

AhR 발현을 통한 콤부차 분획물의 안티폴루션 효과 연구

강은빈^{*,†} · 현진아 · 권현지 · 범석현 · 한동근 · 박하은^{**} · 김현정^{**} · 광기성^{**} · 안봉전^{***,††}

*대구한의대학교 화장품약리학과, 석사 대학원생

**㈜허니스트

***대구한의대학교 화장품약리학과, 교수

(2021년 5월 24일 접수, 2021년 7월 3일 수정, 2021년 7월 21일 채택)

A Study on the Anti-Pollution Effect of Kombucha Fraction through AhR Expression

Eun-Bin Kang^{†,†}, Jin-A Hyun¹, Hyun-Ji Kwon¹, Seok-Hyun Beom¹,
Dong-Geun Han¹, Ha-Eun Park², Hyun-Jeong Kim², Ki-Sung Kwak², and Bong-Jeon An^{†,††}

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, 285-10, Eobongji-gil, Gyeongsan-si,
Gyeongsangbuk-do 38578, Korea

²R&D Center, HONEST.Co.,Ltd.

(Received May 24, 2021; Revised July 3, 2021; Accepted July 21, 2021)

요약: 본 연구에서는 설탕을 넣은 녹차나 홍차에 유익균을 첨가해 발효시킨 음료인 콤부차를 컬럼 크로마토그래피를 이용해 분획한 후, TLC를 통해 플라보노이드류인 퀘르세틴 글리코사이드(querctin glycoside)의 유효성분 유무를 확인하고 그 분획물을 이용하여 공해로부터 피부를 보호 및 개선하는 안티폴루션 효과를 확인하였다. 인간 각질형성세포에 Kombucha-querctin glycoside (K-QG)를 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 90% 이상의 생존율을 보였으며, 안티폴루션 효과를 보기 위해 benzo[e]pyrene과 미세먼지 자극에 의한 세포 생존율을 측정한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 68.79%, 50.68%의 개선율을 보였다. 또한, benzo[a]pyrene에 의해 활성화되는 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 대조군에 대비하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 31.08%의 억제율을 보였다. 본 연구의 결과를 통해 K-QG는 벤조피렌과 미세먼지로부터 자극받은 피부를 보호, 개선해주며 안티폴루션 기능성 소재로써 가치가 있는 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, Kombucha, a fermented drink by adding beneficial bacteria to green tea or black tea with sugar, was classified using column chromatography, and the presence or absence of quercetin glycoside, a type of flavonoids, was confirmed through TLC. In addition, the anti-pollution effect of protecting and improving the skin from pollution was confirmed using the fraction. Keratinocytes were treated with K-QG to confirm the cell viability, showing a survival rate of 90% or more up to a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the cell viability by benzo[e]pyrene and fine dust stimulation to see the anti-pollution effect was measured. At 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the improvement rates were about 68.79% and 50.68%, respectively. In addition, as a result of confirming the expression of AhR activated by benzo[a]pyrene through Western blot, it showed an inhibition rate of about 31.08% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compared to the control group. Through the results of this study, K-QG is thought to be valuable as an anti-pollution functional material, protecting and improving skin irritated from benzopyrene and fine dust.

Keywords: Kombucha, quercetin glycoside, anti-pollution, benzo[a]pyrene, AhR

† 주 저자 (e-mail: dmsqls2245@naver.com)

call: 053-819-1435

†† 교신저자 (e-mail: anbj@dhu.ac.kr)

call: 053-819-1435

1. 서론

과학 기술이 발전함에 따라 국내 미세먼지의 농도 기준이 불가피하게 증가하고 있고, 환경오염에 대한 문제가 사회적 이슈로 대두되면서 현대인들의 건강 위협성에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 따라 유해환경으로부터 피부를 보호 및 차단해주는 소비자들의 니즈가 증가함에 따라 안티폴루션(anti-pollution) 기능이 함유된 화장품 시장의 규모가 확대되고 있다[1].

미세먼지(particulate matter, PM)는 2013년 세계보건기구(WHO)에서 1급 발암물질로 지정한 공업 유해 물질에서 나온 화학물질을 함유한 입자상 물질로 직경 10 μm 이하의 크기(PM_{10})이며, 초미세 먼지는 이보다 더 작은 2.5 μm 이하의 크기($\text{PM}_{2.5}$) 이다[2]. 또한, 질산염, 황산염 및 다환방향족 탄화수소(PAHs) 등 다양한 화학 성분과 금속성분이 포함되어 있으며, 소량으로도 인체에 치명적인 영향을 주어 호흡기 질환, 면역력 저하, 피부노화 촉진 등 여러 질병을 유발한다[3,4].

미세먼지 속 중금속 성분인 벤조피렌(benzo[e]pyrene, B[e]P)은 다환방향족 탄화수소의 한 종류로 일상생활에서도 흔하게 노출되기 쉬우며, 다량 노출 시에 피부 색소 침착, 각화증, 피부암 등을 유발할 수 있어 1급 발암물질로 지정되어 있다[5,6]. B[e]P가 피부에 접촉하면 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 신호가 활성화되는데, AhR 신호는 다양한 조직에서 독성 또는 보호 효과가 있는 유전자의 발현을 조절하며[7], 주로 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 담배 연기 등 독성물질에 의해 활성화되어 피부 염증반응과 DNA를 손상시켜 발암을 일으키는 등 다양한 병변을 일으키는 것으로 보고되어있다[8]. 독성물질, 환경오염원이 AhR과 결합해 AhR-nuclear transporter (ARNT)와 복합체를 이루고 핵안으로 이동하여 xenobiotic-responsive element (XRE)와 결합하면 염증 유전자들의 발현을 유도하여 피부염증이나 노화를 일으키며[7,9], 보습의 주요 성분이 되는 filaggrin 단백질의 발현도 현저히 감소시킨다[8].

콤부차(Kombucha)는 홍차와 녹차를 물에 우려낸 뒤 아세트산 박테리아와 효모의 중균 집합체인 symbiotic colony of bacteria and yeasts (SCOBY)를 접종해준다. SCOBY균이 공생 배양을 하면서 당을 먹이로 하는 대사 활동으로 인해 자연 발효되어, 프리바이오틱스와 같은 유익균이 생성된 건강 음료이다[10]. SCOBY는 음료의 제조에 사용되며, 콤부차 고유의 성분인 효모균이다. 발효 시 사용되는 균총, 발효 조건에 따라 콤부차의 특성이 다양해진다[11]. SCOBY

는 당분을 먹이로 흡수한 뒤 다양한 유기산, 부산물을 생성함으로써 천연 탄산이 생성되며[12], 콤부차의 주요 성분으로 페놀 화합물로 항바이러스 효능이 뛰어난 카테닌(catenin), 플라보놀(flavonol), 플라보노이드(flavonoid), 아미노산(amino acid) 등이 함유되어있고[13], 비타민, 글루콘산(gluconic acid), 미네랄(mineral), 아세트산(acetic acid) 등이 포함되어 있어 항산화, 신진대사 촉진, 항염, 항균 등의 효능이 우수하다고 보고되어 있다. 녹차 유래의 콤부차는 카테킨(catechin), 홍차 유래는 퀘르세틴(querctetine)이 다량 함유 되어있다[10]. 이들 약리학적 효능과 생리학적 기전 등에 대한 연구는 많이 보고되어있으나, 안티폴루션과 그에 따른 기전에 관한 연구는 아직 미흡하여 더욱 심도깊은 연구의 필요성이 요구되고 있다.

이에 본 연구에서는 콤부차를 용매 극성의 성질을 이용한 컬럼 크로마토그래피로 분획한 후, TLC를 실시하여 유효 성분 유무를 확인하고 그 분획물을 시료로 하여 벤조피렌과 미세먼지로부터 안티폴루션 기능성 소재로서의 활용 가능성을 보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 기기

2.1.1. 시료 및 TLC에 의한 정성분석

본 실험에 사용된 콤부차(Kombucha)는 충청남도 논산시에 소재한 아임얼라이브시(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

콤부차를 감압농축 후, 용매를 제거하여 얻은 1 차 농축물 126.56 g을 200 mL 증류수에 현탁하여 여과 후 Diaion HP-20컬럼 크로마토그래피(10-25 μm , GE Healthcare Bio-Science AB, Sweden)를 이용하여 분획하였다. 이동상 용매로 H_2O -MeOH을 흘려주어 Fr.1 (100% H_2O), Fr.2 (50% MeOH), Fr.3 (100% MeOH) 3 개의 분획물을 획득하였다. 그 후, 유효성분의 유무를 확인하기 위해 플라보노이드류인 퀘르세틴 글리코사이드(querctetin glycoside, QG)를 표준 물질로 하여 thin-layer chromatography (TLC silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany)를 실시하였다. 전개 용매는 CHCl_3 : MeOH : H_2O (70 : 30 : 4)으로 흘려주었으며, 결과적으로 Fr.2에서 QG가 함유된 것으로 판단되어 본 연구에서는 콤부차의 Fr.2 분획물(K-QG)을 동결 건조하여 최종 시료로 사용하였다.

2.1.2. 효능평가에 사용된 시약

본 실험에 사용된 HaCaT cell은 한약 진흥재단(Korea)에

서 분양받아 사용하였다.

세포 배양에 사용된 fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)와 세포독성 측정에 사용된 MTT 시약은 Sigma aldrich Co., Ltd. (USA)에서 구입하여 사용하였으며, Trypsin-EDTA는 Gibco Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

안티폴루션 효과를 위한 benzo[e]pyrene (B[e]P)과 fine dust (PM₁₀-like)는 Sigma aldrich Co., Ltd. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

Western blot을 위한 rnpa buffer, protease inhibitor, phosphatase inhibitor 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구매하였으며, 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (USA)에서 구매하였다. 1 차 항체 AhR은 Abcam (USA), 2 차 항체 horseradish peroxidase-conjugated는 Santa Cruz (USA)에서 구입하였으며, AhR 발현을 위한 benzo[a]pyrene (B[a]P)는 Sigma aldrich Co., Ltd. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.1.3. 실험에 사용된 기기

본 실험에 사용된 기기는 ELISA reader (Spectra max 190, Molecular devices, Sunnyvale, USA), freeze dryer (FD8512, Ilshin, Korea), autoclave (JSAT-65 jsr, Hanbaek Scientific Co., Korea), microscope (CKX41, Olympus Co., Ltd., Japan), rotary vacuum evaporator (N-12, Rikakikai Co., Ltd., Japan), digital reciprocating shaker (SHR-1D, Daihan scientific Co., Ltd., Korea), western imaging system (CAS-400SM, Davinchi-K Co., Ltd., Korea), CO₂ incubator (VS-9160GC, Hanbaek Scientific Co., Korea)를 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 세포 배양(HaCaT Cell)

본 실험에 사용한 HaCaT cell은 10% Fetal Bovine Serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. Phosphate buffer saline (PBS)로 2 번 세척 후 trypsin-EDTA를 사용해서 분리시킨 뒤 세포를 계대 배양 하였다.

2.2.2. MTT Assay에 의한 세포독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael의 방법[15]에 따라 측정하였다. 96 well plate에 HaCaT cell을 1×10^4 cells/well을 분주하고 24 h 뒤 시료를 DMEM 배지를 용매로 하여 10, 25,

50, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 희석한 후 20 μL 첨가하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 그 후 2.5 mg/mL 농도로 만든 MTT 용액을 20 μL 첨가하여 4 h 동안 반응시키고 상등액을 제거 후 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μL 를 첨가하여 실온에서 10 min 반응시키고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. 안티폴루션(Anti-pollution) 효과 측정

안티폴루션 효과는 96 well plate에 HaCaT cell을 1×10^4 cells/well을 분주하고 24 h 뒤 상등액 제거 후 혈청 무첨가 DMEM 배지로 교환하고 B[e]P과 fine dust (PM₁₀-like)를 150 $\mu\text{g/mL}$ 처리하여 자극해준다. 그리고 시료를 10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 희석한 후 20 μL 첨가하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 그 후 2.5 mg/mL 농도로 만든 MTT 용액을 20 μL 첨가하여 4 h 동안 반응시키고 상등액을 제거 후 각 well에 DMSO 100 μL 를 첨가하여 실온에서 10 min 반응시키고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4. Western Blot을 통한 단백질 발현 측정

AhR 단백질 발현량 측정을 위해 FBS 첨가 DMEM 배지를 활용하여 HaCaT cell을 6 well plate에 1×10^6 cells/well 도포 후 24 h 동안 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 시료를 농도별로 처리하고 B[e]P 150 $\mu\text{g/mL}$ 로 자극하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양시켜 증감 속 독성완화 효과 및 안티폴루션 효과를 측정하였다. 그 뒤

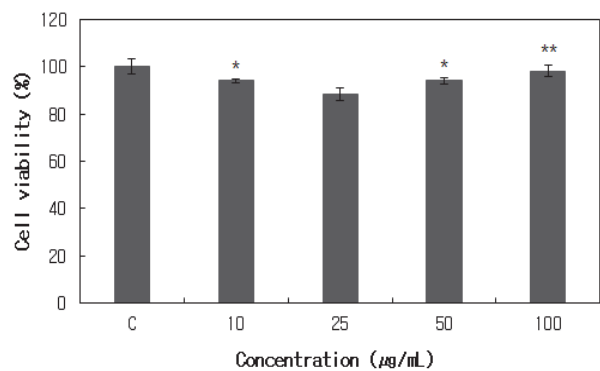


Figure 1. Cell viability of HaCaT cell on each concentration of K-QG.

C: B[e]P-not treated, K-QG: Kombucha-quercetin glycoside. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate data. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control.

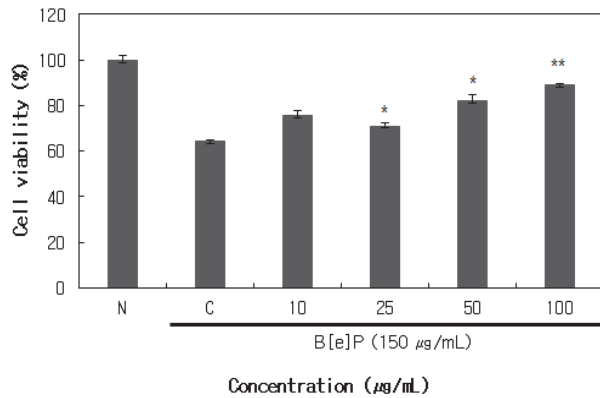


Figure 2. Cell viability on B[e]P of HaCaT cell on each concentration of K-QG.

N: B[e]P-not treated, C: B[e]P-treated, K-QG: Kombucha-quercetin glycoside. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate data. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control.

배지를 제거하고 cold PBS로 2 회 세척 후 radioimmunoprecipitation assay (RIPA buffer)로 세포를 용해시키고 4 °C, 12,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리 시킨 뒤 얻은 상등액을 새 튜브에 옮긴다. 단백질은 bicinchoninic acid (BCA assay) 기준으로 정량하였으며, 20 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용해 크기별로 분리해주었다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer 해주고 항체의 비특이적 반응을 막기 위해 membrane을 5% skim milk로 2 h blocking 한 다음 1 차 항체 over night 후 1 \times tris buffered saline with tween 20 (TBST)로 10 min 3 번 세척하였다. 그 다음 membrane에 각 항체의 숙주에 해당하는 2차 항체를 1 : 1,000으로 희석하여 1 h동안 반응시킨 후, 1 \times TBST로 10 min 3 번 세척하고 Davinch western imaging system을 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

2.2.5. 통계 처리

본 연구의 실험 결과는 3 회 반복하였으며, 실험결과를 mean \pm SD로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's *t*-test 방법으로 분석하였으며, 유의성 수준은 *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HaCaT Cell의 세포독성 확인

K-QG에 의한 HaCaT cell의 세포 생존율을 MIT assay를

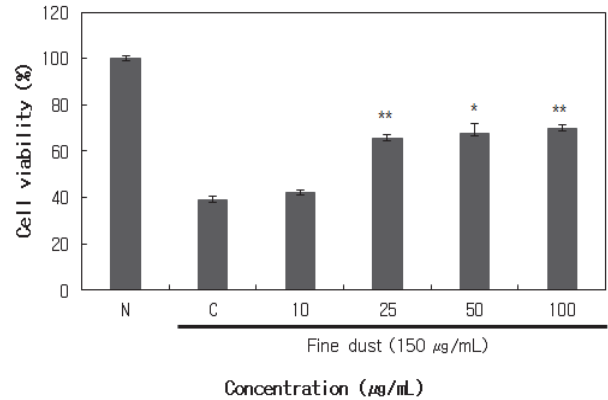


Figure 3. Cell viability on fine dust of HaCaT cell on each concentration of K-QG.

N: fine dust-not treated, C: fine dust-treated, K-QG: Kombucha-quercetin glycoside. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate data. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control.

통해 확인하였다(Figure 1). 10, 25, 50, 100 µg/mL 농도별로 측정된 결과 100 µg/mL까지 90% 이상의 생존율을 보였으며, 후에 western blot 실험에서 25, 50, 100 µg/mL 농도 구간으로 설정하여 진행하였다.

3.2. B[e]P 자극에 의한 세포 생존율 확인

HaCaT cell에 B[e]P으로 자극만 준 대조군은 무처리군보다 36% 사멸하였다. B[e]P 처리군에 K-QG를 10, 25, 50, 100 µg/mL 농도별로 처리하였을 때, 100 µg/mL 농도에서 대조군에 대비하여 68.79% 이상 개선 효과를 보였다. 결과로 보아, K-QG는 중금속으로부터 피부 개선 효과가 우수한 것을 확인하였다.

3.3. Fine Dust (PM₁₀-like) 자극에 의한 세포 생존율 확인

HaCaT cell에 fine dust로 자극만 준 대조군은 무처리군보다 62%가 사멸하였다. B[e]P 처리군에 K-QG를 10, 25, 50, 100 µg/mL 농도별로 처리하였을 때, 대조군에 대비하여 100 µg/mL 농도에서 약 50.68% 이상의 개선 효과를 보였다. 결과를 보아, K-QG는 미세먼지로부터 피부 개선 효과가 우수한 것을 확인하였다.

3.4. Western Blot을 통한 AhR 단백질 발현 확인

중금속 독성완화 효과를 보기 위해 B[e]P에 의해 유도되는 AhR 단백질 발현에 K-QG를 처리하여 측정하였다

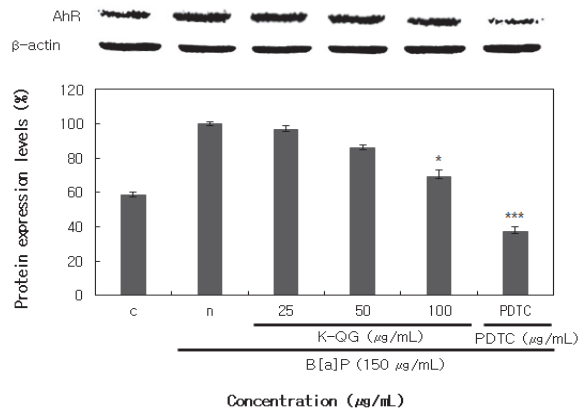


Figure 4. Inhibitory effects of K-QG on the protein levels of AhR in HaCaT cell.

N: B[e]P-not treated, C: B[e]P-treated, K-QG: Kombucha-quercetin glycoside. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate data. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control.

(Figure 4). 결과적으로 B[a]P 150 $\mu\text{g/mL}$ 으로 발현이 증가된 AhR이 양성 대조군인 PDTC를 처리했을 때 발현이 감소하는 것을 확인하였고, K-QG를 농도별로 처리했을 때 발현이 대조군에 대비하여 31.08% 억제되는 것을 확인하였다.

4. 결론

본 연구에서는 콤부차를 분획한 후, QG가 포함된 분획물을 활용하여 안티폴루션 효과를 확인하였다. HaCaT cell에서의 세포 독성을 확인하고, B[e]P와 fine dust로 자극한 뒤, 세포 생존율과 AhR 발현율을 측정하여 중금속 완화 효과를 연구하였다. 연구 결과, HaCaT cell에 대한 세포 독성은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 영향을 미치지 않았으며, B[e]P와 fine dust로 자극한 HaCaT cell에 대해 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 68.79%, 50.68%의 개선율을 보였다. 또한, B[a]P에 대한 독성 완화 효과를 확인하기 위해, aryl hydrocarbon receptor (AhR) 발현을 확인한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 31.08%의 억제율을 보였다. 결론적으로, 콤부차 분획물의 안티폴루션 효과를 보기 위해 중금속과 미세먼지 그리고 AhR 발현을 통해 확인함으로써 피부 보호 및 개선, 중금속 독성 완화의 안티폴루션 기능이 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부의 위키지역중소기업 Scale-up

R&D사업(과제번호: GB2020-64)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. C. Hwang, Particulate matter management policy of Seoul: Achievements and limitations, *The Korea Asso. Policy Stud.*, **27**(2), 27 (2018).
2. World Health Organization, Air Quality Guidelines, 2nd Ed., World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark (2000).
3. E. J. An and J. H. Kim, The survival rate of cultured epithelial keratinocyte cell and dermal fibroblast cell treated with particulate matter (PM₁₀), *J. Kor. Soc. Cosmetol.*, **25**(4), 822 (2019).
4. J. K. Choi, I. S. Choi, K. K. Cho, and S. H. Lee, Harmfulness of particulate matter in disease progression, *J. Life Sci.*, **30**(2), 191 (2020).
5. K. Higashisaka, M. Fujimura, M. Taira, T. Yoshida, S. Tsunoda, T. Baba, N. Yamaguchi, H. Nabeshi, T. Yoshikawa, M. Nasu, Y. Yoshioka, and Y. Tsutsumi, Asian dust particles induce macrophage inflammatory responses via mitogen-activated protein kinase activation and reactive oxygen species production, *J. Immunol Res.*, **2014**, (2014).
6. C. Esser, I. Bergen, H. Weighardt, T. Haarmann-Stemann, and J. Krutmann, Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin, *Semin Immunopathol.*, **35**(6), 677 (2013).
7. F. Masutaka, T. Masakazu, N. Takeshi, and U. Hiroshi, Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis, *Arch Dermatol Res.*, **306**(9), 769 (2014).
8. M. K. Kim, H. J. Woo, D. H. Park, and E. S. Jung, Air pollution and skin health: Recent studies, *J. Skin Barrier Res.*, **20**(2), 15 (2018).
9. C. Gotz, R. Pfeiffer, J. Tigges, K. Ruwiedel, U. Hübenenthal, H. F. Merk, J. Krutmann, R. J. Edwards, J. Abel, C. Pease, C. Goebel, N. Hewitt, and E. Fritsche, Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D epidermis model and keratinocyte-based cell culture as *in vitro* alternatives for chemical testing: Phase II enzymes, *Exp Dermatology*, **21**(5), 364 (2012).
10. R. V. Malbasa, E. S. Loncar, and L. A. Kolarov, TLC

- analysis of some phenolic compounds in Kombucha beverage, *Acta Periodica Technologica*, **35**, 199 (2004).
11. J. Y. Kim, H. J. Shin, H. J. Lukas. Kim, H. Park, P. K. Kim, S. Park, and S. H. Kim, The compositional and functional properties of Kombucha: A literature review, *Food Eng. Prog.*, **24**(1), 1 (2020).
 12. Danielle L. St-Pierre, Ph. D. Dissertation, Maine Univ., Marine, USA (2019).
 13. R. Vijayaraghavan, M. Singh, P. V. Rao, R. Bhattacharya, P. Kumar, K. Sugendran, O. Kumar, S. C. Pant, and R. Singh, Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea, *Biomed. Environ sci.*, **13**(4), 293 (2000).
 14. S. C. Chu, and C. S. Chen, Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha, *Food chem.*, **98**(3), 502 (2006).
 15. J. Carmichael, W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, **47**(4), 936 (1987).