



Research Article

Physiochemical properties and anti-proliferative activity against human lung cancer cells of *kombucha* using sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits

꾸지뽕나무 열매 당침액 이용 콤부차의 이화학적 품질 특성 및 인체 폐암세포 항증식 활성

MiAe Cho^{1‡*}, Kyoung Ju Song^{1‡}, Jinwook Lee², Chang Moo Lee¹, Ho Chil Choi¹, Jong Cheol Park¹
조미애^{1‡*} · 송경주^{1‡} · 이진욱² · 이창무¹ · 최호철¹ · 박종철¹

¹Cheonsu Mountain Medicinal Herb Research Association, Seongnam 13637, Korea

²Department of Plant Science and Technology, Chung Ang University, Anseong 17546, Korea

¹사단법인 천수산약초연구회, ²중앙대학교 생명자원공학부



OPEN ACCESS

Citation: Cho MA, Song KJ, Lee J, Lee CM, Choi HC, Park JC. Physiochemical properties and anti-proliferative activity against human lung cancer cells of *kombucha* using sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits. Food Sci. Preserv., 31(4), 673-681 (2024)

Received: April 16, 2024

Revised: May 28, 2024

Accepted: June 18, 2024

[‡]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author

MiAe Cho

Tel: +82-31-698-3737

E-mail: agar0818@daum.net

Copyright © 2024 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract This study was conducted to develop *kombucha* with better functionality. The developed *kombucha* (CK) was prepared using the sugar extracts from fruits of *Cudrania tricuspidata* (Carrière) Bureau ex Lavallée instead of the sugar, which is used as a substrate for SCOBY in conventional *kombucha* (K). During fermentation, the soluble solids content significantly decreased in CK compared to K, and the pH change decreased rapidly in CK compared to K. On the 14th day of fermentation, the weight of the SCOBY in CK was higher than that in K. Immediately after preparation, K contained only sucrose, but CK contained sucrose, glucose, and fructose. SCOBY appears to use glucose and fructose preferentially during fermentation. K contained acetic acid and citric acid right after preparation. However, as fermentation progressed, the composition changed to acetic acid, citric acid, and lactic acid. At the same time, CK initially consisted of citric acid, lactic acid, and acetic acid. However, acetic acid and citric acid increased but lactic acid decreased significantly on the 14th day of fermentation. In the cytotoxicity studies, the CK showed a proliferation-promoting effect on normal lung cells (MRC-5) and strong cytotoxicity against human lung cancer cells (A549). These results suggest that the *kombucha* made from sugar extracts of *C. tricuspidata* fruits can be used as a more functional beverage than regular *kombucha*.

Keywords *kombucha*, *Cudrania tricuspidata*, physicochemical property, A549 cell, functional beverage

1. 서론

콤부차(*kombucha*)는 신맛이 나는 무알콜 음료로 중국에서 기원된 것으로 알려져 있으며, 최근 국내는 물론 미국을 중심으로 많이 음용되고 있는 기능성 음료이다(Kim 등, 2020). 콤부차는 일반적으로 녹차나 홍차 등을 우려낸 물에 ‘모균’이나 ‘버섯’으로 불리는 박테리아와 효모가 포함된 스타터 (symbiotic culture of bacteria and yeast, SCOBY)를 넣고 당을 발효시켜 만든 건강음료이다 (Laureys 등, 2020). 발효과정 중 배양액 표면에 박테리아와 효모가 셀룰로오스(cellulose)를 생성하여 새로운 겔(gel)과 같은 막을 형성하는데, 이러한 막 형태를 스코비(SCOBY)라고 하며, 이는 새로운 콤부차를 만들 때 스타터로 이용된다(Antolak 등, 2021). 스타터에 들어있는 효모가 발효 과정에서 당을 분해하고 초산을 비롯한 다양한 유기산 생성(Jayabalan 등, 2007) 및 이산화탄소를 방출하여

스파클링 같은 풍미 좋은 신맛을 낸다(Laavanya 등, 2021). 콤부차에 사용되는 발효 기질 종류에 따라 콤부차의 조성을 변화시킬 수 있다. 대표적인 콤부차 발효 기질로는 홍차와 녹차가 있으며, 루이보스차 등 다양한 기질을 이용한 연구가 진행되고 있고(Gaggia 등, 2019), 발효 기간에 따른 이화학적 특성변화(Amarasinghe 등, 2018), 최근 전통적인 콤부차에 유자액이나 과일껍질 등 다양한 첨가물을 혼합하여 기능성이 증가된 콤부차의 제조에 대한 연구가 보고되었다(Lee와 Yi, 2023; Woo 등, 2021). 콤부차 구성 물질은 크게 폴리페놀성 화합물, 유기산, 당, 단백질 등이 있다(Jayabalan 등, 2014). 폴리페놀성 화합물에 속하는 플라보노이드는 강한 항암효과를 가지는 중요한 생리활성 물질이다(Kopustinskiene 등, 2020).

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* (Carrière) Bureau ex Lavallée)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로서 한국을 비롯한 일본, 중국과 러시아 동부지역 등에서 약 10여 종이 자생한다. 주로 꾸지뽕나무 잎과 뿌리껍질로부터 분리된 성분 및 추출물의 항염증, 항종양, 간보호, 신경보호 및 항응고 등에 대한 효과가 보고되어 있으며, 열매 추출물의 항산화, 항염증 및 항균 활성, 혈중 지질 수준 개선, 간 기능 개선 및 염증 개선에 관하여 보고되어 있으나 전반적으로 꾸지뽕나무의 생리활성에 관한 연구는 미미하다(Hwang 등, 2023). Li 등(2018)은 꾸지뽕나무로부터 분리된 생리활성 물질들의 천연 항암효과들에 대한 연구들을 보고하였고, Choi 등(2012)도 꾸지뽕나무의 부위별 즉, 줄기, 수피, 뿌리, 근피, 잎, 열매(미숙, 적숙, 과숙)의 MeOH 추출물이 암세포주 7종에 대한 세포독성에 대해 보고하였는데, 특히 근피와 뿌리가 HeLa(자궁암세포)와 MCF-7(유방암세포)에 대해 50% 미만의 생존율을 보여 항암효과가 높다고 보고하였다. 인체 폐암세포주인 A549에 대해서는 수피, 근피, 잎, 그리고 미숙과에서 약한 세포 독성을 보였다고 보고하였다. 우리나라와 중국에서는 뿌리나 나무껍질 등은 약용으로의 사용만 허용되어 있고, 열매는 식품과 약용으로 허용되어 있다.

당침(sugar extract)으로 추출한 약초 및 과실청은 저비용으로 유효성분의 안전한 추출 및 장기간 저장이 가능한 장점이 있고 타 가공식품의 기능성 향상 및 관능적 품질 개선용 부재료로 이용할 수 있어 응용 범위가 다양한 것으로 알려져 있다(Ahn 등, 2014). 약용식물 당침액을 이용한 건강음료 개발 시 미생물 발효를 통해 기호도와 기능성을 증가시키는 연구가 보고되고 있다(Bae 등, 2018). Khosravi 등(2019)은 대추야자 시럽(date syrup)을 첨가하여 제조된 콤부차에서 산도, 총페놀성 화합물, 항산화 활성, 유기산 함량 및 스코비의 함량이 증가되었음을 보고하여 기존 대추야자 음료보다 좀 더 건강하고 경제적으로도 이용가치가 증가된 콤부차의 활용을 제시하였다.

인체 폐암세포주인 A549에 대해서는 꾸지뽕나무 열매 미숙과만이 미미한 항암효과를 보였는데(Choi 등, 2012), 꾸지뽕나무 열매를 당침하여 장기간 숙성시켜 유효성분을 추출한 후 콤

부차로 조제시 콤부차가 가지는 항암 기능성에 시너지 효과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구는 콤부차 제조 시 자당(sucrose) 대신 꾸지뽕나무 열매 당침액을 사용하여 제조한 콤부차의 이화학적 품질 특성 및 폐암세포 증식 억제 효과를 확인하여 기존 콤부차에 비해 건강과 관련된 기능성이 증가된 콤부차를 제조하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에서 사용한 홍차잎(Dilmah, Ceylon Tea Company PLC, Peliyagoda, Sri Lanka)은 온라인 쇼핑몰(www.coupang.com)에서 구매하여 사용하였으며, 꾸지뽕나무 열매 당침액은 내장산 오디마을(Jeongeup, Jeonbuk State, Korea) 농장에서 채배한 꾸지뽕나무 열매와 자당을 1:1(w/w)로 배합하여, 6개월간 저온 숙성시켜 제조한 것을 구매하여 사용하였다. 꾸지뽕 당침액의 pH는 3.74, 당도는 50.0 °Brix였다.

본 실험에서 사용한 콤부차의 스타터는 유산균(lactic acid bacteria), 아세트산균(acetic acid bacteria) 및 효모균(yeast)이 복합적으로 함유된 발효 원액과 스코비 혼합물을 온라인 쇼핑몰(Gmarket)에서 local domestic kombucha로 분양 판매하는 것을 구매하여 사용하였다.

2.2. 콤부차 제조

구입한 홍차잎과 꾸지뽕나무 열매 당침액을 이용하여 콤부차를 조제하였다. 끓여서 65°C로 식힌 증류수 900 mL에 홍차 잎 3 g을 1시간 동안 침출시킨 후 자당 또는 꾸지뽕나무 열매 당침액을 첨가하여, 최종 가용성 고형물 함량을 9.3 °Brix로 맞추었고, 스타터를 40 g씩 첨가한 후 용기 입구를 멸균된 거즈로 막아 공기 유동이 자유롭게 하였다. 홍차잎을 침출한 직후의 pH는 5.32였다. 관행대로 자당(sucrose)을 첨가하여 제조한 콤부차는 대조군 K로 표기하였고, 처리구인 꾸지뽕나무 열매 당침액을 첨가한 콤부차는 꾸지뽕-콤부차 또는 CK로 표기하였다. 대조군과 처리군 모두 3반복으로 조제하였다. 실온(25-28°C)에 2주 동안 보관하면서 발효를 진행시켰으며, 일주일 간격으로 시료를 채취하여, 냉동보관(-58°C) 하면서 성분 분석시 해동하여 0.2 µm syringe filter(18075-D SartolabP20, Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과한 후 분석에 이용하였다.

2.3. 콤부차의 이화학적 품질 특성 분석

2.3.1. 가용성 고형물, pH 및 스코비 증량 변화

콤부차(K)와 꾸지뽕-콤부차(CK)의 가용성 고형물 함량의 측정은 시료 각 1 mL를 취하여 디지털 굴절 당도계(Pocket Refractometer PAL-1, Atago Co., Tokyo, Japan)로 측정하여

°Brix로 표시하였다. pH는 발효기간별(0, 7, 14일) 시료 10 mL를 취하여 pH meter(Seven Compact™ S210, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 발효 당일과 발효완료시(14일째)에 스크비의 중량을 디지털 저울(HS-310TT, HANSUNG Co., GwangMyeong, Korea)을 이용하여 측정하였다.

2.3.2. 유리당 분석

콤부차 발효기간별 유리당 함량은 Park 등(2012)의 방법에 따라 분석하였다. 콤부차 시료 5 mL를 0.2 µm hydrophilic filter(18075-D SartolabP20, Sartorius)로 여과하여 HPLC(UltiMate™ 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 300×6.5 mm Sugar-pak(WAT085188, Waters, Milford, MA, USA)을 이용하여 오븐온도 70°C, 용매는 3차 증류수로, 유속은 0.5 mL/min 조건으로 분석시료를 10 µL 주입하여 분석하였다. 표준물질은 과당(Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), 포도당(Junsei Chemical Co., Tokyo, JP), 및 자당(Sigma-Aldrich Inc.)을 사용하였다.

2.3.3. 유기산 분석

유기산 함량은 Nisperos-Carriedo 등(1992)의 방법을 응용하여 분석하였다. 콤부차 시료 5 mL에 증류수 15 mL를 첨가하여 균질기(T 18 digital ultra-turrax®, IKA®-WERKE GMBH & Co., Staufen, Germany)를 이용하여 15-20초간 균질화하였다. 추출용매가 30 mL이 되도록 증류수를 첨가한 후, 초음파 추출기(KSC-300, Kumsung ultrasonic, Busan, Korea)를 이용하여 30분간 추출하였다. 용매와 시료가 잘 섞이게 한 후, 추출물은 0.2 µm hydrophilic filter(18075-D SartolabP20, Sartorius)로 여과하여 HPLC(UltiMate™ 3000, Thermo Fisher Scientific Inc.)에 300×10 mm Aminex 87H column(HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 장착하여 오븐온도 40°C, 이동상 0.01N H₂SO₄ (Honeywell International Inc., Paris, France), 유속 0.5 mL/min 조건에서 분석시료를 10 µL 주입하여 분석하였다. 유기산 표준물질로는 구연산(Showa Kako Co., Osaka, Japan), 젖산(Honeywell International Inc.), 초산(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

2.3.4. 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량 분석

총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's 방법(Singleton 등, 1999)에 따라 콤부차 시료 0.1 mL, 증류수 8.4 mL, 2 N Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co.) 0.5 mL, 20% Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich Co.) 1 mL를 혼합하여 1시간 반응시킨 후 725 nm에서 분광광도계(EPOCH 2, Agilent, Santa Clara, CA, USA)

를 이용하여 흡광도 값을 측정하였다. 총페놀성 화합물 함량은 표준물질인 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 작성한 표준곡선으로 양을 환산하였고, µg gallic acid equivalent (GAE)/mL로 나타내었다. 총플라보노이드 함량은 catechin (Kogyo Co., Tokyo, Japan)을 표준품으로 사용하여 aluminium trichloride 방법으로 측정하였다(Zhishen 등, 1999). 콤부차 시료 125 µL를 75 µL의 5% NaNO₂ 용액(Thermo Fisher Scientific)에 첨가한 후, 혼합물을 6분 동안 방치한 후, 150 µL의 10% aluminium trichloride(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하고 5분 동안 반응시킨 다음, 750 µL의 1M NaOH(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하였다. 증류수를 사용하여 용액의 최종 부피를 2.5 mL로 조정하였다. 15분 동안 반응시킨 후 510 nm에서 분광광도계(EPOCH 2, Agilent)를 이용하여 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 µg CE/mL로 계산하였다.

2.4. 세포 배양

실험에 사용한 인체 폐암세포주(A549)와 인체 정상 폐세포(MRC-5)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. A549 세포주는 RPMI-1640(Welgene, Gyeongsan, Korea) 배지에, MRC5 세포주는 MEM(Welgene)배지에, 10% FBS(Gibco Inc., San Francisco, CA, USA)와 1% Penicillin(Gibco Inc.)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.5. 세포 독성 평가 및 폐암세포 성장억제 평가

콤부차의 세포 독성 및 폐암세포 성장 억제효과는 조제한 콤부차를 증류수로 5배 희석하여 인체 정상 폐세포(MRC-5) 및 인체 폐암세포(A549)에 투입한 후 생존율을 계산하여 평가하였다. 48-well cell culture plate(SPL Life Sci., Pocheon, Korea)에 세포 현탁액을 well 당 1.5×10⁴ cells/300 µL씩 처리하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 콤부차를 25 µL/well처리하고 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 이때 대조구로 PBS buffer를 사용하였다. 배양 후 세포생존율은 EZ-Cytox(DoGenBio Co., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. EZ-cytox의 WST(water soluble tetrazolium salt)는 물에 잘 녹는 수용성으로 살아 있는 세포의 dehydrogenase와 반응하여 오렌지 색의 수용성 formazan을 생성한다. Dehydrogenase는 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 효소로써 살아있는 세포에만 유효하다. 따라서 formazan의 생성은 살아있는 세포 수와 정의 상관관계를 가진다. Formazan의 생성은 흡광도 450 nm에서 측정하였고, 세포의 증식률 및 세포독성은 다음 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = [(\text{Exp.} - \text{Blank}) / (\text{Control} - \text{Blank})] \times 100$$

Exp.: Absorbance of a well with cell, test solution and

EZ-cytox

Blank: Absorbance of a well with medium and EZ-cytox, without cell

Control: Absorbance of a well with cell and EZ-cytox, without test solution

2.6. 통계처리

완전임의배치 요인 분석 실험 설계에 의거하여, 3회 반복 실험을 수행하였으며, 데이터는 평균값을 구한 후, 표준오차 (standard error, SE)로 나타내었다. 데이터는 SAS 통계프로그램(9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 Duncan의 다중비교법을 활용하여 평균간 다중비교를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 꾸지뽕나무 열매 당침액 이용 콤부차의 이화학적 품질 특성

3.1.1. 가용성 고형물 함량, pH 및 스코비 중량의 변화

꾸지뽕나무 열매 당침액을 첨가하여 제조한 콤부차(꾸지뽕-콤부차, CK)와 자당을 첨가하여 제조한 콤부차(대조군, K)의 발효 기간별 가용성 고형물, pH 및 스코비 생장량 변화를 측정 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 가용성 고형물 함량은 초기 9.30 °Brix로 시작하였다가 발효 3일째 K는 7.03 °Brix로, CK는 6.25 °Brix로 CK에서 빠르게 감소하였다가 발효 7일째에는 감소 속도가 느려졌으며, 발효 14일째 K는 6.06 °Brix를, CK는 5.50 °Brix를 보였다(Fig. 1A). CK에서 관찰된 가용성 고형물 함량의 급격한 감소는 추후 저칼로리 콤부차 제조시 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 사료된다. 발효기간 경과에 따른

pH 변화는 K는 초기 4.30, CK는 4.95였다가, 발효 7일째까지 급격히 감소하였는데, 특히 CK의 pH 감소가 더 빨라 K는 3.04, CK는 2.93을 보였다. 발효 14일째에는 대조군과 CK 모두 약 2.76으로 나타났다(Fig. 1B). 발효 종료시 스코비 중량은 K는 초기 대비 52 g이 증가되었으나, CK에서는 61 g이 증가되었다(Fig. 1C). 이러한 결과를 통해 CK에서는 미생물들이 활발한 대사활동을 통해 당 소비가 증가되고 결과적으로 미생물의 증식 즉, 스코비 생성량 증가로 이어졌음을 알 수 있다.

3.1.2. 유리당

조제 직후 대조군의 유리당 조성은 주로 자당(272.25 mM) 이었고, CK는 과당(246.51 mM), 포도당(190.83 mM) 그리고 자당(2.16 mM) 순으로 구성되었다(Table 1). CK에서는 조제 직후 당일 측정시에도 자당 함량이 K에 비해 낮았는데, 이는 당침액 조제에 사용된 꾸지뽕나무 열매의 유리당 조성 중 자당이 함유되어 있지 않았거나(Jung 등, 2013), 당침액 조제시 첨가한 자당이 숙성 중 invertase나 유기산에 의해 fructose와 glucose로 분해되었기 때문으로 보인다(Lee 등, 2008). Jung 등(2013)은 꾸지뽕나무 열매의 이화학적 특성으로 총 당 함량은 25.1-32.3%, 유리당으로는 주로 glucose 12.4-15.6%와 fructose 12.4-16.7%가 함유되어 있었고 sucrose는 검출되지 않았다고 하였다. K에서는 발효 7일째까지 자당 농도가 급격히 하락하였고, 이후 발효 14일째는 7일째 농도와 유사하였다. CK에서는 과당과 포도당 함량이 발효가 진행됨에 따라 급격하게 감소하였다. CK의 발효 초기와 말기의 포도당과 과당의 함량을 비교시 포도당은 약 22.8%가, 과당은 약 15.1%가 미생물에 의해 사용되었는데, 이는 콤부차 발효 중 미생물에 의해 사용되는 당은 포도당, 과당, 자당 순이며, 포도당과 과당을 비교시 포도당의 활용이 더 많았다는 보고와 일치한다(Khosravi 등, 2019). 발효기간에 따른 유리당의 급격한 감소는 콤부차 내

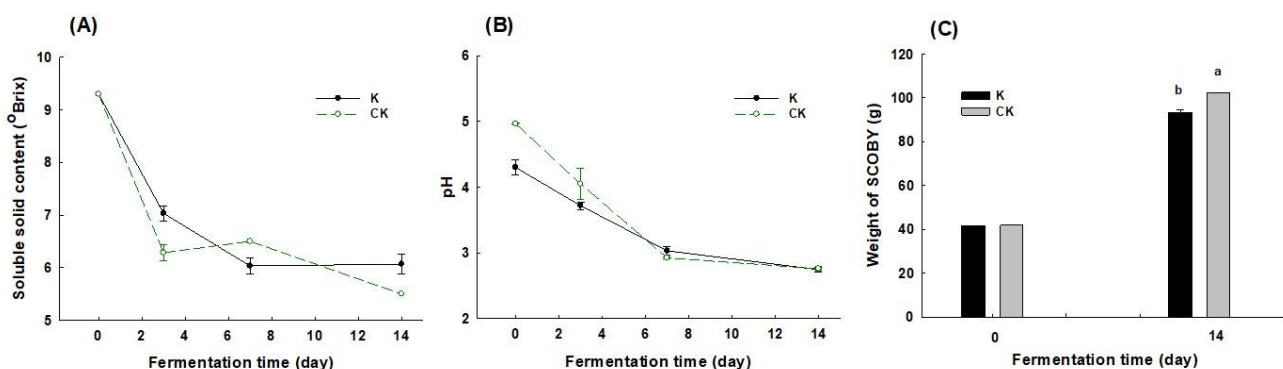


Fig. 1. The changes of soluble solid content (A), pH (B), and weight of SCOBY (C) of kombucha during fermentation at 25-28°C. K, kombucha; CK, kombucha with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits. All values are mean±SE (n=3). Different letters on the bars indicate significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 1. Free sugar content of *kombucha* during fermentation at 25-28°C

Treatment ¹⁾	Free sugar (mM)	Fermentation time (day)		
		0	7	14
K	Sucrose	272.25±0.34 ^{a2)}	176.86±0.085 ^a	176.85±2.423 ^a
	Glucose	NA ³⁾	NA	NA
	Fructose	NA	NA	NA
CK	Sucrose	2.16±0.01 ^d	3.97±0.08 ^d	2.85±0.43 ^d
	Glucose	190.83±0.39 ^c	95.13±23.16 ^{bc}	43.60±31.15 ^{bc}
	Fructose	246.51±0.72 ^b	124.69±50.82 ^b	37.23±25.73 ^{bc}

¹⁾K, *kombucha*; CK, *kombucha* with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits.

²⁾All values mean±SE (n=3). Different superscript letters in each row indicate significant differences (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

³⁾NA, not applicable.

미생물의 영양분으로 제공되어 대사과정에 사용되었음을 추론할 수 있다. 이러한 결과들은 포도당과 과당의 함량변화가 급격히 감소한 CK에서 스코비의 중량이 대조군에 비해 유의하게 증가된 결과(Table 1과 Fig. 1C)와도 연관성이 있을 것으로 추정되며, Khosravi 등(2019)의 대추야자 시럽을 당원으로 제조한 콤부차의 연구에서도 포도당 농도의 감소와 스코비 중량의 증가가 정의관계를 나타낸다고 보고한 바 있다. K에서도 pH 감소와 스코비 중량의 증가가 관찰되어 발효가 진행되었음을 확인할 수 있었으나, 조제시 추가한 자당의 대사산물인 포도당이나 과당이 측정되지 않았으며, 자당 함량의 변화도 7일째까지 그 이후에는 변화가 없는 양상을 보였다. 이러한 결과에 대해 콤부차 제조시 동일한 스타터를 첨가하였으나, 발효과정 중 대조군에서는 자당만을 이용하여 대사작용이 진행되었고 그 과정에서 생성된 포도당과 과당을 미생물이 모두 소비한 반면, CK에서는 첨가된 꾸지뽕나무 열매 당침액 속에 함유된 과당과 포도당을 미생물이 활발하게 사용한 결과로 추정해 볼 수 있다(Antolak 등, 2021).

3.1.3. 유기산

콤부차 조제 직후 CK에는 구연산(6.392 mM), 젖산(7.447 mM), 그리고 초산(8.963 mM)이 함유되어 있었으나 K에는 초산(4.143 mM)과 구연산(0.056 mM)만 함유되어 있었고, 젖산은 함유되어 있지 않았다(Table 2). 발효가 진행됨에 따라 대조군에서도 젖산이 소량 생성(0.389 mM)되었다. 초산 함량은 발효가 진행되면서 높아져 발효 2주째 대조군(93.974 mM)과 CK(520.673 mM)로 매우 높게 증가하였다. 일반적으로 발효 기간에 따른 콤부차 내 초산의 증가 추이는 상대적으로 pH의 감소 추이와 연관되며, pH 감소는 콤부차의 신맛과 관련이 있다. 특히 발효기간 동안 초산의 증가는 유해균의 증식을 차단하고(Greenwalt 등, 1998), 초산균들의 성장을 촉진시키는 역할을 한 것으로 해석된다. 이는 콤부차 발효과정 중 유해균에 의한 곰팡이나 부패가 관찰되지 않고 오직 스코비만 새로이 형성된 것으로 확인되었다. 초산농도가 대조군에서는 초기 4.143 mM에서 발효 2주째 93.974 mM로 증가하였고, CK에서는 초기 8.963 mM에서 2주 차 520.673 mM로 매우 높게 증가하였

Table 2. Organic acid content of *kombucha* during fermentation at 25-28°C

Treatment ¹⁾	Organic acid (mM)	Fermentation time (day)		
		0	7	14
K	Citric acid	0.056±0.017 ^{c2)}	0.306±0.016 ^c	0.352±0.005 ^c
	Lactic acid	NA ³⁾	0.389±0.013 ^c	0.373±0.056 ^c
	Acetic acid	4.143±0.018 ^d	47.234±2.456 ^b	93.974±11.259 ^b
CK	Citric acid	6.392±0.010 ^c	7.957±0.536 ^c	8.864±0.220 ^c
	Lactic acid	7.447±0.021 ^b	5.708±0.339 ^d	3.373±0.120 ^d
	Acetic acid	8.963±0.070 ^a	139.655±20.119 ^a	520.673±15.114 ^a

¹⁾K, *kombucha*; CK, *kombucha* with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits.

²⁾All values are mean±SE (n=3). Different superscript letters in each row indicate significant differences (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

³⁾NA, not applicable.

으나, 발효 2주째 pH는 대조군 2.91, CK 2.73으로 큰 차이가 없었다. 이는 1 M acetic acid의 pH는 2.4이며, 본 연구에서 콤부차 발효 중 가장 높은 acetic acid 농도는 CK에서 발효 2주째 약 0.52 M로, 발효 중 acetic acid의 농도가 급격히 높아졌지만 pH는 2.4 이상이었던 이유가 될 수 있다. Khosravi 등 (2019)은 대추야자 시럽을 이용하여 당도(°Brix)를 다르게 해서 제조한 콤부차에서 pH 값의 유의한 차이가 없음을 보고하였는데, 이는 본 실험의 결과와 일치한다.

한편 꾸지뽕나무 열매의 pH는 4.2-5.1, 유기산 함량은 1.4-2.0%, 유기산으로는 주로 succinic acid 1.61-2.76%, malic acid 1.02-2.27%, citric acid 0.73-0.90%가 함유되어 있었고, oxalic acid와 tartaric acid도 함유되어 있었으나 acetic acid는 검출되지 않았다고 하였는데(Jung 등, 2013), 본 실험에서 발효 첫날 K와 CK에서 모두 acetic acid가 함유된 것으로 나타나 발효에 의해 acetic acid가 생성된 것을 확인할 수 있었다.

콤부차의 적정 발효기간은 2주로 이 때 산미와 특색은 탄산의 맛 그리고 콤부차 고유의 냄새가 어우러져 가장 좋은 풍미를 가진다. 본 실험에서 발효 2주째 CK의 맛은 K에 비해 신맛이 더 나지만, K에 비해 보다 풍성한 풍미가 있으므로(데이터 미제시), CK는 기호에 따라 7-14일경 음용할 수 있을 것으로 보인다. 유기산 함량 측정 결과로 CK에는 K에 비해 구연산과 젖산이 풍부하게 포함되어 있음을 알 수 있다.

3.1.4. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량

콤부차의 발효 중 총폴리페놀과 총플라보노이드의 함량 변화 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 폴리페놀은 대표적으로 항산화 효과와 다양한 기능성을 갖는 화합물이다. 플라보노이드는 폴리페

놀계에 포함되는 화합물로 다양한 기능성을 나타낸다(Valduga 등, 2019). 꾸지뽕나무 열매의 총폴리페놀 함량은 18.9-19.7 mg%, 총플라보노이드 함량은 40.9-48.2 mg%로 총플라보노이드가 총폴리페놀에 비해 약 2.1-2.6배 많이 함유되어 있다(Jung 등, 2012). 본 실험에서는 총폴리페놀 함량이 총플라보노이드 함량에 비해 많이 함유되어 당침액 숙성 중 또는 콤부차 발효 중 성분 함량 조성에 변화가 있었음을 알 수 있다. CK의 총폴리페놀 함량은 발효가 진행됨에 따라 다소 감소되는 경향을 보였으나, 발효 초기 측정값은 686.6 $\mu\text{g GAE/mL}$ 로, 대조군의 초기 함량(456.3 $\mu\text{g GAE/mL}$)과 비교하면 초기부터 그 함량이 유의하게 높았다(Fig. 2A). 총플라보노이드 함량 역시 발효가 진행됨에 따라 다소 감소하는 경향을 보이긴 했으나, 대조군(21.1 $\mu\text{g CE/mL}$)에 비해 발효 초기 26.4 $\mu\text{g CE/mL}$ 로 함량이 높았다(Fig. 2B). Lee와 Yi(2023)는 홍차를 이용한 콤부차의 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량이 발효가 경과할수록 높아진다고 하였고, Amarasinghe 등(2018)은 발효기간에 따른 통계적 유의차는 없다고 보고하였다. 본 실험에서는 K의 총폴리페놀 함량은 발효 기간에 따른 유의차는 없었고, CK에서는 발효기간이 경과함에 따라 감소하였다. CK에는 K에 비해 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량이 높게 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

콤부차 내 총폴리페놀 함량의 감소는 발효 기간 및 스코비에 의한 페놀성 화합물의 이용에 따라 달라질 수 있고, 반면 알려지지 않은 미생물 활동의 증가로 인해 함량이 증가될 수도 있는데(Amarasinghe 등, 2018), 이 함량은 또한 스코비가 이용하는 물질, 즉 당 함량 및 그 종류와도 연관이 있을 것으로 보이며 스코비가 활용하는 물질의 우선 순위에 따라 달라질 수 있을

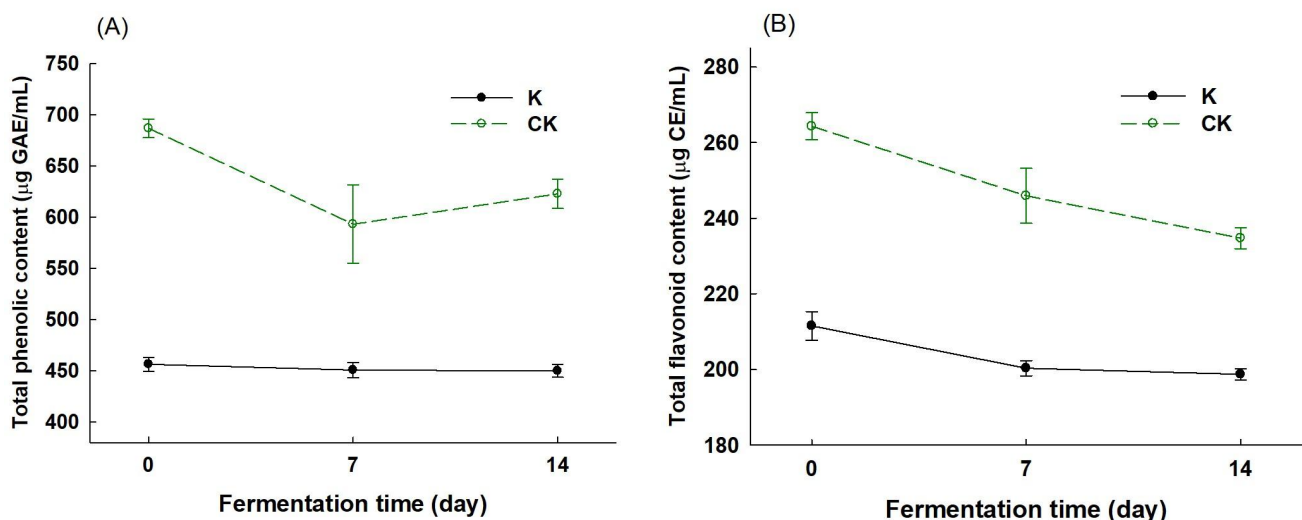


Fig. 2. The changes of total phenolics and total flavonoid contents of kombucha during fermentation at 25-28°C. K, kombucha; CK, kombucha with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits. All values are mean $\pm$ SE (n=3).

것이다. 본 실험의 CK의 총폴리페놀과 함량은 발효 초기 높은 값을 보였다가 발효 기간이 경과함에 따라 감소하였는데, 이는 CK의 성장량이 K에 비해 빨라 스코비가 이 성분들을 이용했을 것이라 추정할 수 있고, CK에서 K와는 다른 종류의 미생물이 우점종이 되어 성분 활용의 차이가 발생했을 수도 있다. 이는 발효 기간별로 콤부차 내의 효모, 유산균 및 초산균의 밀도를 분석한 결과로 확인할 수 있었는데, 발효 2주째 CK에서는 효모의 밀도가 대조군에 비해 높았고, 유산균과 초산균의 밀도는 K에서 높아(데이터 미제시), 추가한 꾸지뽕 당침액이 발효기간 중 미생물의 구성 양상에도 영향을 미쳤으며 이로 인해 미생물들이 이용하는 당함량 및 유리당 구성, 총페놀성 화합물 및 총플라보노이드 함량에 영향을 주었을 것으로 추론할 수 있다.

3.2. 세포 독성 평가 및 폐암세포 증식 억제 평가

콤부차의 세포 독성을 확인한 결과, 인체 정상 폐세포인 MRC-5 세포의 세포 생존율은 발효 2주 차까지 K와 CK 모두 대조군 대비 100% 이상이었다. 특히 CK는 발효초기부터 높은 생존율을 보였으며 발효 2주 차에도 110% 이상 세포생존율을 보여 세포 증식 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 인체 폐암세포인 A549를 대상으로 한 실험 결과, K에서는 폐암세포에 대한 세포증식 억제 효과가 관찰되지 않았고, CK에서는 발효 1주 차에서 높은 폐암세포 증식 억제율(32.17%)을 보였으며, 2주 차에도 20% 이상 억제효과를 보였다(Fig. 4). K가 A549 세포에 대한 증식억제 효과를 보이지 않은 결과는 콤부차 추출물의 폐암세포(A549)에 대한 세포증식 억제 효과를 확인한 Jayabalan 등(2011)의 연구 결과와 일치하였다. CK의 A549 세포에 생존을 억제 효과는 홍차를 기질로 제조된 콤부차에 풍부하게 함유되어 있는 총폴리페놀과 총플라보노이드와 더불어 꾸지뽕나무 열매 당침액에 함유된 꾸지뽕나무 열매에서 유래한 다양한 기능성 물질에 의한 결과라고 해석된다. Choi 등(2012)은 꾸지뽕나무 열매의 A549세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과, 세포 생존율이 79.5%로 폐암세포 성장저하 활성을 보였다고 보고한 바 있다. 이번 연구결과는 인체 폐암세포인 A549에 증식 억제 효과를 보이지 않았던 콤부차에 꾸지뽕나무 열매 당침액을 혼합 처리하였을 때 폐암세포 증식 억제 효과가 뚜렷하게 증가하였음을 보여주었다. 천연 약용식물의 항암효과를 연구한 기존 연구에서도, 암에 효과가 있다고 알려진 물질에 약용식물 추출물을 병용 처리하였을 때 효과가 뚜렷하게 증가되는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 2005). 따라서 꾸지뽕나무 열매 당침액을 이용하여 제조한 콤부차는 인체 정상 폐세포에는 세포 성장을 촉진시키는 유용한 효과가 있으며 폐암 세포에 대해서는 강력한 증식억제가 확인되어 기능성이 강화된 건강음료가 될 수 있는 기초 자료를 제공했다고 사료된다.

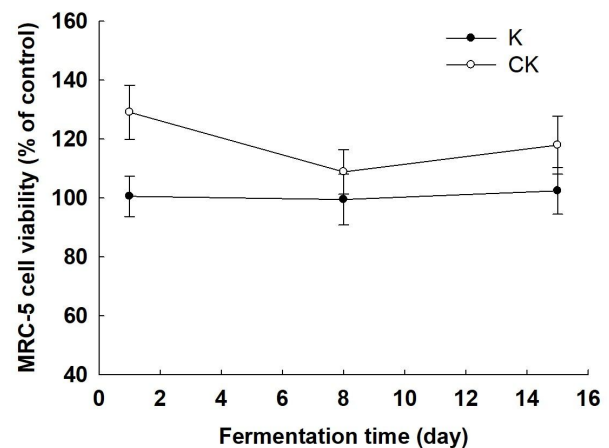


Fig. 3. Cytotoxic effect of kombucha on human lung epithelial cell (MRC-5). The cell was treated with kombucha (K) or kombucha with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits (CK) for 24 h, then the cell viability was assessed by EZ-Cytox. PBS buffer was used as a control for cell viability. All values are mean $\pm$ SE (n=6).

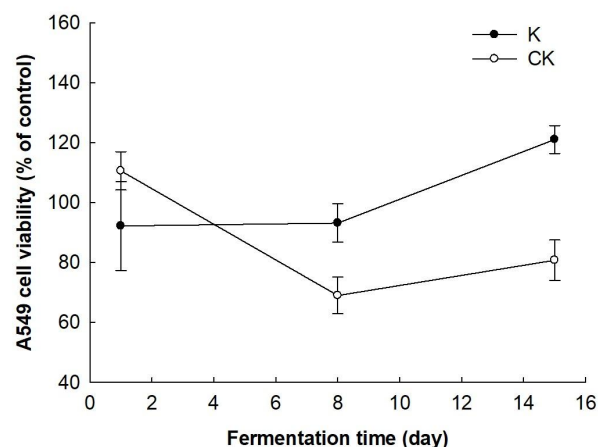


Fig. 4. Inhibitory effect of kombucha on human lung cancer cell (A549). The cell was treated with kombucha (K) or kombucha with sugar extracts of *Cudrania tricuspidata* fruits (CK) for 24 h, then the cell viability was assessed by EZ-Cytox. PBS buffer was used as a control for cell viability. All values are mean $\pm$ SE (n=6).

4. 요약

본 연구는 기능성이 증가된 콤부차를 제조하고자, 콤부차 제조 시 스코비로 알려진 박테리아 및 효모의 에너지 공급원으로서 자당 대신 기능성 물질이 많이 함유되어 있는 꾸지뽕나무 열매의 당침액을 이용하여 꾸지뽕-콤부차(CK)를 제조하였다. 제조된 콤부차(K)와 꾸지뽕-콤부차(CK)의 이화학적 품질특성

을 비교하였으며, 총페놀성 화합물과 총플라보노이드 함량, 인체 정상 폐세포에 대한 세포독성, 그리고 폐암 세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 콤부차의 가용성 고형물은 초기 단계 9.3 °Brix로 동일한 조건이었으며 발효 종료시 K는 약 6.1 °Brix로 감소한 반면, CK는 약 5.4 °Brix까지 현저히 감소하였다. CK에서 SCOBY는 포도당과 과당을 주로 이용하였다. CK에는 발효 초기부터 구연산과 젖산이 풍부하게 함유되어 있었으며, 발효가 진행됨에 따라 초산의 함량이 급격하게 증가하였다. 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량 역시 CK에서 유의하게 높았다. 인체 정상 폐세포와 폐암세포에 대한 세포증식에 대한 억제효과를 확인한 결과, CK는 인체 정상 폐세포에는 성장 활성 효과를 보였고, 폐암세포에는 강력한 세포증식 억제 효과를 나타내었다. K와 CK에서 감소된 pH, 가용성 고형물, 그리고 젖산의 변화와 증가된 스코비 중량 및 초산의 변화를 통해, 발효가 정상적으로 진행되었으며, 특히 CK에서 미생물의 활동이 좀 더 활발히 진행되었음을 추정할 수 있었다. 본 연구의 결과를 통해 꾸지뽕 나무 열매 당침액을 이용하여 제조한 콤부차는 저칼로리 기능성 음료의 가능성뿐만 아니라, 폐암세포 증식 억제와 같은 항암 관련 기능성 물질이 풍부하게 함유된 건강 기능성 음료로서의 사용가능성을 제시했다고 사료된다. 꾸지뽕나무 열매의 당침액을 사용하여 조제된 콤부차의 폐암세포에 대한 항암 효과가 당침액 자체의 영향인지 발효시 생성되는 기능성 물질에 의한 영향인지는 보다 자세한 연구가 필요하다.

Funding

The research was supported by Cheonsu Mountain Medicinal Herb Research Association 2020-2023.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Hnin Phyu Lwin at Chung-Ang University for analyzing physiochemical properties of kombucha.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Lee CM, Choi HC. Methodology: Cho MA, Song KJ. Formal analysis: Cho MA, Song KJ, Lee J. Validation: Park JC. Writing - original draft: Cho MA, Song KJ. Writing - review & editing: Cho MA, Song KJ, Lee J, Park JC.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because

there are no human and animal participants.

ORCID

MiAe Cho (First & Corresponding author)

<https://orcid.org/0009-0007-1711-1873>

Kyoung Ju Song (First author)

<https://orcid.org/0009-0003-4678-3602>

Jinwook Lee

<https://orcid.org/0000-0001-6547-2509>

Chang Moo Lee

<https://orcid.org/0009-0004-6012-7377>

Ho Chil Choi

<https://orcid.org/0009-0004-6559-7976>

Jong Cheol Park

<https://orcid.org/0009-0006-1260-7397>

References

- Ahn YB, Kang KM, Kim JH, Park LY, Lee SH. Quality characteristics of fermented wild grass juice. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 1731-1736 (2014)
- Amarasinghe H, Weerakkody NS, Waisundara VY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha "Tea Fungus" during extended periods of fermentation. Food Sci Nutr, 6, 659-665 (2018)
- Antolak H, Piechota D, Kucharska A. Kombucha tea-a double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). Antioxidants, 10, 1541-1561 (2021)
- Bae SY, Oh JS, Park MK. Characteristics of sugar extracts of medicinal plants fermented with *Lactobacillus plantarum* DK119. Korean J Food Sci Technol, 50, 179-185 (2018)
- Choi SR, You DH, Jang I, Ahn MS, Song EJ, Seo SY, Choi MK, Kim YS, Kim MK, Choi DG. Cytotoxicity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. Korean J Medicinal Corp Sci, 20, 153-158 (2012)
- Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, Nielsen DS, Jakobsen RR, Castro-Mejía JL, Bosi S, Truzzi F, Musumeci F, Dinelli G, Gioia DD. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry, and antioxidant activity. Nutrients, 11, 3390-3412 (2019)
- Greenwalt CJ, Ledford RA, Steinkraus KH. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. LWT-Food Sci Technol, 31, 291-296 (1998)
- Hwang MS, Choi JY, Kim KM, Song ID. 2023. Biological effects of *C. tricuspidata* extracts in normal rodents. J Life Sci, 33, 363-370 (2023)

- Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Thangaraj P, Swaminathan K, Yun SE. 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 (2011)
- Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea: Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13, 538-550 (2014)
- Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem*, 102, 392-398 (2007)
- Jung GT, Ju IO, Choi SR, You DH, Noh JJ. Food nutritional characteristics of fruit of *Cudrania tricuspidata* in its various maturation stages. *Korean J Food Preserv*, 20, 330-335 (2013)
- Khosravi S, Safari M, Emam-Djomeh Z, Golmakani MT. Development of fermented date syrup using kombucha starter culture. *J Food Process Preserv*, 43, 13872-13882 (2019)
- Kim HK, Kang YH, Kwak SY, Ding GH, Bae SM, Park EK, Lee YS, Kim J, Kim YW, Ro DY, Lee JM, Namkoong SE, Chang HS, Chun HJ, Lim DS, Ahn WS. Effects of cell growth inhibition on the combination of cisplatin with green tea extracts. *J Gynecol Oncol*, 16, 347-353 (2005)
- Kim JY, Shin HJ, Kim HL, Park H, Kim PK, Park S, Kim SH. The compositional and functional properties of kombucha: A literature review. *Food Eng Prog*, 24, 1-14 (2020)
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas V, Beratoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12, 457-481 (2020)
- Laavanya D, Shirkole S, Balasubramanian P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of kombucha fermentation. *J Cleaner Pro*, 295, 126454-126474 (2021)
- Laureys D, Britton SJ, Clippeleer JD. Kombucha tea fermentation: A review. *J Am Soc Brew Chem*, 78, 165-174 (2020)
- Lee KS, Kim GH, Kim HH, Lee HC, Oh MJ. Changes of free sugar on Gugija-sugar leaching processing from Gugija (*Lycii fructus*) raw fruit. *J Korean Soc Food Sci, Nutr*, 37, 1182-1189 (2008)
- Lee TY, Yi YH. Physicochemical properties of kombucha with fruit peels during fermentation. *Korean J Food Preserv*, 30, 321-333 (2023)
- Li X, Yao Z, Jiang X, Sun J, Ran G, Yang X, Zhao Y, Yan Y, Chen Z, Tian L, Bai W. Bioactive compounds from *Cudrania tricuspidata*: A natural anticancer source. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60, 494-514 (2020)
- Nisperos-Carriedo MO, Buslig BS, Shaw PE. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *J Agric Food Chem*, 40, 1127-1130 (1992)
- Park HJ, Lee SH, Kim HY, Jang GY, Hwang IG, Woo KS, Kwon OS, Lee J, Jeong HS. Changes in chemical components and antioxidant activity of dried jujube with different aging temperatures and durations. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 591-597 (2012)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178 (1999)
- Valduga AT, Gonçalves IL, Magria E, Delalibera Finzer JR. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. *Food Res Int*, 120, 478-503 (2019)
- Woo HG, Lee CM, Jeong JH, Choi BK, Huh CK. Quality characteristics of kombucha made with different mixing ratios of green tea extract and yuzu juice during fermentation. *Korean J Food Preserv*, 28, 646-653 (2021)
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559 (1999)