

## 활성 산소로 산화적 스트레스가 유도된 사람 정상 섬유아세포에 대한 콤부차 발효 배양액의 항산화 효능

이상은 · 최진석\* · 이강훈 · 김국환\*\* · 권영이#

STC 생명과학연구원 신약개발연구소, \*한국화학시험연구원, \*\*동덕여자대학교 약학대학

(Received March 3, 2003; Revised March 28, 2003)

## Antioxidant Effect of Kombucha Broth Against Senescence Induced Normal Human Diploid Fibroblasts with Oxygen Free Radicals

Sang Eun Lee, Jin Seok Choi\*, Kang-Hoon Lee, Kuk-Whan Kim\*\* and Young-Ee Kwon#

Drug Discovery Institute, STC Life Science Center, Seoul 121-042, Korea

\*Korea Testing & Research Institute for Chemical Industry, Pusan 601-013, Korea

\*\*College of Pharmacy Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract** — Kombucha fermentation broth has been used as a popular health beverage and an alternative therapy with prophylactic and therapeutic benefit. We tried to establish optimal culture conditions for Kombucha fermentation in milk and to investigate cytotoxicity and antioxidative enzyme activity of Kombucha broth against normal human fibroblasts. The optimal conditions of Kombucha culture were established to 30°C, 20~23 hours by DPPH radical scavenging test. There were positive effects on cell growth while no cytotoxicity against primary normal human diploid fibroblasts was found. The activities of glutathione peroxidase and catalase in the cells treated by hydrogen peroxide (1 mM) alone and by hydrogen peroxide with Kombucha broth (1 mg/ml) were significantly different ( $p < 0.05$ ). These results suggest that Kombucha broth could be developed as an antioxidant agent for a new cosmetic material.

**Keywords** □ Antioxidant activity, kombucha broth, human diploid fibroblasts

콤부차(Kombucha)에 대한 정확한 자료는 전해오지 않으나 기원전 약 200년경부터 극동지역에서 그 배양액이 음용되기 시작되어 중앙아시아나 우랄 지방을 통해서 전해진 것으로 추측되며, 제 2 차 세계 대전 때 미국, 러시아, 독일 등 유럽등지로 확산되었다고 전해지고 있다.<sup>1)</sup> 콤부차는 티베트의 스님들이 절에서 애용한다하여 티베트 버섯으로도 불리우기도 하며 인간의 질병 치료에도 유용하게 적용되어 왔다. 홍차 뿐만 아니라 우유를 발효시키는 것은 1908년 생리학과 의학분야에 노벨상을 수상한 매치니 코프에 의해 발견되었고(<http://soni.hihome.com/soni-1-10.html>) 또한 *Acetobacter xylinum*과 다양한 효모의 공생체로, 효모인 *Brethanomyces*, *Zygosaccharomyces*와 *Saccharomyces*의 비율이 각각 56%, 29%, 26%로 존재하며<sup>2)</sup> 항균활성,<sup>3)</sup> 항산화 활성<sup>4)</sup> 등의 효능이 있는 것으로 보고되어 있으며, 콤부차 배양액의 주성분

은 gluconic acid, fructose, acetic acid 등으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 민간에서는 '홍차버섯차'라는 이름으로 각종 질병 악화 억제, 관절염, 관절염, 건선, 변비, 소화불량, 고혈압등에 효과가 있다고 구전되어 민간요법으로 사용되고 있으나, 그 효능에 대한 과학적 자료는 미비한 편이다.<sup>7,8)</sup>

인체에서 생성되는 유리 자유 라디칼들은 생체 내 각종 효소 반응에 의해 생성되어 생리 활성 물질의 생합성, 면역기능, 약물의 대사 등에서 매우 중요한 역할을 하지만 그 반응성이 매우 커서 간섭유화,<sup>9,10)</sup> 신장염,<sup>11,12)</sup> 피부질환,<sup>13)</sup> 당뇨병,<sup>14)</sup> 염증, 발암, 동맥경화<sup>15,16)</sup> 등 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있다. 생체에서 이들의 과잉 생성시 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT) 등의 효소를 발현시켜 항상성을 유지하고 있다.

현대 사회가 공업화, 도시화되면서 환경오염과 각종 약물에 의한 과잉의 유리 자유 라디칼과 활성 산소류의 증가로 생체 폐해 발생 가능성이 문제점으로 제기되고 있다. 따라서, 자유 라디칼을 안정화하거나 생성을 방지하는 신규 항산화 물질을 개발하기

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3438-0550 (팩스) 02-511-6705  
(E-mail) yekwon@stc365.com

위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 현재까지 비타민 A, C, E를 포함한 수많은 항산화 물질이 밝혀지고 있으나 항노화 원료 대부분은 화장품 제형 내에서 불안정성과 생체 이용률의 한계가 있었다.

향상산업의 발달과 더불어 항장 신소재 개발에 대한 산업적 중요성이 부각됨에 따라 2000년 7월 화장품법의 시행과 함께 기능성 화장품의 명문화로 기능성 신소재 및 신제형 연구 개발이 활발해지고 있다. 특히 천연물을 이용한 항장소재 연구는 기능성 화장품 원료개발에 활용되어 국제적으로도 우리 고유의 경쟁력을 확보할수 있는 부분이다. 최근 콤부차 발효 배양액의 여러 생리 활성에 대하여 보고되었고,<sup>3-8)</sup> 민간에서 널리 콤부차 발효유가 시음되고 있으며, 유산균 발효유와 항산화 활성을 가진 천연물들이 사람의 노화 피부에 좋은 영향을 주는 항장 원료로 기업체에서 사용하고 있다는 점에 착안하여, 본 실험에서는 콤부차 발효 배양 최적 조건을 확립하고, 이 배양액이 활성 산소로 노화를 유도한 인간 정상 섬유아세포에 대하여 항산화 기전과 관련된 SOD, GPx, CAT의 활성을 분석함으로써 새로운 항장 소재로서의 가능성을 모색하고자 하였다.

## 실험방법

### 실험재료

콤부차는 민간에서 배양하여 분양하는 것을 사용하였으며, 우유는 시중에서 유통되는 멸균유(해태우유, 룡우유)를 구입하여 사용하였다. DMSO, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], N-acetyl-L-cysteine 등은 시그마사의 제품을, 기타 용매는 덕산과학의 제품을 사용하였고, 세포 배양시 사용된 DMEM, FBS, antibiotics는 Gibco사의 제품을 사용하였다. 사람 정상 섬유아세포는 부천시 중동 비뇨기과의원에서 환자의 동의 하에 포경 수술시 폐기되는 포피 조직을 적출 직후 4°C DMEM 배지에 보관된 상태로 3시간 이내에 공급받아 세포를 분리하여 사용하였다. 기타 세포배양에 필요한 기구는 Falcon사의 제품을 사용하였다.

### 콤부차 배양 최적 조건

Seeramulu 등<sup>3)</sup>의 방법을 기준으로 약간 변형하여 콤부차 발효 배양 조건을 확립하는 데 이용하였다. 멸균유에 2% 콤부차(w/v)를 접종하여 배양 온도 25°C와 30°C에서 0~36시간 발효 후, 3시간 간격으로 각각의 발효 배양액을 10분간 7,000 rpm으로 원심분리하여, 상등액의 수소이온농도(pH), 흡광도(600 nm)를 측정하고 잔사의 무게를 평량하였다. 콤부차 접종후 발효 배양액중 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 배양 조건을 설정하기 위하여 14~36시간 발효 상등액에 대한 DPPH test<sup>17)</sup>를 시간별로 실시하였다.

### 콤부차 배양액 추출

최적의 배양 조건에서 배양된 콤부차 발효 배양액을 10분간 7,000 rpm으로 원심분리후, 상등액에 70% 에탄올을 가하여 생성되는 침전물을 다시 원심분리하여 상등액을 취하고 감압 농축후 동결건조하여 얻어진 추출물을 시료로 사용하였다. 이하 이 배양액 추출물은 콤부차 배양액(Kombucha broth)으로 표기하였다.

### 인간 섬유아세포의 일차 세포배양

포피조직의 표피와 진피를 분리후, 진피에서 섬유아세포를 분리하여 형태를 확인하였다. 확인된 섬유아세포를 DMEM/F12(3:1) 배지에 10% FBS(fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin 가하여 25 cm<sup>2</sup> 조직 배양 flask 내에서 배양기 내부 공기 5% CO<sub>2</sub> 농도로 37°C에서 3~5일간 안정화하였다. 안정화 후 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 계대 배양하였으며, 초기 계대 세포(passage 7)를 사용하였다.

### 인간 정상 섬유아세포 생존율

96-well plate에 대수증식기 인간 정상 섬유아세포 2×10<sup>4</sup>개/well 씩 접종하여 24시간 배양한 후, 콤부차 발효 배양액의 최종 농도가 각각 0.1, 0.5, 1, 3, 5% 되도록 가하여 혈청을 가하지 않은 DMEM/F12 배지에서 72시간 배양하였다. MTT 용액 50 μl (5 mg/ml)씩 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 DMSO 100 μl씩 첨가한 후 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(%)은 다음과 같은 식으로 계산하여 나타내었다.

세포생존율(%)

$$= 100 - \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{발효액처리시의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

### 항산화 효소의 활성 변화 측정

**시료 효소 용액의 조제** - 일차배양 사람 정상 섬유아세포의 초기 7번째 계대 배양 세포 4×10<sup>6</sup> cells/ml를 T75 flask에 가한 후 배양기내 5% CO<sub>2</sub> 농도하, 37°C에서 24시간 동안 안정화시킨다. 세포가 flask의 약 80% 정도 자라면 세포의 노화를 유도하기 위하여 여기에 최종 농도 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 2시간 처리하였다. 혈청이 첨가되지 않은 새로운 배지에 음성 대조군은 그대로, 양성 대조군은 N-acetyl-L-cysteine(1 mg/ml)을 처리, 시험군은 콤부차 발효 배양액(1 mg/ml)을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 세포를 수집하여 빙냉하여 30초 동안 1분 간격으로 5회 sonication하여 4°C 14,000 rpm, 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 시료 효소 용액으로 사용하였다. 단백질양은 BSA (bovine serum albumin)를 표준으로 Bradford assay에 의해 정량하였다.

**Table I** – The changes of residue weight, absorbance and pH according to time course in Kombucha broth 2% Kombucha (w/v) was seeded in sterilized milk and incubated at 25°C and 30°C separately. After fermentation of Kombucha and milk mixture during 0~36 hours, the each fermented Kombucha broths were centrifuged 7,000 rpm, 10 min. Each test sample of the upper solution and the residue was collected per 3 hours.

time	25°C			30°C		
	residue weight (g/100 ml)	absorbance (600 nm)	pH	residue weight (g/100 ml)	absorbance (600 nm)	pH
0	6.0	3.31	6.4	6.0	3.31	6.4
3	6.0	3.30	6.4	6.0	3.31	6.1
6	6.3	3.31	6.4	9.3	3.31	5.9
9	6.5	3.31	6.4	9.5	3.31	5.6
12	7.3	3.31	6.4	9.3	3.31	5.5
15	7.5	3.31	5.9	10.0	3.31	5.3
18	7.5	3.32	5.7	17.0	0.20	4.9
21	7.5	3.29	5.3	30.0	0.18	4.7
24	12.5	0.54	5.3	34.0	0.17	4.6
27	15.5	0.56	4.9	33.8	0.13	4.5
30	30.0	0.18	4.6	34.5	0.14	4.6
33	30.5	0.18	4.6	33.7	0.21	4.8

**Superoxide dismutase(SOD)** – SOD의 활성 측정은 Martin 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 50 mM 인산용액(K.P. buffer)에 5 mM hematoxylin, 시료 효소액을 용량별(10, 30, 60 μl)로 각각 첨가하고 최종 반응액이 1.5 ml되게 하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 산정하였다. 효소액을 넣지 않고 반응시킨 5 mM hematoxylin액의 흡광도 증가를 50% 억제하는 SOD의 양을 1 unit로 결정하였다.

**Glutathione peroxidase(GPx)** – GPx의 활성측정은 Paglia 등의 방법<sup>19)</sup>에 준하여 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.2), 0.64 M reduced glutathione(GSH), 1 unit/ml glutathione reductase, 6 mM NADPH, 시료 효소액을 가하여 전체 반응액이 3 ml 되도록 하여 25°C, 5분간 반응시킨후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 없는 상태에서 NADPH 소비를 관찰하고, 0.75 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 ml 가하여 340 nm에서 5분간 NADPH의 산화에 의하여 감소되는 흡광도의 변화를 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백 질이 산화시킨 NADPH의 양을 nM로 나타내었다.

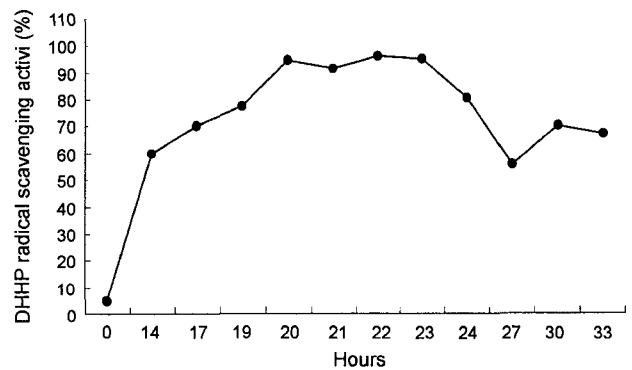
**Catalase(CAT)** – 0.05 M 인산용액(K.P. buffer, pH 7.2)에 10.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 되도록 기질용액을 만든 후, 기질용액 3 ml에 시료 효소액 20 μl를 가하여 25°C, 30초간 반응시킨 후 240 nm에서 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성값은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nM degraded/min/protein 1 mg으로 나타내었다.<sup>23)</sup>

**Data 분석** – 실험은 3 회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 mean ± S.E로 표시하였으며, Student's t-test를 시행하여 p<0.05 인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

**실험 결과 및 고찰**

**콤부차 발효 배양액의 최적 배양 조건**

콤부차 최적 배양 조건은 수소이온농도(pH), 흡광도 및 잔사

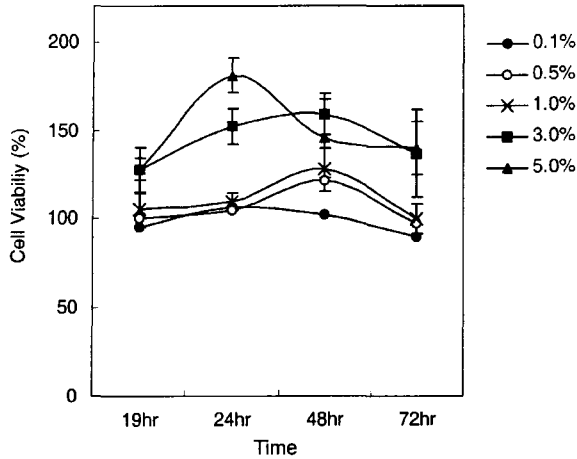


**Fig. 1** – The change of DPPH radical scavenging activity according to time course in Kombucha broth cultured at 30°C. The optimal conditions of Kombucha culture were established at 30°C, 20~23 hours. *l*-Ascorbic acid (0.01 mg/ml) was shown about 90% inhibition rate and the each Kombucha broths 20, 21, 22 and 23 hours cultured were shown about 90% inhibition rate by DPPH radical scavenging test.

의 무게를 측정하여 Table I에 나타난 조건에서 발효 온도는 25°C 보다는 30°C가 더 적합할 것으로 판단된다. 30°C에서 14~36시간 경과에 따른 콤부차 발효 배양액의 DPPH 라디칼 소거 시험 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 기존 항산화제인 *l*-ascorbic acid (0.01 mg/ml)는 약 90%의 저해율을 나타내었고, 콤부차 배양액은 약 20~23시간 배양시 약 90% 저해율을 보여주었다. 이는 콤부차 대량 배양시 최적 조건을 확립할 때 생리활성이 가장 높은 발효 시간을 설정하는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

**콤부차 배양액의 인간 정상 섬유아세포에 대한 생존율**

콤부차 발효 배양액이 사람의 정상 섬유아세포의 세포독성 및 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 7번째 계대배양된 세포 (2×10<sup>4</sup>개/well)를 24시간 안정화하여 최종 농도 0.1, 0.5, 1, 3,



**Fig. 2** – The effect of cell growth according to each concentration of Kombucha broth in normal Human diploid fibroblasts. The results represents the mean±S.E. of three separate experiments (triplicate cultures per point in each experiment) using MTT assay against primarily cultured normal human diploid fibroblasts.

5% 콤부차 배양액 처리 후 72시간 동안 배양시 세포 생존율을 MTT assay 결과로 Fig. 2에 나타내었다. 혈청이 첨가되지 않은 배지를 사용하여 배양하였을 때 세포독성이 나타나지 않아 사람 정상 피부세포에 대한 증식 저해는 일어나지 않을 것으로 판단된다. 0.1% 콤부차 배양액의 경우 24시간 배양시 105.8%, 48시간시 102.3%의 세포 생존율을, 0.5%와 1%의 경우 48시간 배양시 약 120%의 세포 증식율을 나타내었고, 3%와 5%의 경우 24시간 배양시 약 150~180% 정도 급격히 증식하였다가 시간이 흐를수록 증식율은 감소하여 72시간 경과후에는 약 130% 정도의 세포 증식율을 나타내었다. 따라서 0.1~5% 농도의 콤부차 발효 배양액은 사람의 정상 섬유아세포에 대하여 독성이 나타나지 않았으므로 피부 독성면에서 볼때 화장품 원료로 사용이 가능하리라 생각한다. 또한 콤부차 배양액이 활발한 세포 증식을 나타내지 않고 완화된 세포 증식을 나타내었으므로, 피부 세포가 암(癌)화될 가능성은 희박하며, 노화 피부세포의 활성화를 가져와 노

화방지의 효능을 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 다만 이 부분은 향후 그 기전과 효능에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 보인다.

**사람 정상 피부 세포내 항산화 효소 활성 변화**

콤부차 발효 배양액의 사람 정상 섬유아세포에 대한 산화적 스트레스 억제 효과를 관찰하기 위해 세포내 항산화 효소인 SOD, GPx, CAT의 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Table II에 나타내었다. 노화를 유도하지 않은 대조군과 비교하여 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 군에서 항산화 효소 활성은 SOD는 증가하는 경향을, GPx와 CAT의 경우 유의성 있는 증가를(p<0.05) 나타내어 사람 정상 피부세포에 대한 노화유도가 되었다는 것을 알 수 있었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 시료를 첨가한 세포의 항산화 효소 활성 변화는 SOD의 경우 감소하는 경향을 보여주었고, GPx와 CAT의 경우 콤부차 발효 배양액(1 mg/ml)이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리하여 노화를 유도한 군보다 유의성있게 감소하였으며(p<0.05), N-acetyl-L-cysteine(1 mg/ml)을 처리한 세포의 활성은 CAT에서만 유의성있게 감소하였다(p<0.01). 피부가 산화적 스트레스를 받는 요인으로는 대기중의 자외선, 오존등에 의한 환경적인 요인과 흡주, 흡연 등의 생활습관에 의한 요인, 정신적 스트레스, 노화, 호르몬 변화 등으로 인하여 체내에서 생성되는 과산화물과 자유 라디칼 등에 의한 생체적인 요인 등이 있다. 0.1% 콤부차 발효 배양액(1 mg/ml)이 사람 정상 피부 세포에 대하여 세포독성이 없으며, 급격한 세포 증식을 가져오지 않고, 노화를 유도한 세포에서 산화적 스트레스를 억제하는 항산화 효소인 GPx와 CAT의 활성이 노화 세포의 활성에 비하여 유의성있게 감소하여 항장 소재로써 적합할 것으로 판단된다. 콤부차 배양액 중에는 gluconic acid, butyric acid 등 유기산 종류가 다량 함유되어있는데,<sup>6,7)</sup> 이 성분들은 노화방지를 위한 항장 원료로 일부 첨가되고 있기 때문에 노화 세포에 영향을 주었을 것으로 추정된다. 콤부차 배양액의 피부 섬유아세포에 대한 항산화 활성 결과가 피부 노화 방지 효능과 일치한다고 결론지을 수 없으나 피부 세포의 노화방지 또는 치료 효능을 나타내기 위

**Table II** – The antioxidative enzyme activities in senescence induced normal human diploid fibroblasts

group	SOD	GPx	CAT
	unit/mg protein <sup>a)</sup>	NADPH oxidized nM/mg protein/min	nM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> decreased/mg protein/min
control	3.198±0.595 <sup>b)</sup>	0.591±0.112	27.977±0.903
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.599±0.778	1.327±0.240 <sup>c)</sup>	50.319±3.574 <sup>**d)</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC	4.086±0.691	0.891±0.031	28.440±2.468 <sup>**e)</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +KB	3.643±0.622	0.626±0.077 <sup>f)</sup>	32.685±4.886 <sup>**g)</sup>

The confluent human diploid fibroblasts were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 hrs. The cells were subcultured for 48 hrs in the fresh medium containing N-acetyl-L-cysteine or Kombucha broth. control: non-treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NAC: N-acetyl-L-cysteine (1 mg/ml) treated, KB: Kombucha broth extract treated (1 mg/ml). The each values are the mean±S.E. of three independent experiments.

<sup>a)</sup>50% inhibition of autoxidation of hematoxylin. <sup>b)</sup>Mean±S.E. (n=3), <sup>c)</sup>p<0.05, compared with the control group by Student's t-test. <sup>d)</sup>\*\*p<0.01 compared with the control group. <sup>e)</sup>\*\*p<0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. <sup>f)</sup>g)<sup>\*\*</sup>p<0.05, compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

한 환경 신소재 개발에 있어서 항산화 활성 측정 단계는 필수적인 요소이며 향후 개발여부를 결정하는 중요한 기준이 될 것으로 사료된다.

**결 론**

본 연구에서는 널리 응용되고 있으나 아직 과학적인 자료가 미약한 새로운 소재인 콤부차 발효유 최적 배양 조건은 30°C, 20~23 시간으로 나타났다. 인간 정상 섬유아세포에 대하여 세포 독성을 나타내지 않고 세포 증식을 활성화함으로써 세포 재생작용이 있을 것으로 사료된다. 활성 산소로 산화적 스트레스를 유도한 인간 정상 섬유아세포 노화 모델에 콤부차 배양액을 처리하였을 경우 GPx와 CAT 활성이 콤부차 배양액을 처리하지 않은 노화 유도 세포에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내었으므로, 이를 이용하여 성분 규명 등 더 많은 연구가 뒷받침된다면 새로운 화장품 소재로써 이용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

**감사의 말씀**

사람 정상 피부 섬유아세포의 일차배양을 위하여 포피 조직을 제공하여준 중동 비노기과의원 홍두선 박사님께 감사드립니다.

**문 헌**

- 1) Stadelmann, E. : Der teepilz und Seine Antibiotische wirkung. *Zenthl. Bakteriол. Parasit. Inf. Hyg.* **180**, 401 (1961).
- 2) Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. and Ledford, R. A. : Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J. Food Prot.* **63**, 976 (2000).
- 3) Seeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W. : Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2589 (2000).
- 4) Sai Ram, M. Anju, B., Pauline, T., Dipti, P., Kain, A. K., Mongia, S. S., Sharma, S. K., Singh, B., Singh, R., Ilavazhagan, G., Kumar, D. and Selvamurthy, W. : Effect of Kombucha tea on chromate (VI) - induced oxidative stress in albino rats. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 235 (2000).
- 5) 김종철, 변홍철, 이호훈, 정수근, 신상숙 : 콤부차소식, 녹색평론 53호, 녹색평론사, 대구 p. 218 (2000).
- 6) Fauline, T., Dipti, P., Anju, B., Kavimani, S., Sharma, S. K.,

- Kain, A. K., Sarada, S. K., Sairam, M., Ilavazhagan, G., Devendra, K. and Selvamurthy, W. : Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea. *Biomed. Environ. Sci.* **14**, 207 (2001).
- 7) O'Neill, M. : *A magic mushroom or a toxic fad*, NewYork Times, Dec 28, C-1, C-4, C-6, C-8 (1994).
- 8) Jacobs, S. : *Kombucha use as miracle cure spreading like mushroom*, The Miami Herald, Jan 2, 1F (1995).
- 9) 안영근, 김정훈, 채병숙, 차광재 : 염화아연이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. *약학회지.* **36**, 291 (1992).
- 10) Shankar, A. H. and Prasad, A. S. : Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 447S (1998).
- 11) Keen, C. L. and Gershwin, M. E. : Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* **10**, 415 (1990).
- 12) James, S. J., Swendseid, M. and Makinodan, T. : Macrophage mediated depression of T-cell proliferation in zinc-deficiency mice. *J. Nutr.* **117**, 1982 (1987).
- 13) Van Rensburg, S. J. : Promotion of methylbenzyl nitrosamine-induced esophageal cancer in rats by subclinical zinc deficiency. *Nutr. Rep. Int.* **22**, 891 (1980).
- 14) Prasad, A. S., Beck, F. W., Grabowski, S. M., Kaplan, J. and Mathog, R. H. : Zinc deficiency : changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer subjects. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **109**, 68 (1997).
- 15) Tanaka, Y., Shiozawa, S., Morimoto, I. and Fujita, T. : Role of zinc in interleukin 2(IL-2)-mediated T-cell activation. *Scand. J. Immunol.* **31**, 547 (1990).
- 16) Skerka, C., Decker, E. L. and Zipfel, P. F. : A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 22500 (1995).
- 17) Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. and Namba, T. : Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1580 (1996).
- 18) Martin, J. P., Jr. Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and Positive Assays Superoxide Dismutase Based on Hematoxylin Autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 329 (1987).
- 19) Paglia, E. D. and Valentine W. N. : Studies on the quantitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158 (1967).