



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

감귤 콤부차 발효에 의한 카로티
노이드의 변화 및 항산화능 비교

濟州大學校 大學院

食品營養學科

魏興茹

2020年2月



감귤 콤부차 발효에 의한 카로티노이드의 변화 및 항산화능 비교

指導教授 朴 晟 秀

魏 興 茹

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 12月

魏興茹의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2019年 12月

Change of Carotenoids and comparison of
Antioxidant activity by fermentation of Citrus
Kombucha

WEI XINGRU

(Supervised by Professor Sung-Soo Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

2020. 2.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & NUTRITION
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	V
List of Abbreviations	VIII
List of Tables	IX
List of Figures	X
I. 서론	1
II. 이론적 배경	3
1. 콤부차	3
2. 감귤	4
3. β -cryptoxanthin	5
III. 재료 및 방법	8
1. 감귤 콤부차 발효	8
1) 균종의 배양	8
2) 감귤 콤부차 및 껍질 감귤 콤부차 배양	10

3) Lutein 첨가된 콤부차, β -Carotene 첨가된 콤부차, Lutein 및 β -Carotene 첨가된 콤부차 배양	14
2. 시료의 기능적 특성	17
1) 항산화 측정	17
(1) DPPH 라디칼 소거능 측정	17
(2) DPPH 라디칼 소거능 측정	17
(3) Total polyphenol 함량 측정	18
2) HPLC 분석	20
3) 시료 함량 계산 방법	23
3. 통계 분석	23
IV. 연구결과	24
1. 항산화 측정	24
1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과	24
2) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과	24
3) Total polyphenol 함량 측정 결과	25

2. HPLC를 이용하여 발효에 따른 각 시료의 β -cryptoxanthin 함량 측정 결과	32
1) Standard β -cryptoxanthin 함량	32
2) 감귤콤부차 발효전 β -cryptoxanthin 함량	33
3) 감귤콤부차 발효후 β -cryptoxanthin 함량	34
4) 껍질감귤콤부차 발효전 β -cryptoxanthin 함량	35
5) 껍질감귤콤부차 발효후 β -cryptoxanthin 함량	36
3. HPLC를 이용하여 발효에 따른 각 시료의 Lutein 및 β -Carotene 함량 측정 결과	38
1) Standard Lutein 함량	38
2) Lutein 첨가된 콤부차 발효전 Lutein 함량	39
3) Lutein 첨가된 콤부차 발효후 Lutein 함량	40
4) Standard β -Carotene 함량	41
5) β -Carotene 첨가된 콤부차 발효전 β -Carotene 함량	42
6) β -Carotene 첨가된 콤부차 발효후 β -Carotene 함량	43
7) Lutein과 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효전 Lutein 및 β -Carotene 함량	44
8) Lutein과 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효후 Lutein 및 β -Carotene 함량	45

V. 고찰	47
VI. 요약 및 결론	49
VII. 참고문헌	51
<국문초록>	63

<Abstract>

Change of Carotenoids and comparison of Antioxidant activity by fermentation of Citrus Kombucha

WEI XINGRU

Department of Food Science and Nutrition

Graduate school

Jeju National University

Supervised by Professor Sung-Soo Park

Kombucha is a tea containing sugar fermented by symbiosis of yeast and acetate bacteria for about 14 days. Kombucha's ingredients contain organic acids (mainly acetic, gluconic and glucuronic acid) and tea polyphenols, which have beneficial effects on health. Citrus is rich in vitamins, citric acids, carotenoids, fiber, flavonoids and other phenols. There are also many mineral ingredients such as calcium, potassium and magnesium. Although citrus differs greatly in the proportion of pulp and pulp depending on species, the fruit, which has been almost discarded as waste, contains high physiological activations such as essence oil, carotenoid and flavonoid, cellulose, pectin and limonoid. In this study, the change of β -cryptoxanthin (β -CX) content by fermentation was measured and compared by adding citrus liquid and peel citrus to the Kombucha, respectively, and the study

was carried out for use in food development and health food processing.

DPPH, ABTS radical scavenging assay was performed to evaluate the antioxidant activity. The results showed that the antioxidant capability of each concentration (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, and 300 $\mu\text{g/ml}$) of the specimen is increased, whereas the antioxidant activity Kombucha (CK= Citrus Kombucha) is significantly increased compared to the period before fermentation, whereas the Peel Citrus Kombucha (PCK= Peel Citrus Kombucha) is reduced. After CK fermentation, Total phenolic content was significantly increased after CK fermentation than before CK fermentation, and the phenol content was higher than that of PCK and citrus stock solution. Thus, CK's antioxidant capability has been confirmed higher than PCK's.

The β -Cryptoxanthin (β -CX) content was measured by using HPLC. The result of the change in β -CX before and after CK fermentation is approximately 3.6 times higher for CK after fermentation. For PCKs, the number after fermentation increases 2.4 times before fermentation. It has been shown to increase the content of carotenoids due to fermentation.

Lutein content before and after fermentation of Lutein adopted Kombucha decreased to nearly 8 times and β -Carotene content was decreased by 1.2 times before and after β -Carotene adopted Kombucha fermentation. Lutein content before Kombucha fermentation with Lutein and β -Carotene was $8.89\mu\text{g/ml}$ and completely disappeared after fermentation β -Carotene content is reduced by 1.2 times the same ratio as β -Carotene adopted Kombucha. It is thought that there is a possibility of bioconversion due to the decrease of Lutein and β -Carotene content and the increase of β -CX content by Kombucha fermentation.

In conclusion, Fermented Citrus Kombucha can be considered as a good

source of biologically active compounds because it has a high antioxidant capacity and a marked increase in carotenoid content. Based on this, it is suggested that it can be used as a raw material for food development and health food processing that can exert a health effect.

List of Abbreviations

Abbreviation	Full name
CK	Citrus Kombucha
PCK	Peel Citrus Konbucha
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
FDA	Food and Drug Administration
MTBE	methyl tert-butyl ether
β -CX	β -Cryptoxanthin
Ga. xylinus	Gluconoacetobacter xylinus
Ga. medellinesis	Gluconoacetobacter medellinensis
G. oxydans	Gluconobacter oxydans
DPPH	1, 1 - diphenyl - 2-picrylhydrazyl
ABTS	2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

List of Table

Table 1. Medium condition for 3 fungus.	9
Table 2. HPLC condition for β -Cryptoxanthin.	21
Table 3. HPLC condition for Lutein and β -Carotene.	22
Table 4. DPPH radical scavenging acitivity.	26
Table 5. ABTS radical scavenging acitivity.	27
Table 6. Total phenolic content.	28

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of β -Cryptoxanthin and Vitamin A.	7
Figure 2. A flow diagram for Citrus Kombucha.	11
Figure 3. A flow diagram for Peel Citrus Kombucha.	12
Figure 4. Samples of Citrus Kombucha and Peel Citrus Kombucha beverage.	13
Figure 5. A flow diagram for Lutein adopted Kombucha and β -Carotene adopted Kombucha and Lutein and β -Carotene adopted Kombucha.	15
Figure 6. Samples of Lutein adopted Kombucha and β -Carotene adopted Kombucha and Lutein and β -Carotene adopted Kombucha beverage.	16
Figure 7. DPPH radical scavenging activity.	29
Figure 8. ABTS radical scavenging activity.	30
Figure 9. Total phenolic content.	31
Figure 10. HPLC chromatograms of Standard β -Cryptoxanthin.	32
Figure 11. HPLC chromatograms of Citrus Kombucha fermented 0 day.	33
Figure 12. HPLC chromatograms of Citrus Kombucha fermented 14 days.	34
Figure 13. HPLC chromatograms of Peel Citrus Kombucha fermented 0 day.	35
Figure 14. HPLC chromatograms of Peel Citrus Kombucha fermented 14 days.	36
Figure 15. Changes in β -Cryptoxanthin content by fermentation.	37

Figure 16. HPLC chromatograms of standard Lutein.	38
Figure 17. HPLC chromatograms of Lutein adopted Kombucha fermented 0 day.	39
Figure 18. HPLC chromatograms of Lutein adopted Kombucha fermented 14 days.	40
Figure 19. HPLC chromatograms of standard β -Carotene.	41
Figure 20. HPLC chromatograms of β -Carotene adopted Kombucha fermented 0 day.	42
Figure 21. HPLC chromatograms of β -Carotene adopted Kombucha fermented 14 days.	43
Figure 22. HPLC chromatograms of Lutein and β -Carotene adopted Kombucha fermented 0 day.	44
Figure 23. HPLC chromatograms of Lutein and β -Carotene adopted Kombucha fermented 14 days.	45
Figure 24. Changes in Lutein and β -Carotene content by fermentation.	46

I. 서론

Kombucha는 전통적인 민간요법으로 많은 질병의 치료용 음료로 사용되었다[1]. 콤부차는 아세트 박테리아와 다른 균류의 공생체계에 가당 발효 차로서 인체의 건강에 유익한 효과를 위하여 소비된다[2]. 인구의 고령화와 현대 의학의 한계로 인해 많은 사람들은 건강을 증진시킬 수 있는 새로운 방법을 모색하게 되었다. 생활 습관과 식이 요법을 둘러싼 의구심과 함께 기능성 식품과 영양 보조 식품에 대한 관심이 커짐에 따라 이러한 경향이 증대되고 있다[3]. 콤부차는 신진 대사질환, 관절염, 건선, 변비, 소화불량, 고혈압 등에 대해 여러 가지 약효를 발휘한다고 보고되었으며, 수많은 건강 증진 측면이 알려져 집에서 간편하고 안전하게 준비하는 전통적인 음료로 인기를 얻고 있다[4].

카로티노이드는 오렌지, 붉은 고추, 수박, 당근, 토마토 등 대부분의 과일과 채소의 착색을 담당하는 중요한 천연색소군이다[5]. 동물과 인간은 일반적으로 카로티노이드를 합성할 수 없으며, 따라서 카로티노이드가 풍부한 음식을 섭취하여 식이 요법을 이용하여 매일의 요구 사항을 충족시켰다[6]. 최근 몇 년 동안 인간의 연령 관련 질병을 완화하는 잠재력과 관련하여 카로티노이드에 상당한 관심이 나타나고 있다. 상업적으로 카로티노이드는 식품 착색제와 영양 보충제로 사용된다[7]. 대부분의 동물에서 카로티노이드는 비타민 A 생합성 전구체를 제공하기 위해 분해되어 많은 생리적 기능에 가치가 있으며, 따라서 인간의 건강을 증진시킨다. 예를 들어, 항산화 활동, 면역 억제제, 태아에 대한 영양제, 광 보호, 시력 조절, 눈의 황반변성의 나이와 관련된 시력 감퇴를 억제한다[8-10].

카로티노이드, 특히 β -cryptoxanthin (β -CX)는 생물체에서 다양한 생물학적 활성을 발휘한다. 다양한 가공 기술은 식품 내의 카로티노이드 생체 이용률을 향상시킬 수 있다[11]. β -CX는 비타민 A의 전구체로서 시력, 성장, 발달 및 면역 반응에 필요한 필수 영양소다[12]. β -CX는 라이코펜, β -카로틴, α -카로틴과 같은 다른 중요한 카로티노이드에 비해 수용성이 높기 때문에 미셀의 외부 표면에 존재하며 내장의 수용성 환경에서 높은 용해성으로 인해 상대적으로 높은 흡수성

을 갖는 것으로 여겨진다[13].

감귤류는 항산화제, 항염증제, 항암제, 뼈 건강 증진제, 항노화제 등 광범위한 생물학적 기능으로 인해 과학계에서 상당한 관심을 받아왔다. 감귤류의 이러한 유익한 특성은 주로 식물화학물질인 카로티노이드, 아스코르브산, 플라보노이드 및 페놀 화합물의 존재에 기인한다[14].

감귤류는 세계에서 가장 높은 가치의 과일 작물 중 하나이며 많은 양의 카로티노이드를 함유하고 있다[15]. β -CX는 감귤류 과일의 주요 카로티노이드 중 하나이다[16]. 다른 카로티노이드에 비해 흡수성이 높으며, 감귤류 과일의 섭취량이 적어도 체내에 다량의 β -CX를 보유할 수 있다[17]. 그러나 카로티노이드는 주로 감귤껍질에 축적되며, 식용 부분의 함량은 비교적 낮다[18,19]. Attila Agócs 등은 껍질에서 주요 카로티노이드의 종류는 (9Z) - 바이올락산틴 (8-33%), β -시트라우린 (11-28%), β -크립토잔틴 (3-23%)이라며, 감귤류의 과육에서 주요 카로티노이드는 β -cryptoxanthin (~30%)이라고 보고하였다[20]. 최근에 발효가 과일과 채소의 생물 활성 화합물의 분포를 개선할 수 있으므로 발효 과정이 과일(석류[21], 뽕나무[22], 사과[23]) 및 야채 (붉은 수수[24], 양파[25])에서 수행되어 기질보다 생물 활성 화합물 함량이 높은 제품을 생산하고 있다[5]. 그러나 감귤 발효에 대하여는 많은 연구가 수행되지 못 하였다.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)는 정성적, 정량적으로 카로티노이드 분석을 위한 가장 일반적인 분석 방법이 되었다[26]. 따라서 HPLC를 사용하여 콤부차 발효에 의해 감귤 콤부차과 껍질 첨가 감귤 콤부차 발효 전과 후의 β -크립토잔틴 함량을 측정하고 비교하여 각각 효능 및 특성을 검토하였으며, 건강식품 가공에 이용하기 위해 본 연구를 수행하였다.

II. 이론적 배경

1. 콤부차

콤부차(Kombucha)는 초산균으로 발효된 차 음료이다. 처음으로 동양에서 여러 질병의 치유 효과를 위해 사용되었다. 콤부차(Kombucha)는 중국 북동부 (만주)에서 유래되었는데, 해독 및 활력을 주는 특성으로 청나라 시대에 소중히 여겨졌다[27]. 콤부차(Kombucha tea)는 약 14일간 효모와 아세트 박테리아의 공생에 의해 발효된 설탕이 들어간 홍차다[28]. 콤부차는 부동 셀룰로오스 펠리클 층과 액상형태의 두 부분으로 구성되어 있다[29].

Kombucha의 강화된 효능은 발효 과정에서 미생물 군에 의해 발휘된다는 것을 보여주었다[30]. 호기성 조건에서, Kombucha 공생은 매우 간단한 기질 (자당과 홍차 또는 녹차)을 약간 탄산화 시키고, 약간 신맛이 나는 상쾌한 음료로 전환할 수 있다. 이 음료는 설탕, 글루콘산, 글루쿠론산, 락트산, 아세트산, 말산, 타르타르산, 말론산, 구연산 및 옥살산뿐만 아니라 에탄올, 14개 아미노산, 수용성 비타민, 항균 활성 물질 및 일부 가수 분해 효소로 구성되어 있다[31]. 콤부차의 화학적 성분은 유기산 (주로 아세트산, 글루콘산 및 글루쿠론산)과 차 폴리페놀에 의해 지배되며, 이 음료의 규칙적인 섭취와 관련된 여러 가지 건강상의 이점을 담당할 수 있다. 이러한 효과에는 항암제, 당뇨병 및 해독 가능성, 소화를 돕고 면역반응 개선 및 위궤양 및 고혈당 콜레스테롤 치료 등이 포함된다[32].

Kombucha는 효모와 아세트산 박테리아로 이루어진 합성체로 수세기 동안 감미로운 홍차나 녹차의 발효에 사용되었다. 또한, Kombucha는 진한 맥주, 적포도주, 화이트 와인 또는 다른 종류의 차뿐만 아니라 유당이나 유즙으로도 제조될 수 있다. Kombucha의 신진 대사 작용으로 신 맛과 건강에 유익한 성분이 함유된 상쾌한 음료가 만들어진다. 인간의 건강에 미치는 긍정적 영향 또한 보고되었다 [33].

2. 감귤

감귤류 과일은 세계에서 가장 널리 소비되는 과일 중 하나이며 또한 우리의 일상 식단에서 중요한 요소가 되고 있다. 감귤은 신선한 것으로 먹거나 주스, 잼 또는 디저트로 가공될 수 있다. 또한, 그것들은 방향성 화합물 때문에 에센셜오일의 원천이기도 하다[34]. 그리고 많은 연구자들이 에센셜오일의 항산화 및 라디칼 소거 특성을 보고했으며 어떤 경우에는 직접 식품 관련 응용도 보고했다[35]. 감귤류는 색, 맛 및 향기로 인해 소비자들에게 인기가 많으며 또한 비타민, 카로티노이드, 섬유질, 플라보노이드 및 기타 페놀류와 같은 생체 활성 화합물의 주요 공급원 일뿐만 아니라 필수 미네랄의 공급원이 될 수 있다[36].

감귤류 과일은 항산화 능력을 가진 바이오 활성성분들의 풍부한 공급원으로 알려져 있으며 비타민 A, C, E, 아스코르브산, 카로티노이드, 플라보노이드 성분이 인정받고 있다[37]. 신선한 과일 또는 가공된 제품을 통해 소비되는 이러한 식물 화학 물질은 항산화, 항염증, 항 돌연변이 유발 물질, 항암 물질 및 인체 건강에 대한 노화 방지와 같은 다양한 생물학적 기능을 가지고 있다고 알려져 왔다[38].

감귤류의 과피는 동양의학에서 기관지와 천식 환자에게 사용되어 왔으며 최근에는 감염성질환이나 암 등을 예방한다고 보고되었다[39,40]. 과피는 essence oil, carotenoid 및 flavonoid, cellulose, pectin, limonoid 등 생리활성물질들이 높게 함유되어 있다. 이들의 기능성에 대한 평가로서 항산화작용, 순환계 질병의 예방, 항염증, 항 알레르기, 항균, 항바이러스, 혈중 지질 저하작용, 면역증강작용, 모세혈관강화작용 등이 보고되었다[41].

과일 껍질은 다른 항산화 물질의 주요 공급원이며 주스 추출 산업의 부산물들은 천연 항산화 물질로 사용될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그렇지 않으면, 개별 산화 방지제 대신에 전체 추출물을 사용함으로써 샘플에 존재하는 다른 페놀류, 플라보노이드, 아스코르브산, 카로티노이드 및 환원당의 첨가물 및 시너지 효과를 이용할 수 있다[34].

3. β -Cryptoxanthin

β -Cryptoxanthin (β -CX)는 식품, 일용 화학공업, 의약공업에 널리 사용되고 있으며 미국 식품 및 약품감독국 (FDA)에 의해 안전한 물질로 인정되고 있다[42]. β -CX는 복숭아, 파파야, 오렌지, 귤 등 감귤류 과일에서 발견되는 카로티노이드 색소이며[43], 오렌지나 만다린과 같은 감귤 주스는 전 세계적으로 소비되고 β -CX의 주요 식이 공급원 중 하나이다. β -CX는 감귤류의 비타민 A의 주요 전구체다[44]. 그리고 β -CX는 비타민A의 전구체로서 뼈 건강, 면역 기능, 콜레스테롤 및 글리세이성 항상성, 간 기능, 시력생리작용 등의 역할을 하는 외에 항산화 및 항암 효과를 발휘하는 것으로 밝혀졌다[11].

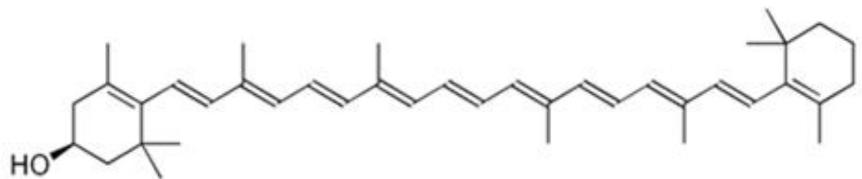
β -CX는 β -카로틴과 화학적 구조가 비슷하지만 극성이 더 강한 산화된 카로티노이드다. β -카로틴은 수많은 과일과 야채에 다량으로 존재하지만, β -CX는 적은 수의 식품에서만 고농도에서 발견된다. β -CX의 가장 좋은 공급원은 감귤류 과일이다[45].

최근 몇 년 동안 연구자들은 온주 귤에서 β -CX를 추출하여 동물 실험을 통해 β -CX가 유리 라디칼 소거, 미백, 피부 재생 및 복구 촉진, 항 피로 및 항산화, 뼈 건강 및 골다공증 예방, 건강과 면역 체계 관련 질병 예방과 같은 다양한 생리 기능을 가지고 있음을 입증했다. 관절염 위험과 혈압을 낮추고 암을 예방하고 억제 역할을 한다[46-52].

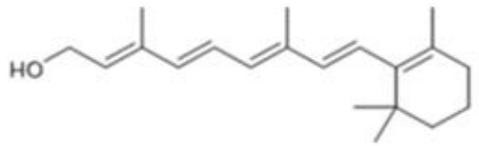
또한, Akira Iwata 등의 연구에서 β -CX는 비만 쥐의 지방조직에서 지방 축적을 억제한다고 보고되었다. 그리고 Asuka Hirose 등은 β -CX의 높은 섭취는 낮은 체질량 지수와 낮은 체지방 수치와 관련이 있는 것으로 입증됐다. 연령, 폐경 상태, 작업, 운동 및 흡연에 대한 다중 로지스틱 회귀 분석 결과 β -CX섭취가 높을수록 체질량 지수와 체지방률이 낮아졌다고 보고했다[53,54].

대부분의 체외, 동물 모델 및 인간 연구는 β -CX가 다른 일반적인 카로티노이드보다 주요 식품원에서 더 잘 흡수된다는 것을 시사한다. β -CX는 음식의 부족함에도 불구하고 혈액에서 가장 풍부한 카로티노이드 중

하나이다[55]. 혈액 내 β -CX가 식품에서 희소성과 비교하여 풍부하다는 것은 β -CX가 공통의 식품 공급원의 β -carotene 및 리코펜보다 더 생체이용가능성이 있음을 시사한다[56]. 이것은 오렌지 과일의 β -CX이 β -카로틴이 풍부한 음식보다 더 생물적으로 이용 가능하다는 타 연구에서 뒷받침하고 있다[57].



β -Cryptoxanthin



Vitamin A

Figure 1. Chemical structures of β -Cryptoxanthin and Vitamin A.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 감귤 콤부차 발효

1) 균주의 배양

감귤 콤부차 배양에 사용된 3종 균주는 *Gluconoacetobacter xylinus* (Ga. xylinus), *Gluconoacetobacter medellinensis* (Ga. medellinensis), *Gluconobacter oxydans* (G. oxydans)로 한국미생물보존센터 (KCCM)에서 분양받아 이용하였다. 배지의 성분으로 Polypepton (Wako Pure Chemicals Ind. Ltd., Osaka, Japan)과 Mannitol (Daejung Chemicals & Metals co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea), Yeast Extract, Peptone, Glucose와 MgSO₄ (Biosesang Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea)는 시약 회사에서 구입하여 사용하였다. Table 1에 따라 배지를 만들고 나서 30mL에 각각의 균주 single colony를 넣고 Ga. xylinus는 1주 배양하고 Ga. medellinensis와 G. oxydans는 48시간 배양한 뒤, 원심분리기 (Aventi J-E, Beckman coulter, California, USA)를 이용하여 배양액을 분리 (18000xg, 10min)한 균주를 감귤 콤부차 및 껍질 감귤 콤부차 베이스 루테인 그리고 첨가된 콤부차, β-카로틴 첨가된 콤부차, 루테인 및 β-카로틴 첨가된 콤부차 베이스 900mL에 접종하였다.

Table 1. Medium condition for 3 fungus.

Ga. xylinus ¹ 와 Ga. medellinensis ² 배지		G. oxydans ³ 배지	
		Polypepton	5.0g
Yeast Extract	5.0g	Yeast Extract	5.0g
Peptone	3.0g	Glucose	5.0g
Mannitol	25.0g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0g
Distilled water	1.0L	Distilled water	1.0L

1 Ga. xylinus: Gluconoacetobacter xylinus

2 Ga. medellinensis: Gluconoacetobacter medellinensis

3 G. oxydans: Gluconobacter oxydans

2) 감귤 콤부차와 껍질 감귤 콤부차 배양

본 실험에서 감귤 콤부차 제조에는 현미녹차 (동서식품, 서울, 한국), 설탕 (CJ 제일제당, 서울, 한국)을 사용하였으며 감귤은 제주산 천혜향을 제주시 마트에서 구매하여 사용하였다.

감귤 콤부차는 Figure 2.에 따라 증류수 900mL을 끓인 뒤에 녹차 티백 3개를 10분간 우려낸다. 설탕 90g를 넣고 교반한 후 녹차 추출물 700mL에 감귤액 200mL를 넣어주고 균주 접종을 위해 30℃ 얼음물에 담가 온도를 식혀준다. 3mL *Ga. medellinensis*, 2mL *G. oxydans*, *Ga. xylinus*이며 *Ga. xylinus*의 fungus는 사방 2cm 정도로 잘라 넣어주고 접종하여 26℃ 배양기에서 14일간 발효하였다. 껍질 감귤 콤부차는 감귤 콤부차와 동일한 과정을 거치고 동일한 조건에서 배양하였다(Figure. 3).

실험에서 발효액을 18000xg로 10분간 원심 분리 후 상층액을 주사기용 0.45µm 필터유닛을 (Millipore, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan) 이용하여 여과한 후 샘플로 사용하였다.

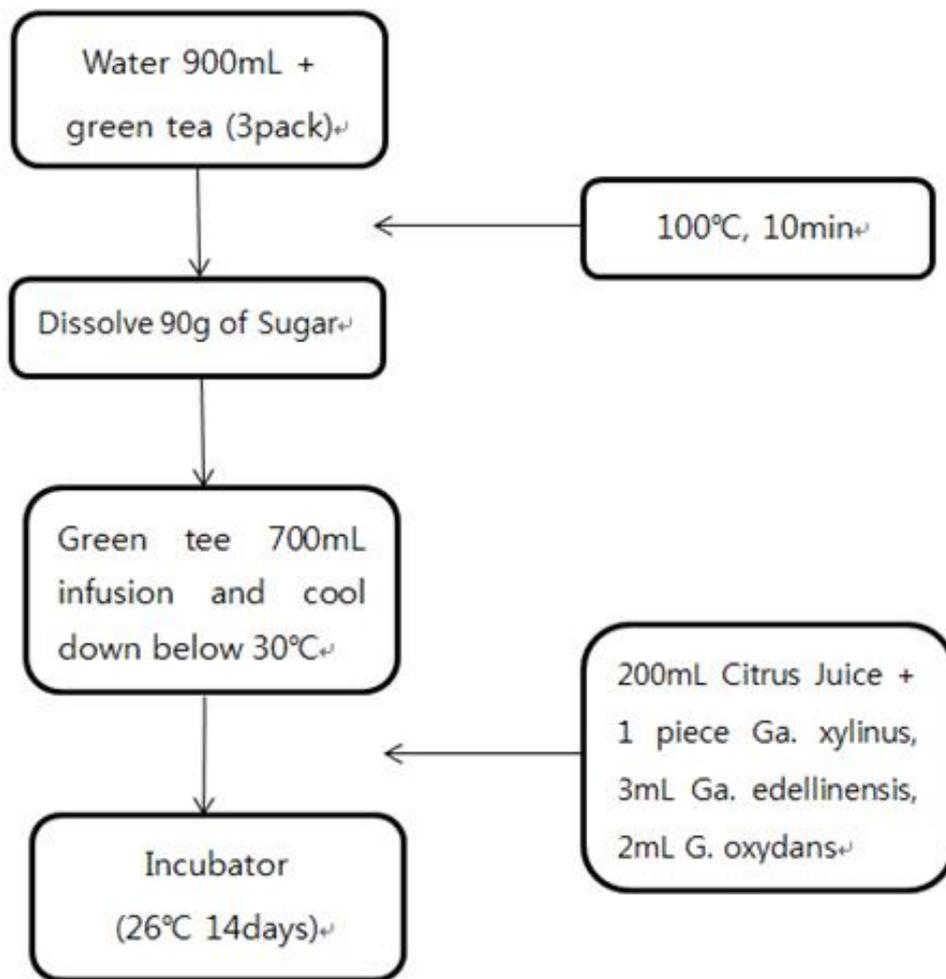


Figure 2. A flow diagram for Citrus Kombucha.

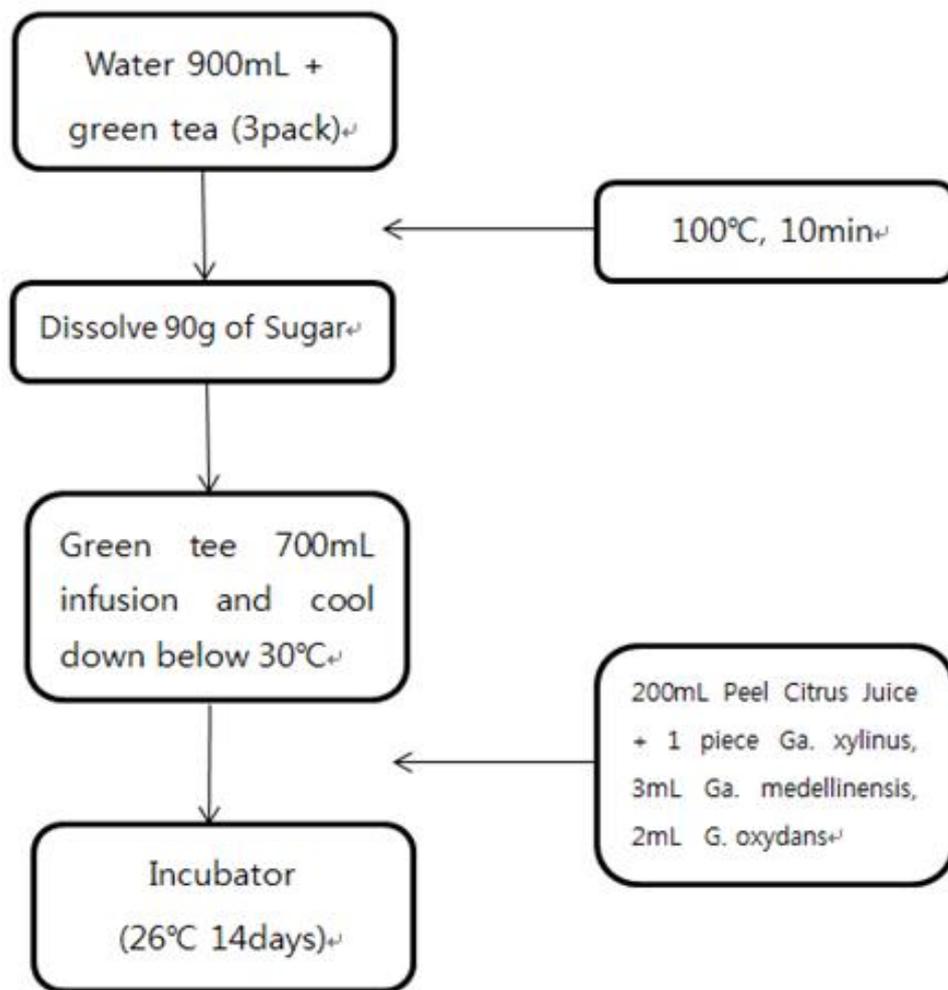


Figure 3. A flow diagram for Peel Citrus Kombucha.



Figure 4. Samples of Citrus Kombucha and Peel Citrus Kombucha beverage.

3) Lutein 첨가된 콤부차, β -Carotene 첨가된 콤부차, Lutein 및 β -Carotene 첨가된 콤부차 배양

본 실험에서 사용된 Lutein, β -Carotene는 Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 제품을 사용하였다.

A그룹 (Lutein 첨가된 콤부차), B그룹 (β -Carotene 첨가된 콤부차), C그룹 (Lutein 및 β -Carotene 첨가된 콤부차) Figure 5.에 따라 증류수 900mL을 끓인 뒤에 녹차 티백 3개를 10분간 우려낸다. 설탕 90g를 넣고 교반한 후 녹차 추출물 700mL에 A, B, C그룹에 따라 각 100mg Lutein, 1g β -Carotene, 100mg Lutein 와 1g β -Carotene를 넣어주고 균주 접종을 위해 30 $^{\circ}$ C 얼음물에 담가 온도를 식혀 준다. 3mL *Ga. medellinensis*, 2mL *G. oxydans*, *Ga. xylinus*이며 *Ga. xylinus*의 fungus는 사방 2cm 정도로 잘라 넣어주고 접종하여 26 $^{\circ}$ C 배양기에서 14일간 발효하였다.

실험에서 발효액을 18000xg로 10분간 원심 분리 후 상층액을 주사기용 0.45 μ m 필터유닛을 (Millipore, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan) 이용하여 여과한 후 샘플로 사용하였다.

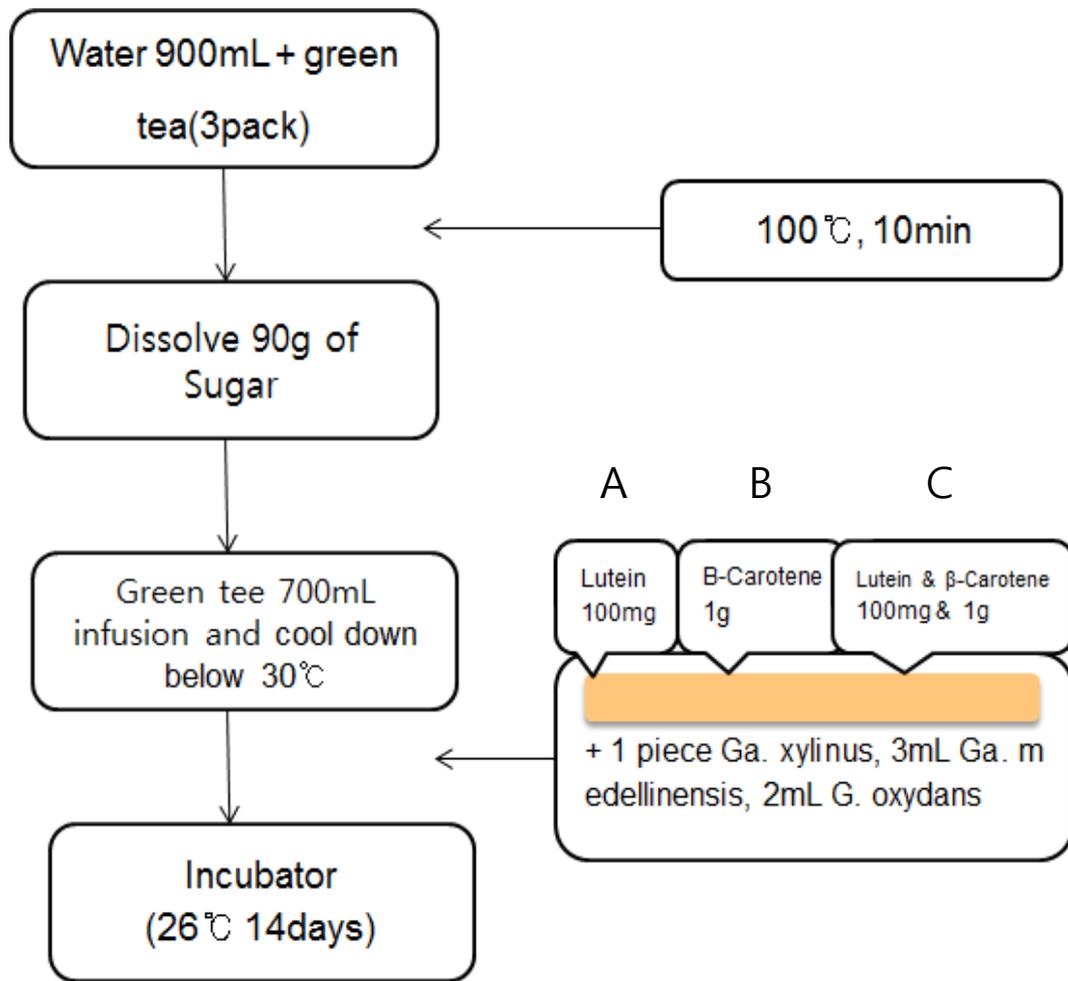


Figure 5. A flow diagram for Lutein adopted Kombucha and β -Carotene adopted Kombucha and Lutein and β -Carotene adopted Kombucha.

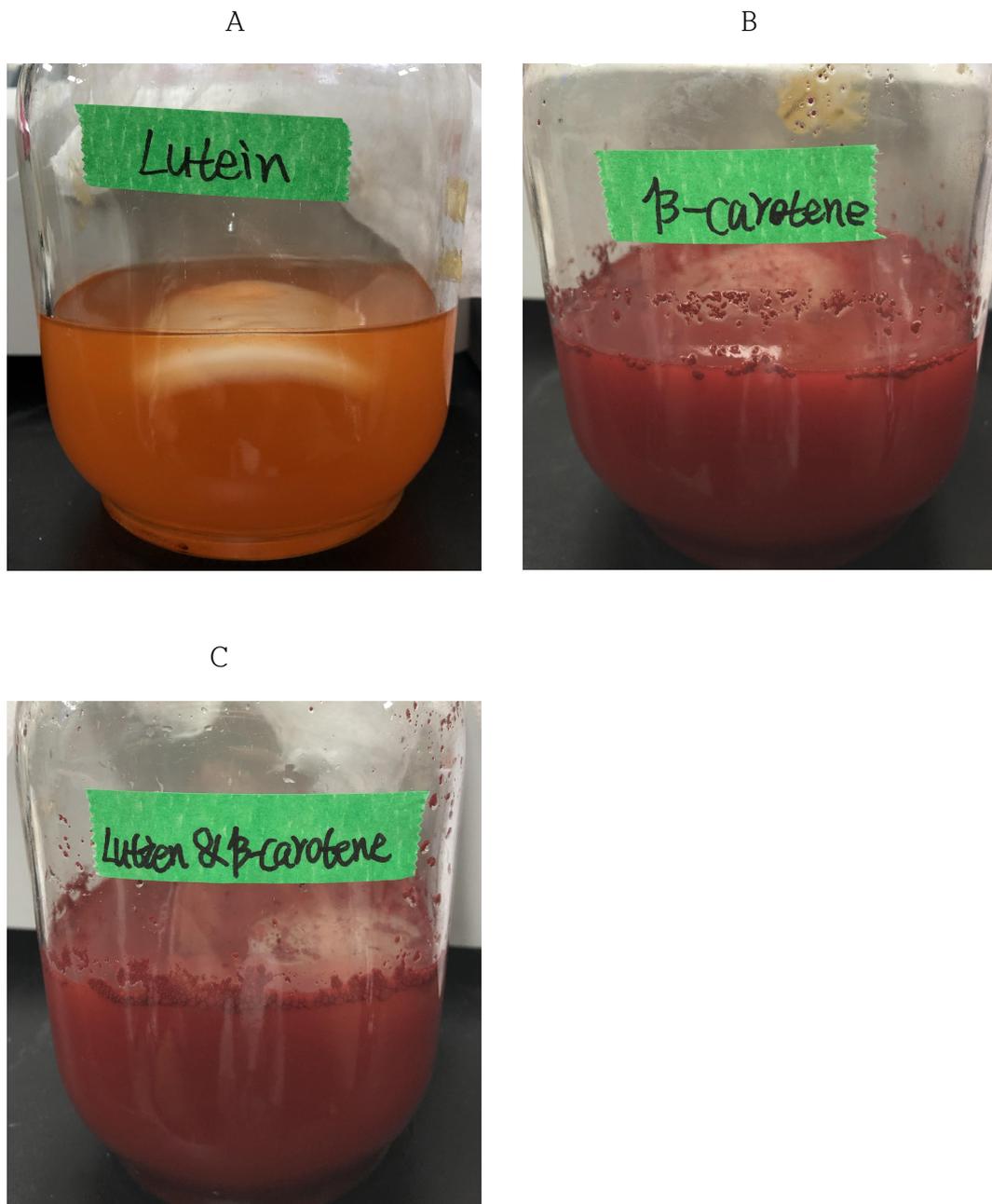


Figure 6. Samples of Lutein adopted Kombucha and β -Carotene adopted Kombucha and Lutein and β -Carotene adopted Kombucha beverage.

2. 시료의 기능적 특성

1) 항산화 측정

(1) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH radical scavenging의 작용 기작은 항산화 물질이 안정한 자유 라디칼인 DPPH와 재반응하고 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine로 변환되는 과정을 가지는 데, 이 방법은 많은 식물 추출물들은 bioassay를 이용한 항산화 물질의 용매 분획 실험에 이용된다[58].

DPPH radical의 소거 활성은 Wei & Shibamoto[59]의 보고를 응용하여 다음과 같이 시행하였다. 시료를 99% 에탄올에 녹여 각각 최종 농도 100, 200, 300 μ g/mL가 되고 제조한 0.2 mM 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 용액 700 μ L를 첨가하여 혼합한 후 암소에서 20분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. positive control로서 L-ascorbic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 동일한 농도로 사용하여 대조군은 시료용액의 무첨가군의 흡광도로 진행시켰다.

각 시료의 DPPH free radical 소거능은 다음의 식에 의거하여 계산하였으며 모든 실험군은 3회 반복하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = [1 - (\text{시료의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도})] \times 100$$

(2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 양이온 (ABTS^+)은 효소 적으로 미리 생성되고 분석될 항산화제

또는 샘플이 반응 매체에 첨가된다. 이는 흡광도 감소에 의해 측정되는 ABTS+의 소실을 초래한다. 쉽고 빠르게 수행 할 수 있는 특허된 방법은 원치 않는 반응을 피하고, 라디칼 생성에 고온이 필요하지 않으며, 광범위한 pH 값에 걸쳐 항산화 활성을 연구 할 수 있기 때문에 많은 이점을 제공한다. 또한 이 방법은 샘플에서 내인성 과산화효소 활성으로 인한 간섭을 피하는 장점이 있어 식물과 다른 추출물에서 발생하는 친수성 항산화 활성의 결정이 더욱 정확하고 엄격하다 [60].

ABTS radical의 소거 활성은 신유현 등[61]의 방법을 응용하여 측정하였다. 7.4mM 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)과 2.6mM potassium persulphate를 12시간 이상 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성 시킨 후 이 용액을 735mM에서 흡광도 값이 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 시료를 99% 에탄올에 녹여 각각 최종 농도 100, 200, 300 µg/mL가 되고 700µL ABTS 용액을 첨가하여 혼합한 뒤 암소에서 30분간 방치 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA)를 사용하여 735 nm에서 측정하였다. positive control로서 L-ascorbic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 동일한 농도로 사용하여 대조군은 시료용액의 무첨가군의 흡광도로 진행시켰다.

각 시료의 ABTS free radical 소거능은 다음의 식에 의거하여 계산하였으며 모든 실험군은 3회 반복하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [1 - (\text{시료의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도})] \times 100$$

(3) Total polyphenol 함량 측정

폴리페놀은 항산화 작용이 강한 생물 활성 식물화학물질[62]로 암[63], 심혈관 질환[64] 등의 퇴행성 질환 예방에 적극적인 역할을 한다. 폴리페놀은 또한 신경 보호 작용[65]과 당뇨병 예방 작용을 하는 것으로 밝혀졌으며 비만 감소[66]에

기여할 수도 있다. 그들은 활성산소를 제거하여 산화성 손상으로부터 세포 성분을 보호함으로써 핵산, 단백질, 지질 등에 미치는 해로운 영향을 방지한다[67]. 최근에는 식이 식물 폴리페놀과 수용체 또는 신호전달에 관여하는 효소의 직접적인 상호작용도 보고되었다[68]. 따라서 폴리페놀 성분이 풍부한 추출물을 식품에 통합하면 기본적인 영양 기능에 기인하는 것 이상의 건강상의 이점을 제공할 수 있다.

폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[69]을 이용하여 측정하였다. 10배 희석 시료 500 μ L, Folin&Giocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 100 μ L, 15% sodium carbonate 용액 400 μ L를 순서대로 넣고, 혼합한 뒤 암소에서 1시간 방치 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA) 사용하여 725 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량 분석은 Gallic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 계산하여 3회 반복하였다.

2) HPLC 분석

HPLC 분석은 Waters 2998 다이오드 어레이 검출기가 장착 된 Waters 2690/5E Alliance 사중 펌프로 수행되었으며 Empower3 데이터 수집 소프트웨어 (Waters, Milford, Massachusetts, USA)로 제어되었다.

Empower3 프로그램을 사용하여 β -Cryptoxanthin 분석조건은 Kyong-Cheol Ko 등[70]의 방법에 따라 Table 1과 같다. 이동상은 HPLC-grade methanol, water, methyl tert-butyl ether (MTBE)를 사용하였으며 0.2 μ m PTFE membrane filter (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Ireland)로 여과하고 사용하였다. Lutein and β -Carotene 분석조건은 Magdalena Krajewska 등 [71]의 방법을 수정하고 Table 2과 같다. 이동상은 HPLC-grade methanol, ammonium acetate를 사용하였으며 0.2 μ m PTFE membrane filter (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Ireland)로 여과하고 사용하였다. 시료 주입량은 20 μ L이며, 445nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 2. HPLC condition for β -Cryptoxanthin.

Instrument	Waters 2690 Separation module		
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 250mm, 5-Micron)		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	35°C		
Injection volume	20 μ L		
Detector	Waters 2998 PDA (data acquisition: 200~550 nm, chromatogram: 445 nm)		
Mobile phase	A solvent = MeOH : H ₂ O : MTBE = 95 : 1 : 4 B solvent = MeOH : H ₂ O : MTBE = 25 : 71 : 4		
Gradient table	Time (min)	A (%)	B (%)
	20	100	0
	32	0	100
	37	0	100
	42	100	0
	45	100	0

Table 3. HPLC condition for Lutein and β -Carotene.

Instrument	Waters 2690 Separation module		
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 250mm, 5-Micron)		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	35°C		
Injection volume	20 μ L		
Detector	Waters 2998 PDA (data acquisition: 200~550 nm, chromatogram: 445 nm)		
Mobile phase	A solvent = MeOH : Ammonium acetate = 70 : 30 B solvent = MeOH = 100		
Gradient table	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	75	25
	1	50	50
	20	30	70
	25	0	100
	32	0	100

3) 시료 함량 분석 방법

시료 함량을 구하기 위한 식은 다음과 같이 설정하였다.

$$C_x = (A_x/AS)*CS$$

A_x : 샘플용액의 피크 면적

AS : Standard의 피크 면적

CS : Standard용액의 표준 농도(mg/mL)

C_x : 샘플용액의 용질 농도(mg/mL)

3. 통계분석

본 실험은 독립적으로 3회 반복하여 실시하였으며, 모든 실험 결과는 통계 프로그램 SPSS Version 18.0을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하고 t-test 분석, ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 실험 군의 유의성을 검증하였다.

IV. 연구 결과

1. 항산화 실험

1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과

본 실험에서는 각 시료의 DPPH radical scavenging activity를 Ascorbic acid 비해 시료용액의 무첨가군으로 대조하여 진행시켰다.

DPPH 라디칼 소거능 활성 Table 4.에서 나타내었다.

모든 시료들이 농도별 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL)에 따라 DPPH 라디칼 소거능력이 증가하였으며, CK는 발효에 따라 항산화 능력이 증가하는 반면에 PCK 경우 발효에 따라 항산화 능력이 감소하는 것으로 나타났다. CK와 PCK는 Ascorbic acid 비해 농도 300 μ g/mL에서 DPPH 라디칼 소거능력이 좀 낮았지만, 농도 100 μ g/mL, 200 μ g/mL에서 현저하게 높은 항산화 활성을 나타냈다. 감귤 원액은 감귤 껍질만 비해 높은 항산화 활성을 가지고 있지만 Ascorbic acid 비해 항산화 능력이 모두 낮은 것으로 보였다.

2) ABTS 라디칼 소거능 측정 결과

본 실험에서는 각 시료의 ABTS radical scavenging activity를 Ascorbic acid 비해 시료용액의 무첨가군으로 대조하여 진행시켰다.

ABTS 라디칼 소거능 활성 Table 5.에서 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능과 같아 모든 시료들이 농도별 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL)에 따라 ABTS 라디칼 소거능력이 증가되고 CK는 발효에 따라 항산화 능력이 증가하는 반면에 PCK 경우 발효에 따라 항산화 능력이 감소하는 것으로

나타났다. CK 발효 후와 PCK 발효 전과 감귤 껍질만 Ascorbic acid 비해 농도 별로 환산화 능력이 비슷한 경향을 나타냈다. 감귤 원액은 감귤 껍질만 비해 DPPH 라디칼 소거능 패턴은 다르게 나타났으며, 감귤 원액의 ABTS 라디칼 소거능 활성이 오히려 감소하는 것으로 나타났다.

3) Total polyphenol 함량 측정 결과

Total polyphenol 함량 측정 결과는 Table 6.에서 나타내었다.

총 페놀함량이 μg 당 Gallic acid의 등량 값으로 나타낼 때 CK 발효 전과 후 폴리페놀 함량은 각 $8.98\mu\text{g/mL}$, $35.75\mu\text{g/mL}$ 로 CK 발효 후 현저히 높은 페놀함량을 증가한다. PCK 발효 전과 후 폴리페놀 함량은 각 $19.07\mu\text{g/mL}$, $18.96\mu\text{g/mL}$ 로 비슷한 페놀함량을 보였다. 감귤 원액 폴리페놀 함량은 $20.75\mu\text{g/mL}$, 감귤 껍질만 폴리페놀 함량은 $42.28\mu\text{g/mL}$ 로 제일 높은 함량을 차지하고 있다.

Table 4. DPPH radical scavenging activity.

DPPH radical scavenging activity(%)	Sample 농도(μg/mL)	100	200	300
	감귤콤부차 발효전	26.43±1.35 ^f	47.47±3.21 ^d	68.23±3.07 ^b
감귤콤부차 발효후	47.10±5.65 ^d	72.20±5.90 ^b	83.20±3.55 ^a	
껍질콤부차 발효전	43.50±4.12 ^d	78.57±4.57 ^b	88.03±1.56 ^a	
껍질콤부차 발효후	41.00±4.28 ^d	66.47±6.22 ^b	81.13±4.29 ^a	
감귤원액	30.07±5.08 ^e	57.70±4.42 ^c	76.67±4.44 ^b	
감귤껍질만	24.63±5.06 ^f	44.27±4.28 ^d	58.83±4.51 ^c	
Ascorbic acid	33.77±0.67 ^e	58.63±0.95 ^c	90.93±0.06 ^a	

Values are means ± SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 5. ABTS radical scavenging activity.

Sample 농도(μg/mL) ABTS radical scavenging activity(%)	100	200	300
	감귤콤부차 발효전	24.37±1.10 ^f	47.13±0.35 ^d
감귤콤부차 발효후	36.53±2.18 ^e	61.87±0.93 ^c	96.57±0.06 ^a
껍질콤부차 발효전	38.20±3.65 ^e	56.17±1.50 ^c	93.87±0.12 ^a
껍질콤부차 발효후	25.20±0.95 ^f	42.83±0.64 ^d	75.53±0.64 ^b
감귤원액	42.90±1.54 ^d	56.77±1.40 ^c	76.83±0.47 ^b
감귤껍질만	59.60±1.06 ^c	78.37±1.72 ^b	96.17±0.15 ^a
Ascorbic acid	41.03±1.80 ^d	57.30±1.47 ^c	96.73±0.15 ^a

Values are means ± SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 6. Total phenolic content.

Sample	Total phenolic content($\mu\text{g/mL}$)
감귤 콤부차 발효 전	8.98 ± 0.05^e
감귤 콤부차 발효 후	35.75 ± 0.32^b
껍질 감귤 콤부차 전	19.07 ± 0.24^d
껍질 감귤 콤부차 후	18.96 ± 0.31^d
감귤 원액	20.75 ± 0.64^c
감귤 껍질만	42.28 ± 0.37^a

Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

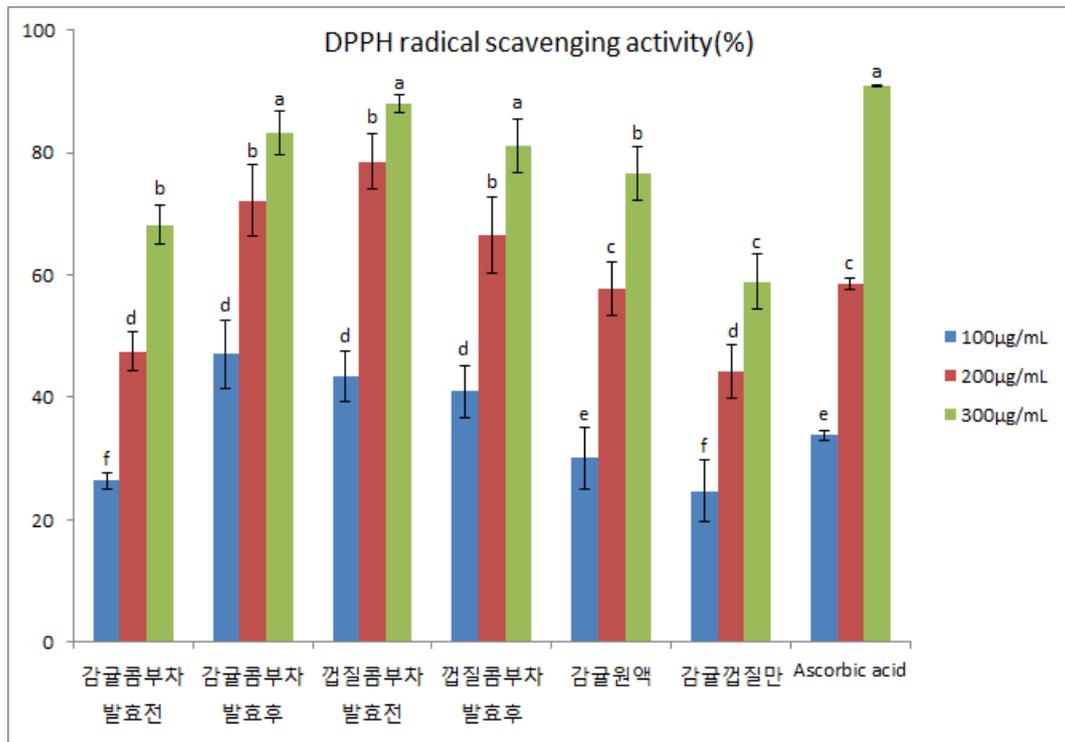


Figure 7. DPPH radical scavenging activity. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

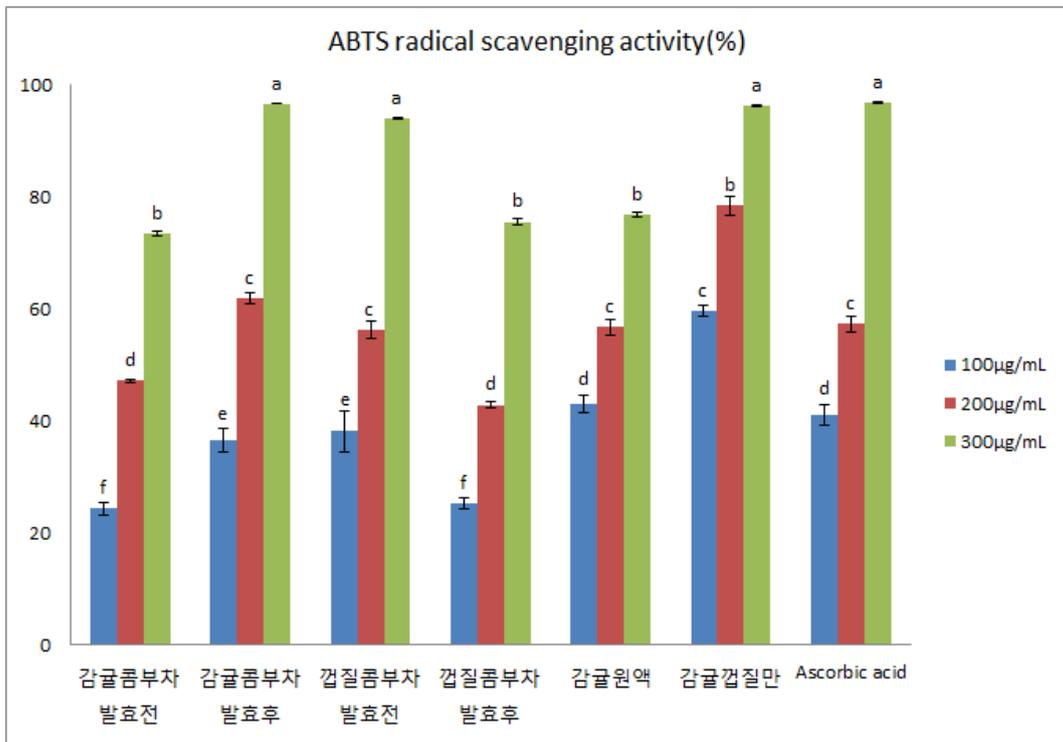


Figure 8. ABTS radical scavenging activity. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

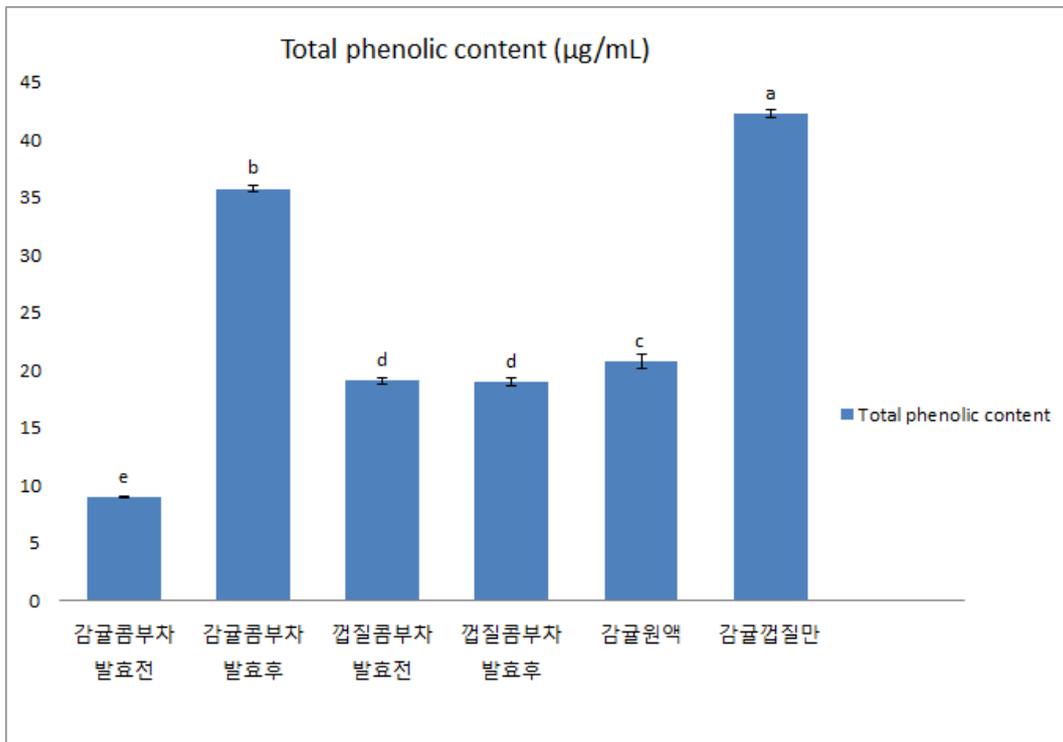
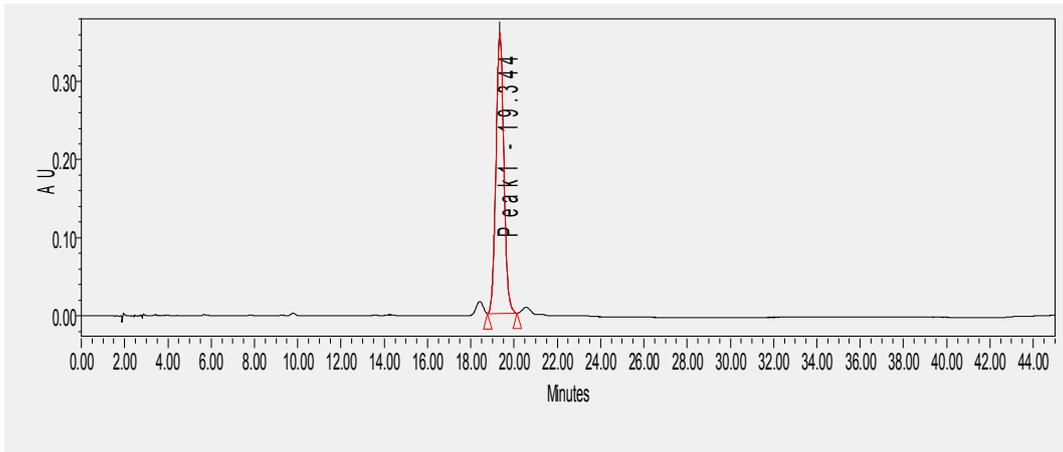


Figure 9. Total phenolic content. Values are means \pm SD of three independent experiments; Letters indicate significant differences among samples determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

2. HPLC를 이용하여 발효에 따른 각 시료의 β -Cryptoxanthin 함량 측정 결과

HPLC를 사용하여 시료의 크로마토그램을 확인하였다.

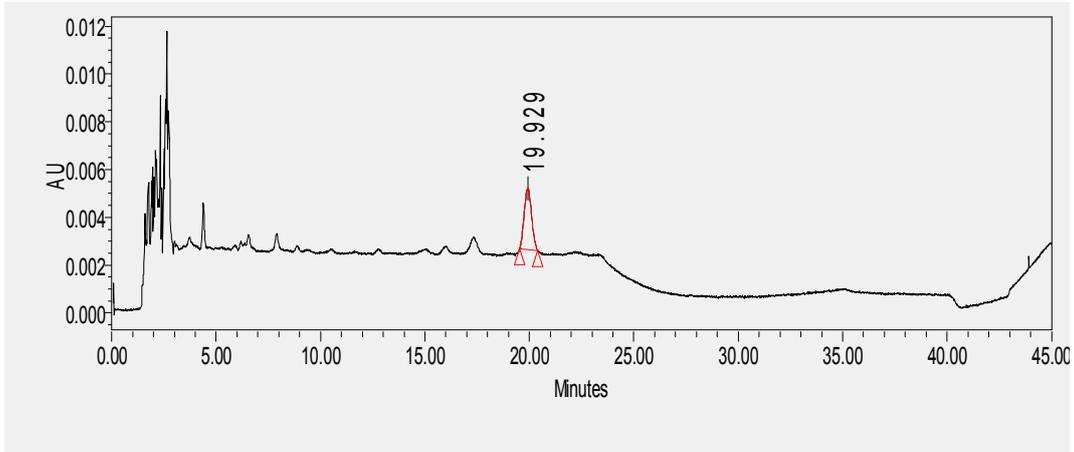
1) Standard β -cryptoxanthin 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	cryptoxanthin	19.344	0.161	0.278	9104976	100.00	358494	VV	Found

Figure 10. HPLC chromatograms of standard β -Cryptoxanthin.

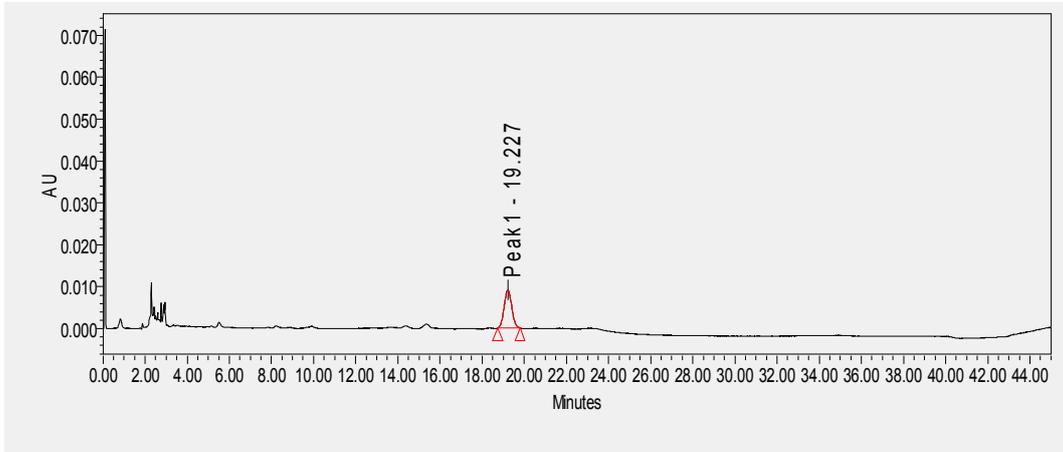
2) 감귤콤부차 발효전 β -cryptoxanthin 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	Peak	19.929	10.996	1.456	63578	100.00	2572	BB	Found

Figure 11. HPLC chromatograms of Citrus Kombucha fermented 0 day.

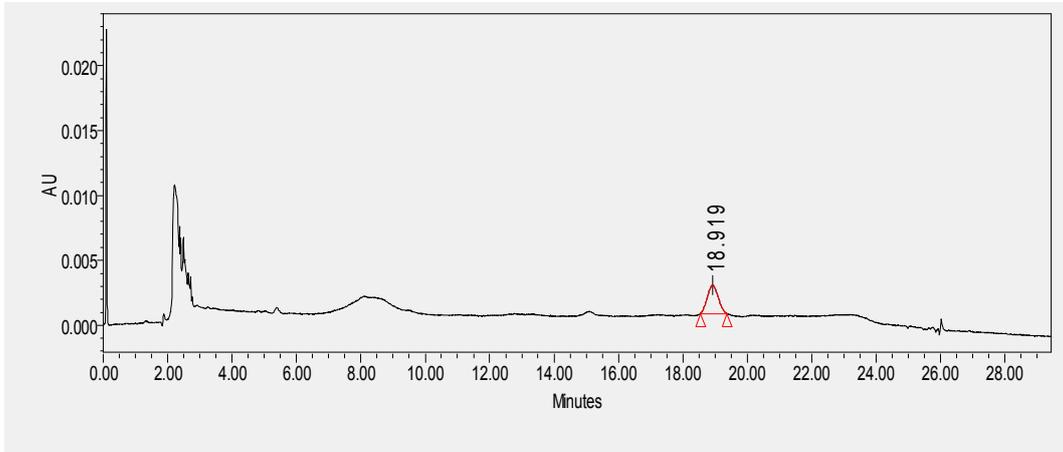
3) 감귤콤부차 발효후 β -cryptoxanthin 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	Peak	19.227	1.980	3.378	227111	100.00	9840	BB	Found

Figure 12. HPLC chromatograms of Citrus Kombucha fermented 14 days.

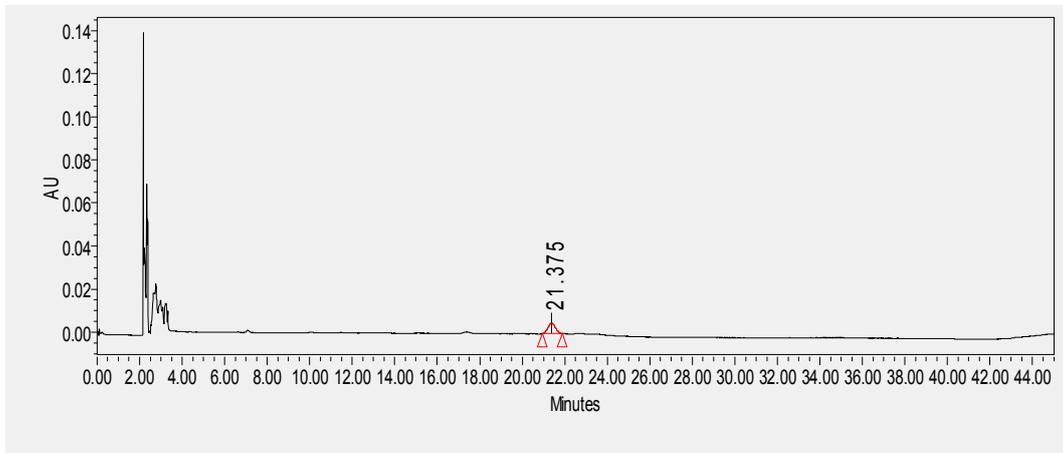
4) 껍질감귤콤부차 발효전 β -cryptoxanthin 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	Peak	18.919	1.187	4.600	51907	100.00	2202	BB	Found

Figure 13. HPLC chromatograms of Peel Citrus Kombucha fermented 0 day.

5) 껍질감귤콤부차 발효후 β -cryptoxanthin 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	Peak	21.375	2.232	16.335	118689	100.00	4903	BB	Found

Figure 14. HPLC chromatograms of Peel Citrus Kombucha fermented 14 days.

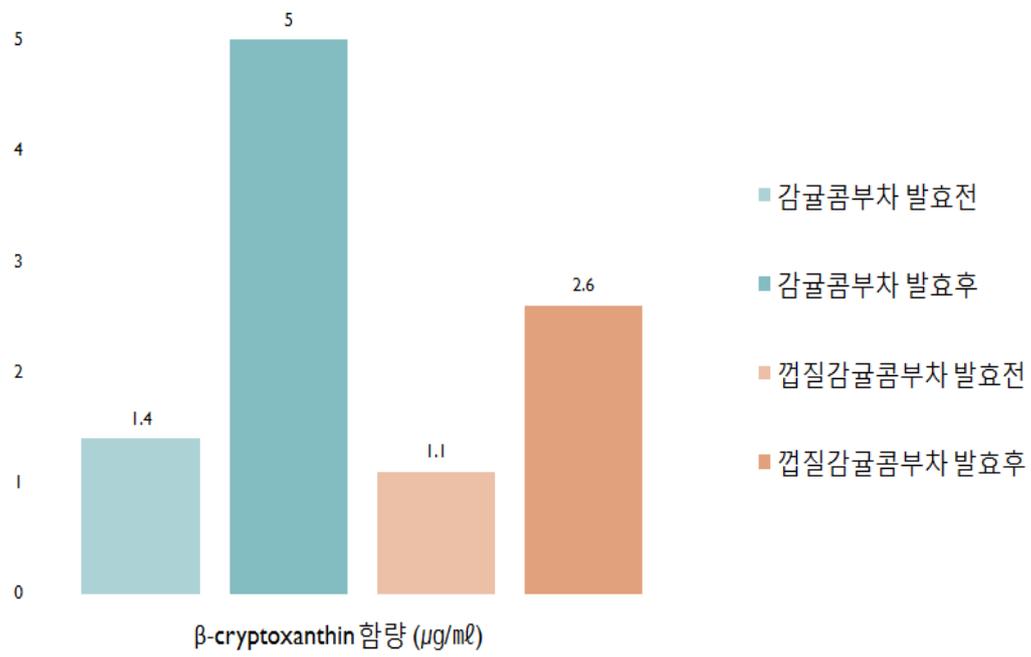
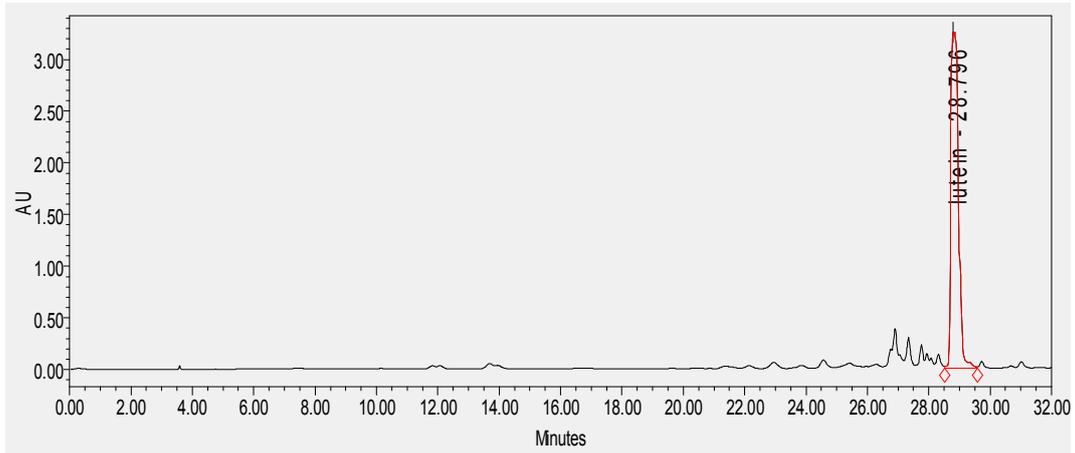


Figure 15. Changes in β -Cryptoxanthin content by fermentation.

3. HPLC를 이용하여 발효에 따른 각 시료의 Lutein 및 β -Carotene 함량 측정 결과

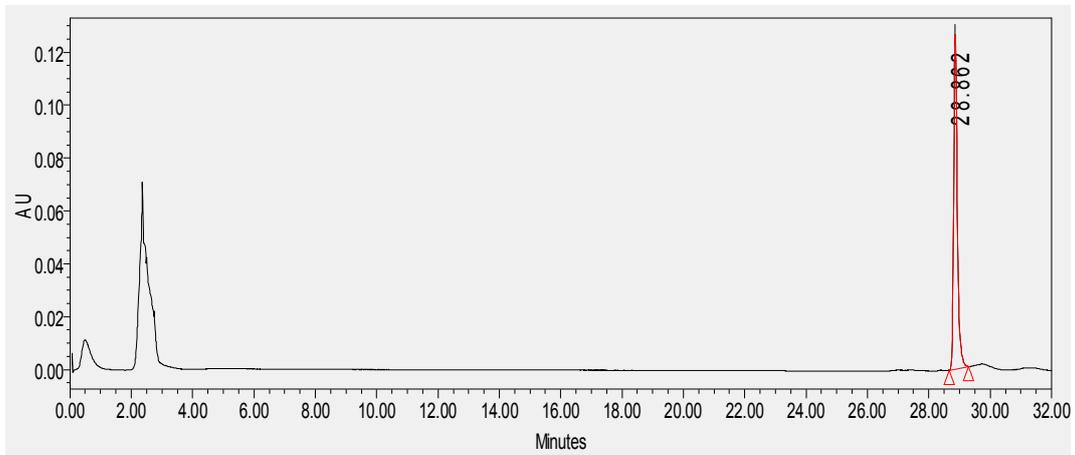
1) Standard Lutein 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	lutein	28.796	16.129	15.381	55996233	100.00	3251077	VV	Found

Figure 16. HPLC chromatograms of standard Lutein.

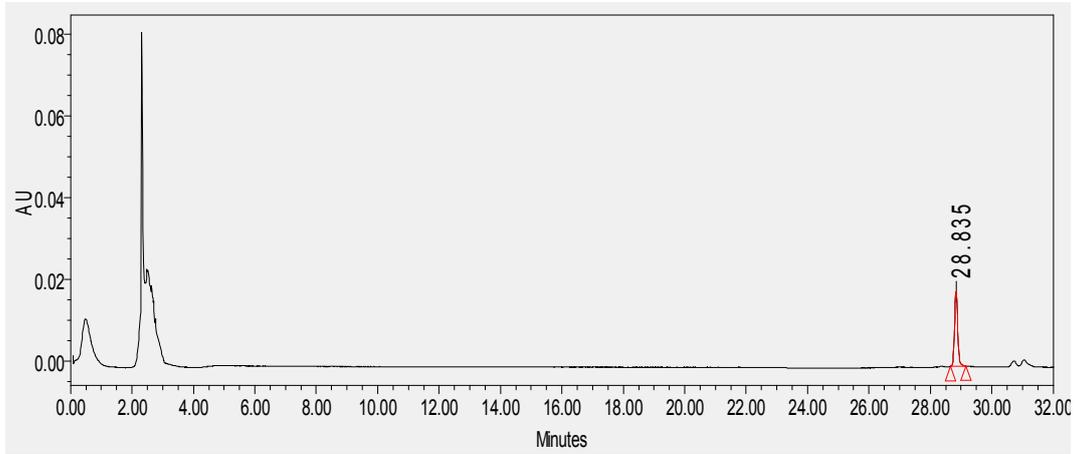
2) Lutein 첨가된 콤부차 발효전 Lutein 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	28.862	0.185	13.169	1022124	100.00	126379	BB	Found

Figure 17. HPLC chromatograms of Lutein adopted Kombucha fermented 0 day.

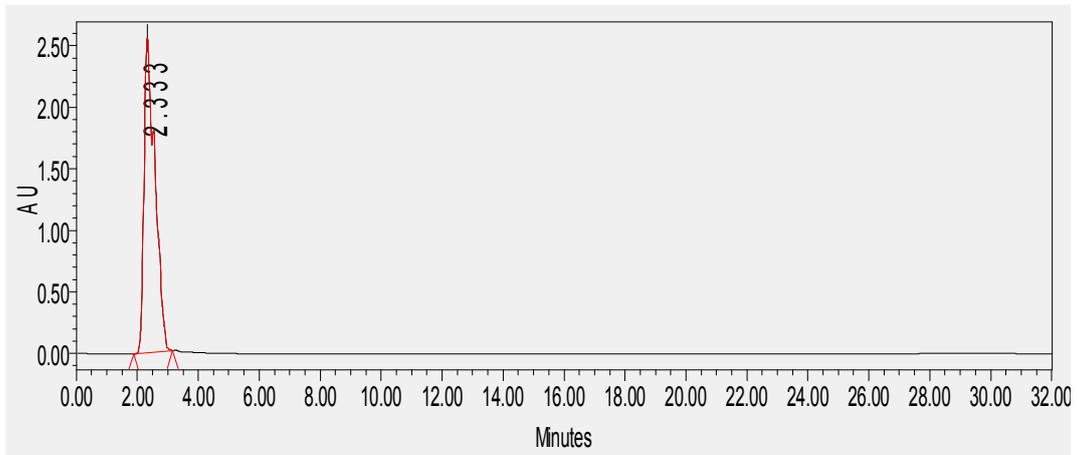
3) Lutein 첨가된 콤부차 발효후 Lutein 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	28.835	0.880	90.000	129466	100.00	18215	BB	Found

Figure 18. HPLC chromatograms of Lutein adopted Kombucha fermented 14 days.

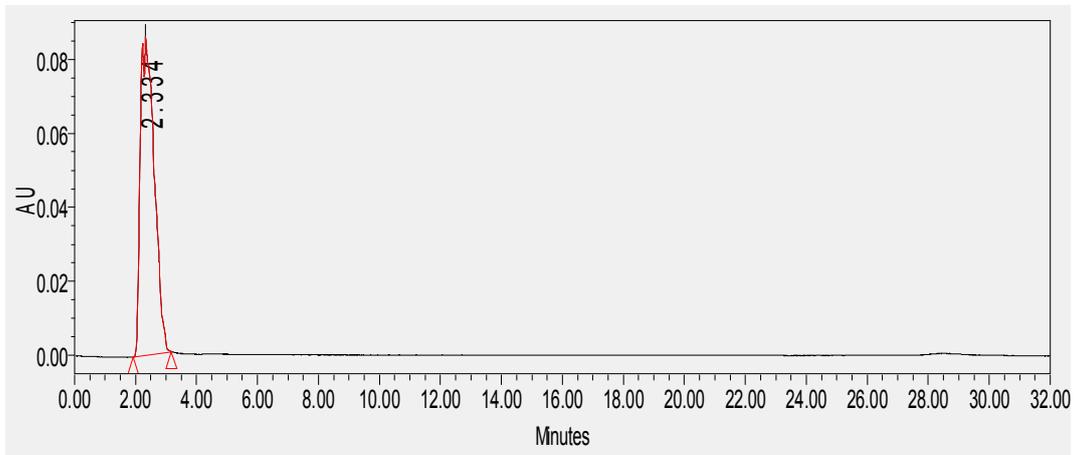
4) Standard β -Carotene 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	2.333	6.163	7.716	64108674	100.00	2558464	BB	Found

Figure 19. HPLC chromatograms of standard β -Carotene.

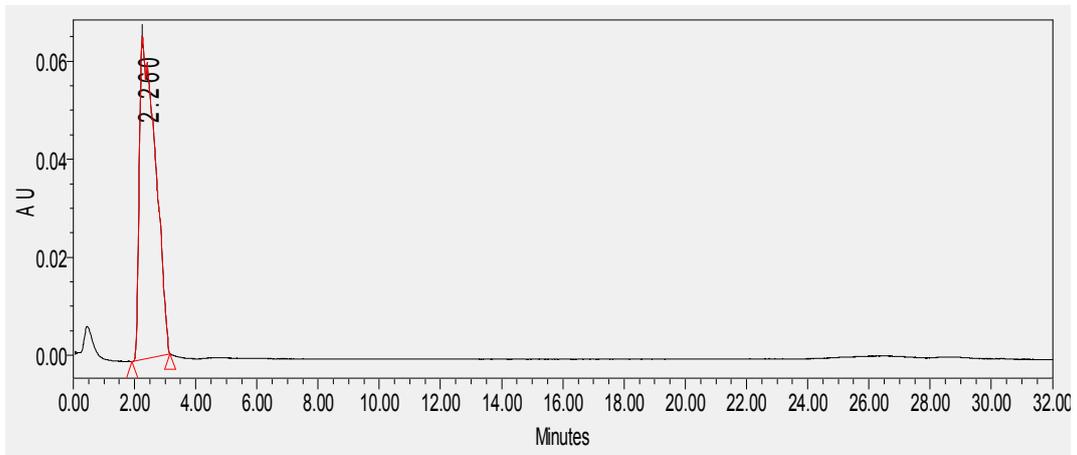
5) β -Carotene 첨가된 콤부차 발효전 β -Carotene 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	2.334	7.394	9.445	2747926	100.00	86156	Bb	Found

Figure 20. HPLC chromatograms of β -Carotene adopted Kombucha fermented 0 day.

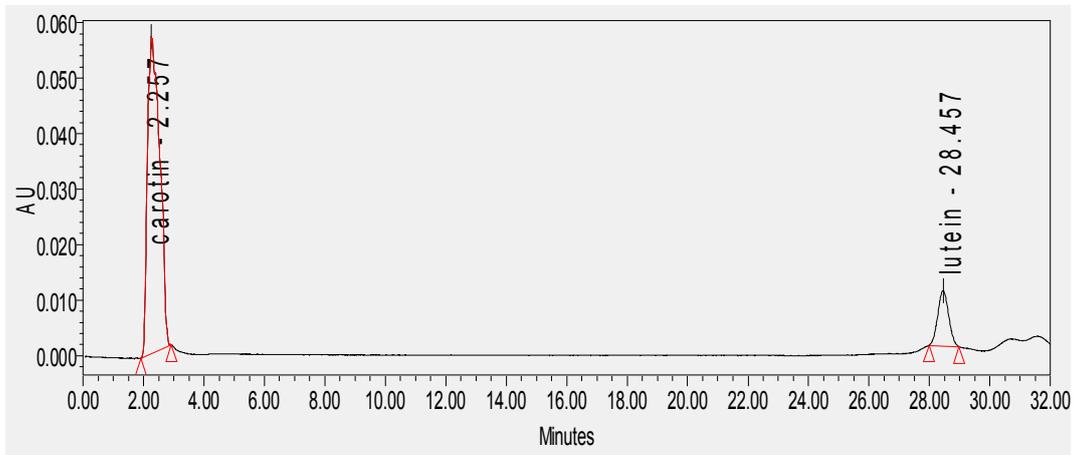
6) β -Carotene 첨가된 콤부차 발효후 β -Carotene 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	2.260	17.012	9.471	2382011	100.00	65946	Bb	Found

Figure 21. HPLC chromatograms of β -Carotene adopted Kombucha fermented 14 days.

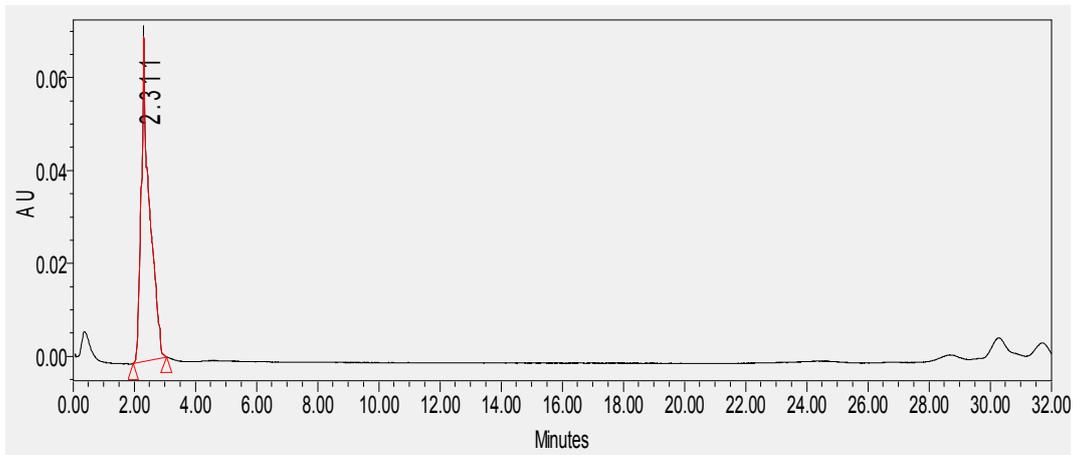
7) Lutein과 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효전 Lutein 및 β -Carotene 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	carotin	2.257	10.845	6.686	1611864	86.63	57097	BB	Found
2	lutein	28.457	4.936	0.740	248773	13.37	9965	BB	Found

Figure 22. HPLC chromatograms of Lutein and β -Carotene adopted Kombucha fermented 0 day.

8) Lutein과 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효후 Lutein 및 β -Carotene 함량



	Name	Retention Time	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area	% Area	Height	Int Type	Peak Type
1	peak	2.311	7.055	9.613	1302491	100.00	70017	Bb	Found

Figure 23. HPLC chromatograms of Lutein and β -Carotene adopted Kombucha fermented 14 days.

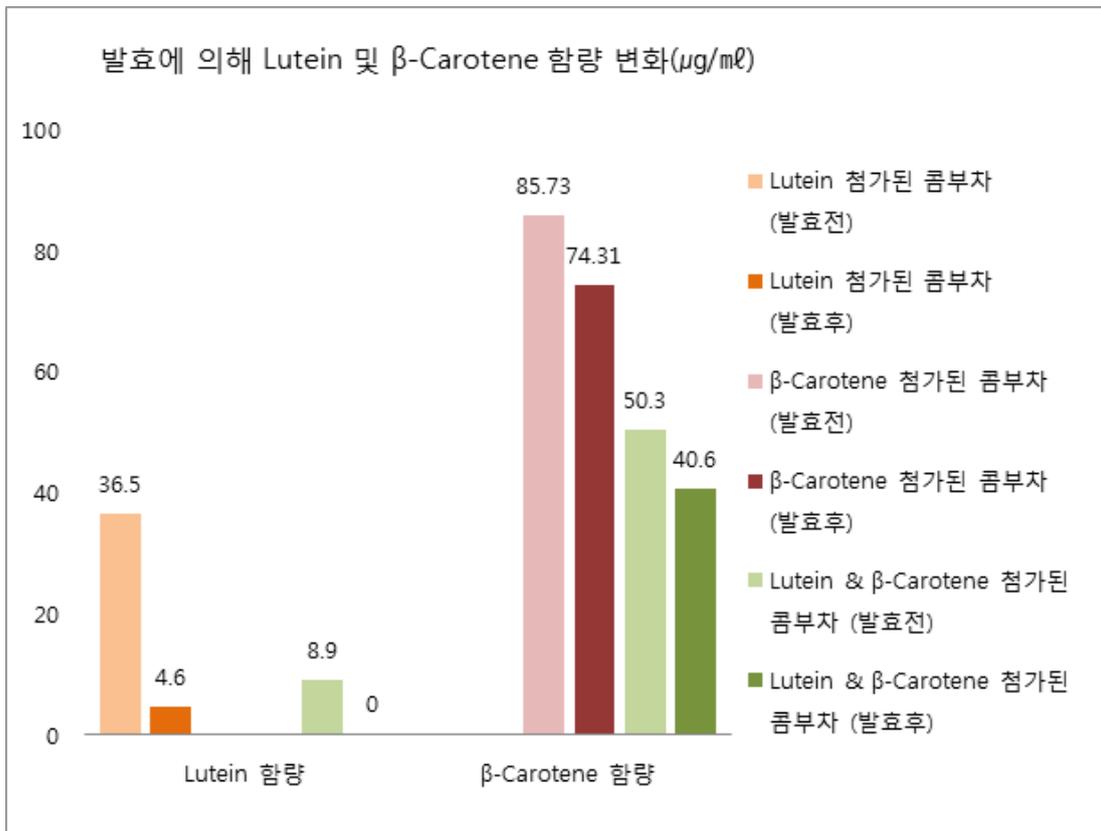


Figure 24. Changes in Lutein and β -Carotene content by fermentation.

V. 고찰

감귤 콤부차 (CK=Citrus Kombucha) 발효에 따라 항산화 능력이 증가하는 반면 껍질 감귤 콤부차 (PCK=Peel Citrus Kombucha) 경우 발효에 따라 항산화 능력이 감소하는 것으로 나타났다. CK와 PCK는 Ascorbic acid에 비해 농도 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 DPPH 라디칼 소거능력이 좀 낮았지만, 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 현저하게 높은 항산화 활성을 나타냈다. 감귤 원액은 감귤 껍질에 비해 높은 항산화 활성을 가지고 있지만 Ascorbic acid에 대해서는 항산화 능력이 낮은 것으로 보였다. ABTS 라디칼 소거능력에서 CK 발효 후와 PCK 발효 전과 감귤 껍질만 Ascorbic acid 비해 농도별로 항산화 능력이 비슷한 경향을 나타냈다. 감귤 원액은 감귤 껍질만 비해 DPPH 라디칼 소거능 패턴은 다르게 나타났으며, 감귤 원액의 ABTS 라디칼 소거능 활성이 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 이는 즉시 사용할 수 있는 DPPH 라디칼과 달리 ABTS는 효소 (peroxidase, myoglobin) 또는 화학 물질 (이산화망간, 과황산칼륨, ABAP)등에 의해 라디칼을 생성하여 사용하여야 하며, 반드시 유기 용매를 사용하여야 하는 DPPH와는 달리 ABTS는 물과 유기용매를 모두 사용할 수 있기 때문에 hydrophilic 또는 lipophilic 시료의 자유 라디칼 소거 능력을 측정할 수 있다는 차이[72]에서 나온 결과로 보여 진다. 총 페놀함량에서 CK 발효 전과 비교하여 CK 발효 후 페놀함량이 현저히 증가하였으며, PCK와 감귤 원액보다 높은 페놀함량을 확인되었지만 감귤 껍질만 폴리페놀 함량은 42.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 제일 높은 함량을 나타내고 있다. 폴리페놀은 약 42개 식물군에 널리 분포되어있다. 식물 종류에 따라 식물 부분에서 생식 번식에 이르기까지, 즉 줄기, 가지, 나무껍질, 꽃, 잎, 뿌리, 뿌리줄기, 씨앗, 과일, 껍질 등 모든 식물 부분에서 지상과 지하에서 폴리페놀을 발견할 수 있다. 감귤류의 과육 부분과 비교할 때 가장 높은 농도의 폴리페놀은 껍질에서 발견되었다[73]. 이에 실험 결과와 일치이다.

CK와 PCK 발효에 의한 카로티노이드의 변화 HPLC를 통해 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. CK 발효 전과 후의 β -Cryptoxanthin 함량은 각 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

5.0 μ g/mL. PCK 발효 전과 후의 β -Cryptoxanthin 함량은 각 1.1 μ g/mL, 2.6 μ g/mL. CK와 PCK가 발효 이후에 β -cryptoxanthin 함량이 모두 증가된다. CK 발효 후보다 PCK 발효 후 증가율이 더 적은 것은 감귤 껍질 내에는 essential compound (essential oil)가 존재하는데, 이 essential oil이 항균활성[74]을 가지고 있어서 그로 인해 발효가 덜 진행되었다고 볼 수 있다.

Lutein 첨가된 콤부차 (A) 발효 전과 후의 Lutein 함량은 각 36.5 μ g/mL, 4.6 μ g/mL. β -Carotene 첨가된 콤부차 (B) 발효 전과 후의 β -Carotene 함량은 각 85.7 μ g/mL, 74.3 μ g/mL. Lutein, β -Carotene이 첨가된 콤부차 (C)의 발효 전과 후의 Lutein 함량은 각 8.9 μ g/mL, 0 μ g/mL이고 β -Carotene 함량은 각 50.3 μ g/mL, 40.6 μ g/mL이었다. Lutein 첨가된 콤부차, β -Carotene 첨가된 콤부차와 Lutein와 β -Carotene 첨가된 콤부차는 발효 과정에서 Lutein와 β -Carotene 함량이 모두 감소된다. 발효에 의하여 카로티노이드의 발효 과정에서 생합성 작용이 불가능하지만, 색소가 있는 부유물질의 내부 구조의 일부 변화는 분석 절차 중 추출성을 향상시킬 수 있다[37]. 이상의 결과에서 감귤 콤부차 발효 후는 β -Cryptoxanthin 함량이 증가되는데 이는 Lutein와 β -Carotene의 함량이 줄어드는 현상과 상관관계가 있는 것으로 예상되며 Dámaso Hornero-Méndez 등[11]의 논문과 일치되는 결과이다.

VI. 요약 및 결론

본 연구는 감귤 콤부차 (CK= Citrus Kombucha)와 껍질 감귤 콤부차 (PCK= Peel Citrus Kombucha) 발효에 의해 이화학적 특성을 비교하기 위해 항산화 실험을 실시하였으며, 발효 전과 후 카로티노이드인 β -cryptoxanthin (β -CX)함량 변화 그리고 Lutein 및 β -Carotene 함량 변화를 HPLC를 이용하여 측정하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항산화 활성능력 측정에서 DPPH, ABTS 라디칼 소거능력에서 CK는 발효에 따라 각 농도별 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL) 항산화 능력이 증가하는 반면에 PCK 경우는 발효전 각 농도별 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL) 항산화 능력이 존재하는데 발효에 따라 항산화 능력이 일부 감소하는 것으로 나타났다. DPPH 라디칼 소거능에서 CK와 PCK는 Ascorbic acid 비해 농도 300 μ g/mL에서 낮은 소거능을 보였지만, 농도 100 μ g/mL, 200 μ g/mL에서는 현저하게 높은 항산화 활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거능력에서 CK와 PCK는 Ascorbic acid 비해 농도별로 항산화 능력이 비슷한 경향을 나타냈다. 총 페놀함량에서는 CK 발효 전과 후 폴리페놀 함량이 많이 증가하고 PCK 발효 전과 후 폴리페놀 함량은 비슷하게 나타났다. CK 발효에 의해 항산화 능력이 증가하고 PCK 발효 후의 항산화 능력이 감소한다는 결과를 보면 껍질속의 물질이 콤부차 발효 과정에서 항산화 물질의 구조를 변화시키거나 활성을 저해시키는 것으로 판단된다.
2. β -크립토잔틴의 함량을 정량적으로 측정하기 위해 HPLC 분석을 실행하였다. β -크립토잔틴의 retention time은 19분쯤이었다. CK 발효 전과 후의 β -Cryptoxanthin 함량은 각 1.4 μ g/mL, 5.0 μ g/mL였다. PCK 발효 전과 후의 β

-Cryptoxanthin 함량은 각 1.1 μ g/mL, 2.6 μ g/mL였다. CK와 PCK가 발효에 의해 β -Cryptoxanthin 함량이 모두 증가된다.

3. Lutein와 β -Carotene의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 루테인의 retention time은 28.8분이고 β -Carotene retention time은 2.3분이었다. Lutein 첨가된 콤부차 발효 전과 후의 Lutein 함량은 각 36.5 μ g/mL, 4.6 μ g/mL였다. β -Carotene 첨가된 콤부차 발효 전과 후의 β -Carotene 함량은 각 85.7 μ g/mL, 74.3 μ g/mL였다. Lutein와 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효 전과 후의 Lutein 함량은 각 8.9 μ g/mL, 0 μ g/mL이고 β -Carotene 함량은 각 50.3 μ g/mL, 40.6 μ g/mL였다. 이는 발효 때문에 색소 구조가 변화되어 Lutein 함량이 많이 감소되고 β -Carotene의 함량은 약간 감소된다.

본 연구 결과 감귤 콤부차는 껍질 감귤 콤부차 비해 발효에 따라 높은 항산화 능력, 높은 페놀함량을 가지고 발효 후 β -Cryptoxanthin 함량 모두 증가됐다. 이는 감귤 내에 Lutein과 Carotene이 β -Cryptoxanthin으로 생물전환(bioconversion)된 것으로 추측되며 이를 바탕으로 감귤 콤부차는 건강 효과를 발휘할 수 있는 식품 개발 및 건강식품 가공에 사용될 수 있음을 제시한다.

VII. 참고문헌

1. Biljana Bauer-Petrovska, Lidija Petrushevska-Tozi. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Food Science and Technology*. Volume 35, Issue 2, 2000, Pages 201-205.
2. Rasu Jayabalan, Radomir V. Malbaša, Eva S. Lončar, Jasmina S. Vitas, Muthuswamy Sathishkumar. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 13, Issue 4, 2014, Pages 538-550.
3. Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*. Volume 33, Issue 6, 2000, Pages 409-421.
4. Guttapadu Sreeramulu, Yang Zhu, Wieger Knol. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 48, Issue 6, 2000, Pages 2589-2594.
5. Isabel Cerrillo, Blanca Escudero-López, Dámaso Hornero-Méndez, Francisco Martín, and María-Soledad, Fernández-Pachón. Effect of Alcoholic Fermentation on the Carotenoid Composition and Provitamin A Content of Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 62, Issue 4, 2014, Pages 842 - 849.
6. Fang Wang, Jieru Lin, Lingling Xu, Qianqian Peng, Hangyin Huang, Linjia Tong, Qi Lu, Changchun Wang, Li Yang. On higher nutritional and medical properties of a carotenoid-rich mutant pomelo (*Citrus maxima* (L.) Osbeck). *Industrial Crops and Products*. Volume 127, 2019, Pages 142-147.

7. Paul D. Fraser, Peter M. Bramley. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. Volume 43, Issue 3, 2004, Pages 228-265.
8. Ramesh Kumar Saini, Shivraj Hariram Nile, Se Won Park. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*. Volume 76, Part 3, 2015, Pages 735-750.
9. Christopher I. Cazzonelli. carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*. Volume 38, Issue 11, 2011, Pages 833-847.
10. Marjorie J. Haskell. Provitamin A carotenoids as a dietary source of vitamin A. *Carotenoids and Human Health*. Volume 87, 2013, Pages 249-260.
11. Dámaso Hornero-Méndez, Isabel Cerrillo, Ángeles Ortega, María-Rosario Rodríguez-Griñolo, Blanca Escudero-López, Franz Martín, María-Soledad Fernández-Pachón. β -Cryptoxanthin is more bioavailable in humans from fermented orange juice than from orange juice. *Food Chemistry*. Volume 262, 2018, Pages 215-220.
12. Betty J. Burri. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 95, Issue 9, 2015, Pages 1786-1794.
13. Betty J. Burri, Michael R. La Frano, Chenghao Zhu. Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin. *Nutrition Reviews*. Volume 74, Issue 2, 2016, Pages 69 - 82.
14. Yujing Sun, Wenyang Tao, Haizhi Huang, XingqianYe, Peilong Sun. Flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity of fresh eating citrus fruits, using the coupled in vitro digestion and human intestinal HepG2

cells model. *Food Chemistry*. Volume 279, 2019, Pages 321-327.

15. Chang-Jie Xu, Paul D. Fraser, Wei-Jie Wang, and Peter M. Bramley. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and Lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 54, Issues 15, 2006, Pages 5474 - 5481.

16. Paola Dugo, Miguel Herrero, Tiina Kumm, Daniele Giuffrida, Giovanni Dugo, Luigi Mondello. Comprehensive normal-phase \times reversed-phase liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection for the analysis of free carotenoids and carotenoid esters from mandarin. *Journal of Chromatography A*. Volume 1189, Issues 1 - 2, 2008, Pages 196-206.

17. Masamichi Yano, Masaya Kato, Yoshinori Ikoma, Akemi Kawasaki, Yoshino Fukazawa, Minoru Sugiura, Hikaru Matsumoto, Yumiko Oohara, Akihiko Nagao, Kazunori Ogawa. Quantitation of Carotenoids in Raw and Processed Fruits in Japan. *Food Science and Technology Research*. Volume 11, Issues1, 2005, Pages 13-18.

18. Masaya Kato, Yoshinori Ikoma, Hikaru Matsumoto, Minoru Sugiura, Hiroshi Hyodo, Masamichi Yano. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiology*. Volume 134, Issue 2, 2004.

19. Cuihua Liu, Fuhua Yan, Huijun Gao, Min He, Zhuang Wang, Yunjiang Cheng, Xiuxin Deng, Juan Xu. Features of citrus terpenoid production as revealed by carotenoid, limonoid and aroma profiles of two pummelos (*Citrus maxima*) with different flesh color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 95, Issue 1, 2015, Pages 111-119.

20. Attila Agócs, Veronika Nagy, Zoltán Szabó, László Márk, Róbert Ohmacht, József Deli. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and

the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 8, Issue 3, September 2007, Pages 390–394.

21. Pedro Mena, Juan A. Ascacio-Valdés, Amadeo Gironés-Vilaplana, Daniele Del Rio, Diego A. Moreno, Cristina García-Viguera. Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly)phenolic compounds. *Food Chemistry*. Volume 145, 15 February 2014, Pages 327–334.

22. Maria Rosa Pérez-Gregorio, Jorge Regueiro, Elisa Alonso-González, L.M. Pastrana-Castro, Jesus Simal-Gándara. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*. Volume 44, Issue 8, October 2011, Pages 1793–1801.

23. Chandran Matheyambath Ajila, Satinder Brar, Mausam Verma, Rajeshwar D. Tyagi, Joseph Rene Valéro. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. Volume 126, Issue 3, 2011, Pages 1071–1080.

24. Louise Svensson, Bonno Sekwati-Monang, Daise Lopes Lutz, Andreas Schieber, Michael G. Gänzle. Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 58, Issue 16, 2010, Pages 9214–9220.

25. Eunju Yang, Sangin Kim, Sangyun Park, Hanyeol Bang, Jihye Jeong, Jaihyun So, Inkoo Rhee, Kyungsik Song. Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 50, Issue 6, 2012, Pages 2042–2048

26. Sol Maiam Rivera, Ramon Canela-Garayoa. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*.

Volume 1224, 2012, Pages 1-10.

27. Rasu Jayabalan, Radomir V. Malbaša, Eva S. Lončar, Jasmina S. Vitas, Muthuswamy Sathishkumar. A Review on Kombucha Tea –Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume13, Issue 4, 2014, Pages 538-550.

28. Semantee Bhattacharya, Ratan Gachhui, Parames C. Sil. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 60, 2013, Pages 328-340.

29. Rasu Jayabalan, Subbaiya Marimuthu, Krishnaswami Swaminathan. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. Volume 102, Issue 1, 2007, Pages 392-398.

30. Somnath Chakravorty, Semantee Bhattacharya, Antonis Chatzinotas, Writachit Chakraborty, Debanjana Bhattacharya, Ratan Gachhui. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 220, 2016, Pages 63-72.

31. Radomir V. Malbaša, Eva Stjepan Lončar, Jasmina S. Vitas, Jasna M. Čanadanović-Brunet. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*. Volume 127, Issue 4, 2011, Pages 1727-1731.

32. Francesca De Filippis, Antonio Dario Troise, Paola Vitaglione, Danilo Ercolini. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*. Volume 73, 2018, Pages 11-16.

33. Vladimir R. Vukic, Dajana V. Hrnjez, Katarina G. Kanuric, Spasenija D. Milanovic, Mirela D. Iličić, Aleksandra M. Torbica, Jelena M. Tomic. The Effect of Kombucha Starter Culture on the Gelation Process, Microstructure and Rheological Properties during Milk Fermentation. *Journal of Texture Studies*. Volume 45, Issue 4, 2014, Pages 261-273.
34. Rafaela Guimarães, Lillian Barros, João C.M. Barreira, M. João Sousa, Ana Maria Carvalho Isabel C.F.R. Ferreira. Targeting excessive free radicals with peels and juices of Citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 48, Issue 1, 2010, Pages 99-106.
35. Gianni Sacchetti, Silvia Maietti, Mariavittoria Muzzoli, Martina Scaglianti, Stefano Manfredini, Matteo Radice, Renato Bruni. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. Volume 91, Issue 4, 2005, Pages 621-632.
36. Antonella Smeriglio, Laura Cornara, Marcella Denaro, Davide Barreca, Bruno Burlando, Jianbo Xiao, Domenico Trombetta. Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: Microscopic observations and polyphenol characterization. *Food Chemistry*. Volume 279, 2019, Pages 347-355.
37. Blanca Escudero-Lopez, Isabel Cerrillo, Griselda Herrero-Martín, Damaso Hornero-Mendez, Angel Gil-Izquierdo, Sonia Medina, Federico Ferreres, Genoveva Berna, Francisco Martín and Maria-Soledad Fernandez-Pachon. Fermented Orange Juice: Source of Higher Carotenoid and Flavanone Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 61, Issue 37, 2013, Pages 8773 - 8782.
38. Zhuo Zou, Wanpeng Xi, Yan Hu, Chao Nie, Zhiqin Zhou. Antioxidant

activity of Citrus fruits. Food Chemistry. Volume 196, 2016, Pages 885-896.

39. Seong-II Kang, Hye-Sun Shin, Hyo-Min Kim, Youn-Suk Hong, Seon-A Yoon, Seung-Woo Kang, Jeong-Hwan Kim, Moo-Han Kim, Hee-Chul Ko, Se-Jae Kim. Immature Citrus sunki Peel Extract Exhibits Antiobesity Effects by β -Oxidation and Lipolysis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. Volume 35, Issue 2, 2012, Pages 223-230.

40. Sohail Ejaz, Ahmed Ejaz, Kiku Matsuda, Chae Woong Lim. Limonoids as cancer chemopreventive agents. Journal of the Science of Food and Agriculture. Volume 86, Issue 3, 2006, Pages 339-345.

41. Yong-Dug Kim, Senevirathne Mahinda, Kyung-Soo Koh, You-Jin Jeon, Soo-Hyun Kim. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. Volume 38, Issue 4, 2009, Pages 462 - 469.

42. Agnes G. Schuurman, R. Alexandra Goldbohm, Henny A. M. Brants & Piet A. van den Brandt. A prospective cohort study on intake of retinol, vitamins C and E, and carotenoids and prostate cancer risk(Netherlands). Cancer Causes & Control. Volume 13, Issue 6, 2002, Pages 573 - 582.

43. Minoru Sugiura, Masaya Kato, Hikaru Matsumoto, Akihiko Nagao, Masamichi Yano. Serum Concentration of β -Cryptoxanthin in Japan Reflects the Frequency of Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marc.) Consumption. Journal of Health Science. Volume 48, Issue 4, 2002, Pages 350-353.

44. Claudie Dhuique-Mayer, Patrick Borel, Emmanuelle Reboul, Bertrand Caporiccio, Pierre Besancon and Marie-Josèphe Amiot. β -Cryptoxanthin from Citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. British Journal of Nutrition. Volume 97, Issue 5, 2007,

Pages 883-890.

45. Judy D. Ribaya-Mercado. Influence of Dietary Fat on β Carotene Absorption and Bioconversion into Vitamin A. *Nutrition Reviews*. Volume 60, Issue 4, 2002, Pages 104-110.
46. Yolanda Lorenzo, Amaia Azqueta, Luisa Luna, Félix Bonilla, Gemma Domínguez, Andrew R. Collins. The carotenoid β -cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis*, Volume 30, Issue 2, 2009, Pages 308 - 314.
47. Masayoshi Yamaguchi. β -Cryptoxanthin and Bone Metabolism: The Preventive Role in Osteoporosis. *Journal of Health Science*. Volume 54, Issue 4, 2008, Pages 356-369.
48. Masayoshi Yamaguchi. Role of carotenoid β -cryptoxanthin in bone homeostasis. *Journal of Biomedical Science*. Volume 19, Issue 36, 2012.
49. Masayoshi Yamaguchi, Satoshi Uchiyama. Effect of Carotenoid on Calcium Content and Alkaline Phosphatase Activity in Rat Femoral Tissues in Vitro: The Unique Anabolic Effect of β -Cryptoxanthin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. Volume 26, Issue 8, 2003, Pages 1188-1191.
50. Pinteá Adela, Dumitrița Rugină, Carmen Momeu. beta-cryptoxanthin uptake in retinal pigment epithelial cells. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences*. Volume 65, Issue 1, 2008, Pages 182-187.
51. Satoshi Uchiyam, Masayoshi Yamaguchi. Oral Administration of β -Cryptoxanthin Prevents Bone Loss in Streptozotocin-Diabetic Rats in Vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. Volume 28, Issue 9, 2005, Pages 1766-1769.
52. Kosuke Nishi, Ayako Muranaka, Sogo Nishimoto, Ayumu Kadota, Takuya

Sugahara. Immunostimulatory effect of β -cryptoxanthin in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*. Volume 4, Issue 3, 2012, Pages 618-625.

53. Akira Iwata, Satoshi Matsubara, Kouji Miyazaki. Beneficial effects of a beta-cryptoxanthin-containing beverage on body mass index and visceral fat in pre-obese men: Double-blind, placebo-controlled parallel trials. *Journal of Functional Foods*. Volume 41, 2018, Pages 250-257.

54. Asuka Hirose, Masakazu Terauchi et al. Higher intake of cryptoxanthin is related to low body mass index and body fat in Japanese middle-aged women. *Maturitas*. Volume 96, 2017, Pages 89-94.

55. Betty J. Burri, Jasmine S. T. Chang, Terry R. Neidlinger. β -Cryptoxanthin- and α -carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than β -carotene-rich foods in Western diets. *British Journal of Nutrition*. Volume 105, Issue 2, 2011, Pages 212-219.

56. Michael R. La Frano, Chenghao Zhu, Betty J. Burri. Assessment of tissue distribution and concentration of β -cryptoxanthin in response to varying amounts of dietary β -cryptoxanthin in the Mongolian gerbil. *British Journal of Nutrition*. Volume 111, Issue 6, 2014, Pages 968-978.

57. Orla F. O'Connell, Lisa Ryan, Nora M. O'Brien. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*. Volume 27, Issue 5, 2007, Pages 258-264.

58. Seok-Moon Jeong, So-Young Kim, Hae-Ryong Park, Seung-Cheol Lee. Effect of Far - Infrared Radiation on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus unshiu Peels. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. Volume 33, Issue 9, 2004, Pages 1580-1583.

59. Wei A, Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of

various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 55, Issue 5, 2007, Pages 1737-1742.

60. Marino B. Arnao, Antonio Cano, Manuel Acosta. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. Volume 73, Issue 2, 2001, Pages 239-244.

61. Yu-Hyeon Shin, Hyun-Jung Kim, Jin-Young Lee, Young-Je Cho, Bong-Jeun An. Major Compound Analysis and Assessment of Natural Essential Oil on Anti-Oxidative and Anti-Microbial Effects. *Korean Society of Life Science*. Volume 22, Issue 10, 2012, Pages 1344-1351.

62. Augustin Scalbert, Ian T Johnson, Mike Saltmarsh. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 81, Issue 1, 2005, Pages 215S - 217S.

63. Joshua D Lambert, Jungil Hong, Guang-yu Yang, Jie Liao, Chung S Yang. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 81, Issue 1, 2005, Pages 284S - 291S.

64. Joseph A Vita. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 81, Issue 1, 2005, Pages 292S - 297S.

65. K.A. Youdim, J.P.E. Spencer, H. Schroeter, C. Rice-Evans. Dietary Flavonoids as Potential Neuroprotectants. *Biological Chemistry*. Volume 383, Issue 3-4, 2005, Pages 503 - 519.

66. Takanori Tsuda, Fumihiko Horio, Koji Uchida, Hiromitsu Aoki, Toshihiko Osawa. Dietary Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *The Journal of*

Nutrition. Volume 133, Issue 7, 2003, Pages 2125 - 2130.

67. Rice-Evans, C. Flavonoid Antioxidants. Current Medicinal Chemistry. Volume 8, Number 7, 2001, Pages 797-807.

68. Jan Ø Moskaug, Harald Carlsen, Mari CW Myhrstad, Rune Blomhoff. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. The American Journal of Clinical Nutrition. Volume 81, Issue 1, 2005, Pages 277S - 283S.

69. Balunkeswar Nayak, Farid Dahmoune, Kamal Moussi, Hocine Remini, Sofiane Dairi, Omar Aoun, Madani Khodir. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. Food Chemistry. Volume 187, 2015, Pages 507-516.

70. Kyong-Cheol Ko, Chan-Shick Kim, Nam Ho Lee, Sam-Pin Lee and Doo-Khil Moon, Determination of β -Cryptoxanthin in Peel and Flesh of Citrus Fruits Produced in Cheju Island. Food Science and Biotechnology. Volume 9, No. 5, 2000, Pages 288-291.

71. Magdalena Krajewska, Małgorzata Szymczak-Żyła, Grażyna Kowalewska. Carotenoid determination in recent marine sediments - practical problems during sample preparation and HPLC analysis. Current Chemistry Letters. Volume 6, Issue 3, 2017, Pages 91-104.

72. Marino B. Arnao. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology. Volume 11, Issue 11, 2000, Pages 419-421.

73. Yoichi Nogata, Koji Sakamoto, Hiroyuki Shiratsuchi, Toshinao Ishii, Masamichi Yano, Hideaki Ohto. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Volume 70, Issue

1, 2006, Pages 178-192.

74. Neng-guo Tao, Yue-jin Liu, Miao-ling Zhang. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Food Science and Technology*. Volume44, Issue7, 2009, Pages 1281-1285.

<국문초록>

감귤 콤부차 발효에 의한 카로티노이드의 변화 및 항산화능
비교

魏興茹

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 朴晟秀

콤부차는 약 14일간 효모와 초산균의 공생에 의해 발효된 당 첨가 홍차발효물이다. 콤부차의 성분은 유기산 (주로 아세트산, 글루콘산 및 글루쿠론산)과 차 폴리페놀을 함유하여 건강에 대해 유익한 영향을 미친다. 감귤은 비타민, 구연산, 카로티노이드, 섬유질, 플라보노이드 및 기타 페놀류 등이 풍부하다. 칼슘, 칼륨, 마그네슘과 같은 미네랄 성분도 많다. 감귤은 품종에 따라 과육과 과피의 비율 차이가 크지만, 그 동안 거의 폐기물로 버려지고 있는 과피는 essence oil, carotenoid 및 flavonoid, cellulose, pectin, limonoid 등 생리활성물질들이 높게 함유되어 있다. 본 연구에서는 콤부차 감귤액과 껍질이 들어있는 감귤액을 첨가하여 발효에 의해 β -Cryptoxanthin (β -CX) 함량 변화를 측정하고 비교하여 각각 효능 및 특성을 검토하며, 식품 개발 및 건강식품 가공에 이용하기 위해 연구를 수행하였다.

항산화능력 비교를 위해 DPPH, ABTS radical scavenging assay를 실시하였다. 그 결과 시료의 각 농도별 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL) 항산화능이 증가하는데 발효에 따라 감귤 콤부차 (CK= Citrus Kombucha)는 발효 전과 비교하여 항산화능이 유의적으로 증가하는 반면에 껍질 감귤 콤부차 (PCK= Peel Citrus Kombucha)의 경우 발효 전과 비교하여 감소하는 것으로 나타났다. 발효 전과 비교하여 발효 후 CK 페놀함량은 현저히 증가하였으며, PCK와 감귤 원액보다

높은 페놀함량을 나타내었다. 이에 PCK보다 CK가 항산화 능력이 높게 확인되었다.

β -Cryptoxanthin (β -CX) 함량은 HPLC를 이용하여 측정하였다. CK와 PCK 발효 전과 후 β -CX의 함량을 측정한 결과 CK의 경우 발효 후가 발효 전보다 약 3.6배로 증가한다. PCK에 경우는 발효 후가 발효 전보다 2.4배 가까이 증가한다. 본 실험에 있어서 발효로 인하여 β -CX의 함량이 전반적으로 증가되는 것으로 확인되었다.

Lutein 첨가된 콤부차 발효 전과 후, Lutein 함량이 8배 가까이 감소되고 β -Carotene 첨가된 콤부차 발효 전과 후 β -Carotene 함량은 1.2배로 감소된다. Lutein와 β -Carotene이 동시에 첨가된 콤부차의 발효 전 Lutein 함량은 8.89 μ g/mL이고 발효 후는 완전히 감소하였으며 β -Carotene 함량은 β -Carotene 첨가된 콤부차와 같은 비율인 1.2배로 감소되었다. 이는 콤부차 발효에 의하여 Lutein과 β -Carotene의 함량이 감소하고 β -CX의 함량이 증가하는 결과로부터 생물변환 (bioconversion)의 가능성이 있는 것으로 판단된다.

결론적으로 감귤 콤부차 발효에 의해 높은 항산화 능력을 가지고 β -CX 함량이 뚜렷하게 증가하므로 발효된 감귤 콤부차는 생물 활성이 증진되어 건강 효과를 발휘할 수 있는 식품으로 개발 및 건강식품 가공에 원료로 사용될 수 있음을 제시한다.