981.
4. Srihari T, Arunkumar R, Arunakaran J, Satyanarayana U. 2013. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomed Prev Nutr* 3: 53-58.
5. Barati F, Javanbakht J, Adib-Hashemi F, Hosseini E, Safaeie

- R, Rajabian M, Razmjoo M, Sedaghat R, Aghamohammad Hassan M. 2013. Histopathological and clinical evaluation of Kombucha tea and Nitrofurazone on cutaneous full-thickness wounds healing in rats: an experimental study. *Diagn Pathol* 8: 120.
6. Wang Y, Ji B, Wu W, Wang R, Yang Z, Zhang D, Tian W. 2014. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. *J Sci Food Agric* 94: 265-272.
 7. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. 2011. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology* 18: 221-234.
 8. Murugesan GS, Sathishkumar M, Jayabalan R, Binupriya AR, Swaminathan K, Yun SE. 2009. Hepatoprotective and curative properties of Kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity. *J Microbiol Biotechnol* 19: 397-402.
 9. Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Thangaraj P, Swaminathan K, Yun SE. 2011. 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 J Biotechnol* 10: 75-82.
 10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1995. Unexplained severe illness possibly associated with consumption of Kombucha tea—Iowa, 1995. *MMWR* 44: 892-893,899-900.
 11. Srinivasan R, Smolinske S, Greenbaum D. 1997. Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea: is this beverage healthy or harmful?. *J Gen Intern Med* 12: 643-644.
 12. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. 2013. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 60: 328-340.
 13. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. 2014. A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13: 538-550.
 14. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
 15. Yoo KM, Moon B. 2016. Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chem* 196: 544-549.
 16. Ademosun AO, Oboh G. 2014. Anticholinesterase and antioxidative properties of water-extractable phytochemicals from some citrus peels. *JJ Basic Clin Physiol Pharmacol* 25: 199-204.
 17. Brückner M, Westphal S, Domschke W, Kucharzik T, Lügering A. 2012. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. *J Crohns Colitis* 6: 226-235.
 18. Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 62: 7241-7246.
 19. Zhang Q, Wang C, Sun L, Li L, Zhao M. 2010. Cytotoxicity of lambda-cyhalothrin on the macrophage cell line RAW 264.7. *J Environ Sci (China)* 22: 428-432.