

## *Gluconacetobacter* spp. 스타터로 발효한 콤부차의 생리활성

— 연구노트 —

고혜명 · 신승식 · 박성수

제주대학교 식품영양학과

### Biological Activities of Kombucha by Stater Culture Fermentation with *Gluconacetobacter* spp.

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

Department of Food Science & Nutrition, Jeju National University

**ABSTRACT** In this study, we investigated citrus Kombucha (CK) produced by three different bacteria strains (*Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter medellinensis*, and *Gluconobacter oxydans*; named as CK-MOX) identified from traditional Kombucha. During fermentation, the pH level of CK-MOX was gradually reduced, and total acidity slightly increased. Antioxidant activity, measured by DPPH, ABTS, and oxygen radical absorbance capacity assays, markedly increased after fermentation. Moreover, fermented CK-MOX (Day15) exhibited anti-proliferative and anti-migratory activities against EJ human bladder carcinoma cells. Western immunoblot assays showed that treatment with CK-MOX significantly up-regulated phospho-extracellular signaling kinase (ERK) levels. To distinguish whether or not up-regulation of phospho-ERK is the cause or effect, we investigated the viability of EJ cells in the presence of U0126, a mitogen activated protein kinase/ERK kinase 1/2 inhibitor. Pre-treatment with U0126 rescued cells from CK-MOX-induced cell death, which indicates phospho-ERK may be a key regulator in the mechanism of CK-MOX-induced apoptosis of EJ bladder cancer cells. In conclusion, CK-MOX, fermented by a defined composition of bacterial starters, shows antioxidant capacity and anti-cancer activity against EJ bladder cancer cells.

**Key words:** citrus Kombucha, antioxidant, bladder cancer

## 서 론

콤부차(Kombucha, K)는 약간 달고 신맛이 나는 발효 음료로 당이 첨가된 홍차 추출액에 박테리아와 효모의 공생군체(symbiom)를 접종하여 약 14일간 발효하면 얻을 수 있다(1). 중국 진나라(B.C 220) 때 해독과 활력을 복돋기 위해 사용된 것이 기원으로 알려져 있으며, 제2차 세계대전 당시 독일, 프랑스, 남아프리카 등 세계 전역에 전해졌다(2). 발효된 콤부차에는 유기산, 당류, 비타민과 차의 폴리페놀이 함유되어 있다고 보고되었다(3). 현재까지 연구를 통해 분리된 콤부차의 균주는 대부분이 초산균이며, 그중 *Acetobacter xylinum*은 콤부차 상층부에 “tea fungus”라 불리는 cellulose 막을 형성하는 역할을 한다고 알려져 있다(4). 콤부차는 *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni* 등 병원성 균에 대한 항균성, 산화적 스트레스로부터의 간세포 보호작용 및 항암능력 등을 갖는 것으로 나타났다(5-8).

감귤류는 hesperitin, naringenin 등의 플라보노이드류(flavonoids)와 auraptene, coumarin, limonene 등 기능성 성분이 다량 함유되어 있으며(9,10), 종양유전자의 활성 저해, 콜레스테롤 저하, 혈당 강하, 항산화, 노화 억제, 지방간 억제작용 등 다양한 생리 기능적 효과가 있다(11).

Kim 등(12)은 감귤액을 첨가한 감귤 콤부차(citrus Kombucha, CK)의 천연물 소재 유래 발효음료의 건강 기능성 소재로서의 가치를 확인하였는데 CK는 K와 비교하여 항산화 능력과 방광암 세포주(T24, 5637 세포)에 대한 성장 억제 효과가 크다고 하였으며, 특히 CK를 처리한 T-24 세포에서 anti-apoptotic B-cell lymphoma-2(Bcl-2) 단백질의 발현 감소와 pro-apoptotic 단백질인 caspase-3, caspase-8, caspase-9 및 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 절단편의 증가에 따른 apoptosis가 유도됨을 보고하였다. 전통적인 콤부차의 생산은 설탕과 같은 탄소원에 녹차나 홍차의 추출액을 규정되지 않은 미생물 균체를 접종하여 발효시키는 방식을 사용하였다. 그러나 콤부차의 품질 관리 및 산업적인 생산을 위해서는 규정된 발효 미생물의 사용 및 그 안전성이 확보되어야 한다. 우리는 리보솜 RNA 염기서열 분석을 통하여 콤부차의 미생물 분포를 조사하였으며(unpublished data), 본 연구에서는 발효 표준화를 위

Received 11 May 2017; Accepted 24 May 2017

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

하여 전통 콤포우차로부터 확인된 3가지 균주 *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*를 이용하여 감귤 콤포우차를 발효하였고, 감귤 발효액(CK-MOX)의 항산화 능력평가 및 방광암 세포주(EJ 세포)에 대한 항암성 확인 연구를 통하여 감귤 발효액의 기능성 음료로서의 개발 가능성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 감귤 발효액(CK-MOX) 배양 및 시료의 조제

본 실험에서 사용한 3가지 균주는 *G. xylinus*, *G. medellinensis*, *G. oxydans*로 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 균주는 single colony를 mannitol 배지(yeast extract 5 g, peptone 3 g, mannitol 25 g in 1 L) 30 mL에 48시간 배양한 후 원심분리기(Aventi J-E, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 배양액을 제거(18,000×g, 10 min)하였다. 감귤 콤포우차는 녹차(Dongsuh Co. Inc., Seoul, Korea) 추출액 750 mL에 설탕 75 g과 감귤액(Jeju Province Development Co., Jeju, Korea) 30 g을 교반한 후 3가지 균주를 접종하여 30°C 배양기에서 15일간 발효하였다. 실험에는 발효액을 18,000×g로 10분간 원심분리 후 상등액을 필터(0.45 µm, EMD Millipore Inc., Billerica, MA, USA)로 여과한 후 동결건조기(FDB-5502, Operon Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 24시간 건조한 후 실험에 사용하였다. 발효는 3반복 이상으로 수행하였다.

### pH 및 산도 측정

pH 측정은 pH meter(FEP20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 산도는 중화 적정법(13)을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL를 10배 희석한 후 1% phenolphthalein 지시약을 2~3방울을 가하고, 0.1 N NaOH로 pH 8.3에 도달할 때까지 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 양(mL)을 측정한 후 다음 식에 따라 초산으로 산도를 계산하였다.

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

### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Choi 등(14)의 방법을 응용하여 측정하였다. 10배 희석한 시료 200 µL와 에탄올에 녹여 제조한 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액 800 µL를 혼합하여 암소에서 20분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Versa Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정하여 ascorbic acid 당량으로 나타내었다.

### ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(15)의 방법을 응용하여 측정하였다. 메탄올에 녹인 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(Sigma-Aldrich Co.) 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 12시간 이상 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 10배 희석 시료 100 µL와 ABTS 용액 900 µL를 첨가하여 혼합한 뒤 암소에서 30분간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices)를 사용하여 735 nm에서 측정하여 ascorbic acid 당량으로 나타내었다.

### ORAC(oxygen radical absorbance capacity) assay

ORAC value는 Ou 등(16)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 µL와 40 nM fluorescein(대정화학, Gyeonggi, Korea) 120 µL를 혼합하고 측정 직전 150 mM 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride(AAPH, Sigma Aldrich Co.) 55 µL를 첨가하였다. Fluorescence microplate reader (Spectra Max i3, Molecular Devices)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.

### 세포배양

실험에 사용된 인간 방광암 EJ 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) 배지에 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Co.)과 1% penicillin-streptomycin(Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany)을 추가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정(MTT assay)

EJ 세포에 대한 성장 억제능의 확인을 위해 96-well plate 방광암 세포를 3,000 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. MEK inhibitor에 의한 세포 사멸의 억제 확인을 위한 실험에서는 1× RPMI에 녹인 U0126을 10 µM 농도로 처리한 후 각 조건에 따라 CK-MOX를 처리하여 24~48시간 배양하였다. 그 뒤 thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 시약을 0.5 mg/mL의 농도로 100 µL씩 처리하여 2시간 반응시키고 상층액을 제거한 뒤 DMSO(Bio Basic, Ontario, Canada)로 각 well에 생성된 MTT formazan을 1시간 동안 용해하여 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분

율로 나타내었다.

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

#### 세포 이동성 관찰(scratch-wound healing assay)

세포를 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well 농도로 분주, 24시간 배양 후 200  $\mu$ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 뒤 상층의 배지를 제거하고, 시료를 처리하여 도립현미경으로 2일간 세포의 이동성을 관찰하였다.

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

#### Annexin V 측정(FACS analysis)

세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 6-well plate에 분주한 다음 24시간 후 10 mg/mL의 농도로 시료를 처리하고, 48시간 후 배지를 포함한 세포 모두를 tube에 옮겨 200 $\times$ g에서 2분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 다음 세포 pellet을 차가운 phosphate-buffered saline을 이용하여 1회 세척한 후, PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.  $1 \times$  cold binding buffer를 이용하여  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 희석한 후 5  $\mu$ L PE Annexin V를 더하고, 25°C에서 15분 방치한 후  $1 \times$  binding buffer 400  $\mu$ L를 추가하여 75  $\mu$ L를 cassette(ORFLO Co., Ketchum, ID, USA)에 넣고 FACS(ORFLO Co.)로 측정하였다.

#### 단백질 발현 측정(western immunoblot assay)

특정 단백질의 발현 확인을 위해 western immunoblot을 실시하였으며, 방광암세포 EJ 세포에 시료 처리 후 RIPA-lysis buffer(Biosesang, Gyeonggi, Korea)와 protease inhibitor 혼합액을 이용하여 균질화한 다음 최대 속도에서 10분간 원심분리(Micro 17R, Hanil, Gyeonggi, Korea) 하여 상층액을 분리하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하였으며, 30  $\mu$ g의 단백질을 포함한 시료를 SDS page gel로 세분하고 Nitro-cellulose blotting membrane(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)에 transfer 하였고, 5% skim-milk로 blocking 하였다. 1차 항체 p-ERK와 ERK(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)는 1:1,000의 비율로 희석하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 2차 항체(Cell Signaling Technology)는 1:3,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 측정에는 WESTAR ETA C ultra 2.0 ECL solution(Cyanagen Srl, Bologna, Italy)을 반응시킨 후 Fusion Solo(Vilber Lourmat, Marne, France)를 이용하였다.

#### 통계분석

본 연구의 실험은 3번 이상 반복하여 통계 프로그램 SPSS

Version 18.0(IBM, New York, NY, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하고 scratch wound healing assay 결과는 *t*-test, 그 외의 모든 실험 결과는 one-way ANOVA 분석 후  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 각 실험군의 유의적 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### CK-MOX 발효 기간별 pH 및 산도의 변화

CK-MOX의 발효 기간에 따른 pH 및 산도 변화는 Table 1에 나타내었다. 발효의 진행에 따라 CK-MOX의 pH는 발효 전 3.79에서 발효 후 2.99로 유의적으로 감소하였고, 산도는 발효 전과 비교하여 1.34% 증가하였다. 콤부차는 발효 과정을 통해 acetic, gluconic, glucuronic, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic acid 등의 유기산이 생성된다고 알려져 있으며(17), 본 연구에 사용된 3종의 균 모두 acetic acid bacteria로 pH의 저하는 유기산 농도 증가에 따른 결과물로 보인다. 이러한 특성은 *G. hansenii*를 접종한 coffee cherry husk 추출액 발효 연구 결과(18)에서도 나타났다.

### CK-MOX 발효 기간별 항산화력 비교

CK-MOX의 항산화 능력은 총 3가지 방법으로 측정하였으며 Table 2에 나타낸 바와 같이 K-MOX의 발효 전과 비교하여 발효 후 항산화 능력이 많이 증가하는 것으로 나타났다. CK-MOX는 발효 전과 비교하여 발효 후 DPPH 라디칼 소거능은 125  $\mu$ g ascorbic acid/mL에서 280  $\mu$ g ascorbic acid/mL로 유의적으로 증가하였으며, ABTS 라디칼 소거능은 발효 3일째 599  $\mu$ g ascorbic acid/mL로 발효 전과 비교하여 약 6.5배 증가하여 이후의 발효기간 동안 꾸준히 증가하는 것으로 나타났다. ORAC assay는 비색 측정을 하는 다른 항산화 측정법과 달리 형광 값을 분석하여 나타내기 때문에 색을 갖는 시료의 항산화력을 더욱 더 객관적으로 측정할 수 있다는 장점을 갖고 있다(19). CK-MOX의 ORAC 측정 결과 발효 전 5.93 mM Trolox와 비교하여 발효 후 7.51 mM Trolox로 유의적으로 증가하였으나 12일간 발효

**Table 1.** Changes in pH and total acidity of CK-MOX during fermentation

Fermentation period (day)	pH	Acidity (%)
0	3.79 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
3	3.73 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
6	3.45 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.54 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
9	3.37 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	1.04 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
12	3.27 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	1.37 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
15	2.99 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	1.51 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. Different letters (a-f) indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Antioxidant capacity of CK-MOX

Fermentation period (day)	DPPH radical scavenging activity (µg ascorbic acid/mL)	ABTS radical scavenging activity (µg ascorbic acid/mL)	ORAC assay (mM Trolox)
0	125±17 <sup>c</sup>	91±14 <sup>d</sup>	5.93±0.15 <sup>d</sup>
3	135±1 <sup>c</sup>	599±46 <sup>bc</sup>	5.80±0.25 <sup>d</sup>
6	149±22 <sup>c</sup>	602±35 <sup>bc</sup>	6.65±0.14 <sup>c</sup>
9	227±20 <sup>b</sup>	558±13 <sup>c</sup>	7.74±0.16 <sup>b</sup>
12	241±21 <sup>b</sup>	634±31 <sup>b</sup>	8.35±0.19 <sup>a</sup>
15	280±6 <sup>a</sup>	697±20 <sup>a</sup>	7.51±0.37 <sup>b</sup>

Values are means±SD of three independent experiments.

Different letters (a-d) indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

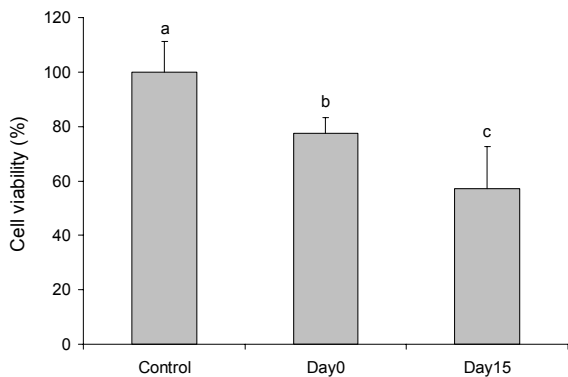
한 CK-MOX의 ORAC 측정값이 8.35 mM Trolox로 가장 높은 것으로 나타났다.

**인체 유래 방광암 세포주에 대한 성장 억제 효과**

유사 정상세포인 마우스 RAW264.7 대식세포에 15일간 발효한 CK-MOX 시료를 0~20 mg/mL의 농도별로 처리한 결과 대조군 대비 세포 생존율의 유의적인 변화가 없었던 10 mg/mL의 농도로 CK-MOX의 인간 방광암 세포주 EJ에 대한 성장 억제력을 MTT assay를 통해 측정하여 Fig. 1에 무처리군에 대한 백분율로 나타내었다. 대조군과 비교하여 CK-MOX 처리군에서 유의적으로 세포 생존을 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 발효 전 시료 처리군 77%, 발효 후 시료 처리군 57%로 발효 후 CK-MOX 처리군에서 유의적으로 방광암 세포주 EJ의 생존을 억제하는 것으로 나타났다.

**인체 유래 방광암 세포주의 세포 이동 억제 효과**

Scratch wound healing assay는 세포의 이동성을 확인하는 실험 방법으로 암세포의 이동은 전이와 증식으로 연결된다고 알려져 있다(20). Srihari 등(21)의 연구에 따르면 전통적인 방법으로 배양된 콤부차는 인간 전립선암 세포주 PC-3의 세포이동(migration)을 억제하는 것으로 보고되었

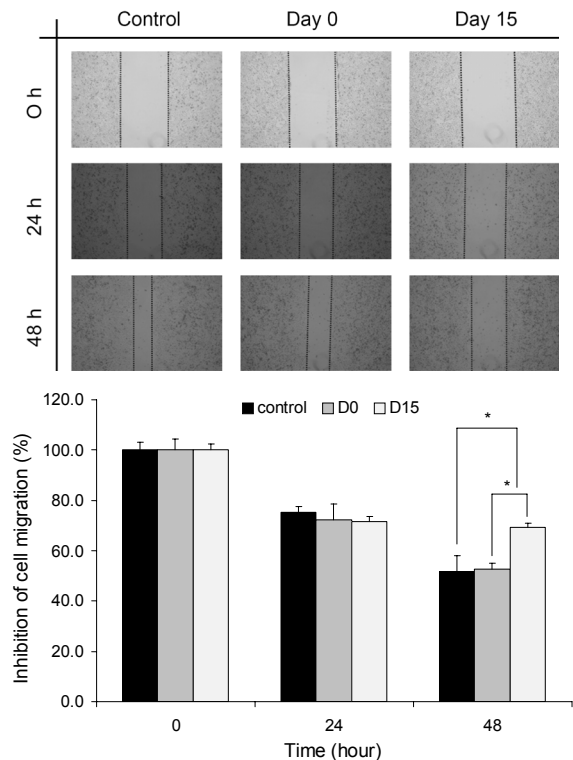


**Fig. 1.** Effect of CK-MOX at 10 mg/mL (final conc.) on viability of EJ cells. Cells were treated with culture medium (Control), CK-MOX (10 mg/mL) at day 0 (Day0), or CK-MOX (10 mg/mL) at day 15 (Day15). Values are means±SD of three independent experiments. Different letters (a-c) above the bars indicate significant differences determined by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

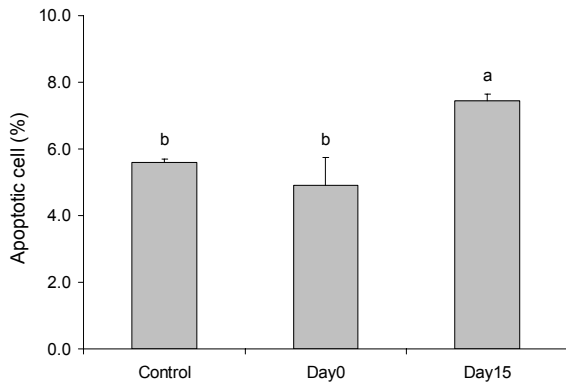
다. 본 연구에서 이동성 억제 효과는 초기 세포 간의 거리에 대해 처리 시간 후의 세포 간의 거리의 비율을 %로 표시하였으며, 24시간 처리 시 세포 이동성 억제 효과는 크지 않았으나, 48시간 처리 시는 대조군(51.7%)과 비교하여 CK-MOX의 처리군(69.4%)에서 EJ 세포의 이동성을 약 17% 억제하는 것으로 나타나 세포 이동성 억제가 효과적인 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

**인체 유래 방광암 세포주에 대한 자기사멸 유도**

세포 자기사멸 유래 Annexin V의 발현에 관한 실험 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대조군, 발효 전 CK-MOX 처리군, 발효 후 CK-MOX 처리군에서 각각 5.6, 4.9, 7.4%의 ap-



**Fig. 2.** Effects of CK-MOX treatment on the migration of EJ cells. Cells were treated with culture medium (Control), CK-MOX (10 mg/mL) at day 0 (Day0), or CK-MOX (10 mg/mL) at day 15 (Day15). Values are means±SD of three independent experiments. Significant differences at  $*P<0.05$  by *t*-test.



**Fig. 3.** CK-MOX-induced apoptosis of bladder EJ cancer cells was measured by Annexin V staining assay. Values are means±SD of three independent experiments. Different letters (a,b) above the bars indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

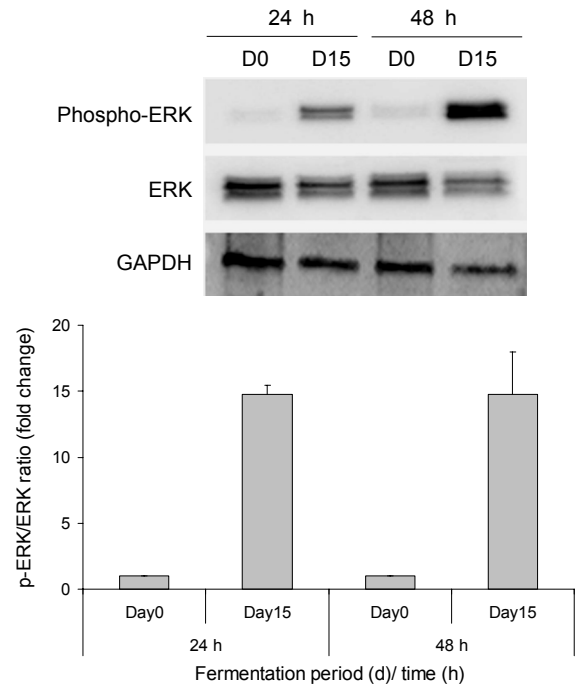
optosis에 의한 세포 사멸률을 보였으나, 대조군과 발효 전 CK-MOX 처리군은 통계적으로 유의차가 없었고, 발효 후 (Day15) 시료 처리군은 발효 전(Day0) 시료 처리군과 비교하여 apoptosis로 인한 세포의 사멸률이 유의적으로 높게 나타났다.

**CK-MOX를 처리한 EJ 세포의 p-ERK level의 변화**

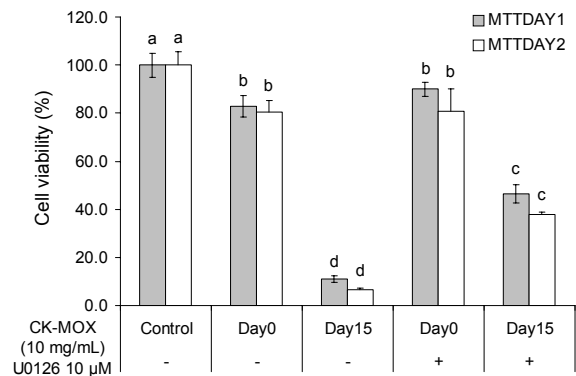
Mitogen activated protein kinase(MAPK) pathway는 세포 외부의 신호를 핵으로 전달하는 과정으로 세포의 증식, 유전자 발현, 분화, 분열 등 세포 대부분 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(22). 외부 자극으로 활성화된 rat sarcoma kinase(Ras)는 rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)를, Raf는 MAPK/ERK kinase(MEK)를, MEK은 extracellular signaling kinase(ERK)를 차례로 인산화한다(23). 본 연구에서는 MAPK의 일종인 ERK 활성을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 방광암 세포주 EJ에 CK-MOX 발효 전, 발효 후 시료를 처리한 뒤 24, 48시간 각각 p-ERK의 발현 정도를 측정된 결과 15일간 발효한 CK-MOX의 처리는 EJ 세포의 p-ERK level을 많이 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4).

**U0126의 처리와 EJ의 생존율 및 p-ERK level의 변화**

CK-MOX의 처리군에서 많이 증가한 ERK의 활성화가 EJ 세포 사멸의 원인인지 결과인지 확인하기 위하여 MEK1/2 inhibitor인 U0126을 CK-MOX와 함께 처리하여 관찰하였다. U0126의 처리는 예비 실험 결과(data not shown) EJ 세포의 ERK 활성을 현저하게 감소시켰던 10 μM의 농도로 사용하였다. CK-MOX와 U0126을 함께 처리한 EJ 세포의 세포 생존율은 Fig. 5에 나타내었다. 48시간 처리 시 대조군과 비교하여 발효 전 시료 처리군의 세포 생존율은 80.6%였고, 15일간 발효한 CK-MOX 처리군은 6.5%로 앞선 실험 결과와 같은 경향으로 CK-MOX 발효 후 시료의 처리는 EJ



**Fig. 4.** Effect of CK-MOX on phosphorylation of ERK protein expression in EJ cells. Values are means±SD of three independent experiments.



**Fig. 5.** Rescue of EJ cells from CK-MOX-induced cell death by MEK inhibitor, U0126. Values are means±SD of three independent experiments. Different letters (a-d) above the bars indicate significant differences determined by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. U0126과 발효 전 CK-MOX 시료를 동시 처리한 결과 세포 생존율은 유의적인 차이를 보이지 않았고, U0126과 발효 후 CK-MOX를 동시 처리하였을 때 세포 생존율은 37.8%로 CK-MOX에 의한 세포 사멸이 회복되는 것으로 나타났다. Western blot을 통한 단백질 발현 측정 결과(Fig. 6)에서 U0126의 처리가 p-ERK level을 감소시키며, 15일간 발효한 CK-MOX와 U0126을 동시 처리하였을 때 미량 감소하는 것으로 나타났다. 결과적으로 콤부차 대표 균주 3종을 이용한 감광 발효액 (CK-MOX)으로 유도된 EJ 방광암 세포 사멸에 p-ERK가

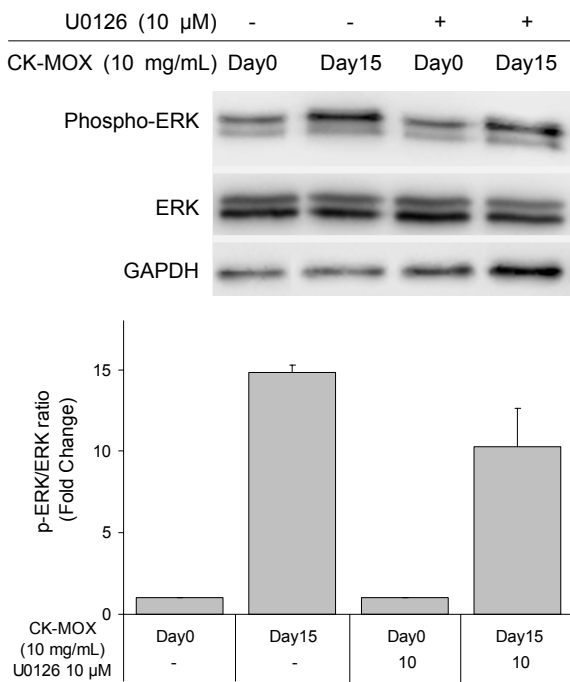


Fig. 6. Effect of CK-MOX and U0126 on phosphorylation of ERK protein expression in EJ cells. Values are means±SD of three independent experiments.

깊이 관여함을 확인할 수 있다.

### 요 약

본 연구는 감귤 콤부차의 산업화를 위한 발효 균주 표준화를 위하여 콤부차에서 분리된 3가지 균주(*Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter medellinensis*, *Gluconobacter oxydans*)를 이용한 감귤 발효액(CK-MOX)의 기능적 특성을 탐색하고자 하였다. CK-MOX 제조 후 15일간 3일 마다 샘플링을 하였으며, 발효 기간에 따른 pH, 산도, 항산화 능력을 평가하였다. 발효에 따라 pH는 감소하였고, 산도는 증가하였다. DPPH, ABTS 라디칼 소거능, ORAC assay를 통한 항산화 능력 측정 결과 발효에 따라 항산화 능력이 향상하는 것으로 나타났으며, 방광암 세포주(EJ 세포)의 생존 억제 및 이동 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 CK-MOX로 유도된 EJ 세포의 사멸에 MAPK pathway의 중추적인 역할을 하는 것으로 알려진 ERK의 발현이 깊이 관여하는 것으로 나타났다.

### 감사의 글

이 논문은 2016학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 수행된 연구결과입니다.

### REFERENCES

- Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. 2000. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J Food Prot* 63: 976-981.
- 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.
- Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L. 2000. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Int J Food Sci Technol* 35: 201-205.
- Pokalwar SU, Mishra MK, Manwar AV. 2010. Production of cellulose by *Gluconacetobacter* sp.. *Recent Res Sci Technol* 2: 14-19.
- Castro C, Cleenwerck I, Trček J, Zuluaga R, De Vos P, Caro G, Aguirre R, Putaux JL, Gañán P. 2013. *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 1119-1125.
- Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A, Ammar E. 2013. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J Food Biochem* 37: 231-236.
- Srihari T, Satyanarayana U. 2012. Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. *J Pharm Sci Res* 4: 1978-1981.
- 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.
- Hirata T, Fujii M, Akita K, Yanaka N, Ogawa K, Kuroyanagi M, Hongo D. 2009. Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg Med Chem* 17: 25-28.
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. 2007. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104: 466-479.
- Silalahi J. 2002. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 11: 79-84.
- Kim CI, Shin SS, Park SS. 2016. Growth inhibition and induction of apoptosis in human bladder cancer cells induced by fermented citrus Kombucha. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1422-1429.
- Chung N, Jo Y, Gao Y, Gu SY, Jeong YJ, Kwon JH. 2015. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of naturally-fermented commercial rice vinegars produced in Korea, China, and Japan. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1799-1805.
- Choi IY, Song YJ, Lee WH. 2010. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal extracts. *Korean J Hort Sci Technol* 28: 871-876.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231-1237.
- 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.
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* 102: 392-398.

18. Rani MU, Rastogi NK, Appaiah KAA. 2011. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract—an agro-industry waste. *J Microbiol Biotechnol* 21: 739-745.
19. Kim SH, Kim YM. 2007. Determination of the antioxidant capacity of Korean ginseng using an ORAC assay. *J East Asian Soc Diet Life* 17: 393-401.
20. Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H. 2003. NF- $\kappa$ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 278: 21631-21638.
21. 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.
22. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. 2005. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 392: 249-261.
23. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56: 127-155.