

복합 유산균 스타터 ABT-5를 이용한 발효 다크 초콜릿의 항산화 활성 및 향기 성분

고소예^{1,†} · 류지연^{2,†} · 김현아³ · 김소미^{1,2,*}

¹제주대학교 차세대융복합과학기술협동과정, ²제주대학교 바이오소재공학과, ³(주)제키스

Effects of fermentation by the commercial starter ABT-5 on the flavor and antioxidant activities of dark chocolate

So Yae Koh¹, Ji-Yeon Ryu², Hyeon A Kim³, and Somi Kim Cho^{1,2,*}

¹Interdisciplinary Graduate Program in Advanced Convergence Technology & Science, Jeju National University

²School of Biomaterials Science and Technology, Jeju National University

³Jekiss Co., Ltd., Research Institute

Abstract Chocolate, one of the most popular confectioneries in the world, is known for its aromatic flavor and high antioxidant activities. In this study, we investigated the effects of fermentation with commercially available lactic acid bacteria, ABT-5, on the flavor and antioxidant activities of dark chocolate. During 24 h fermentation, pH decreased from 5.52 to 3.97 and total acidity increased from 0.51 to 1.85%, whereas total polyphenol and flavonoid contents as well as DPPH and ABTS radical scavenging activities remained unchanged. Furthermore, compared with control HepG2 cells treated with unfermented dark chocolate, those treated with the fermented dark chocolate showed significantly lower levels of reactive oxygen species and higher viability under H₂O₂-induced oxidative stress. Finally, GC-MS and headspace GC-MS analysis detected 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 2-furanmethanol, known to enhance flavor, in the fermented dark chocolate. Collectively, these results suggest that ABT-5-fermented dark chocolate could be utilized for developing value-added dark chocolate products.

Keywords: dark chocolate, fermentation, antioxidant, GC-MS, Headspace GC-MS

서 론

전 세계적으로 기능성 식품에 대한 소비자들의 요구가 증가하고 있으며(1,2), 이러한 추세에 맞춰 최근에는 코코아나 초콜릿 시장과 같은 제과 산업에서도 기능성을 첨가한 초콜릿 연구가 진행되고 있다(3). 초콜릿은 테오브로마 카카오나무(*Theobroma cacao*)의 카카오 열매에서 얻은 코코아 매스, 코코아 버터, 코코아 분말 등의 원료에 설탕, 우유, 버터 등을 혼합하여 만든 기호 식품으로(4), 녹차, 홍차, 적포도주와 더불어 대표적인 항산화 능력을 가진 식품으로 알려져 있다(5). 초콜릿은 함유된 카카오 매스의 함량에 따라 다크 초콜릿(dark, 45% 이상), 밀크 초콜릿(milk, 24-45%), 그리고 가장 함량이 적은 화이트 초콜릿(white, 0%)으로 구분한다(6). 그 중 다크 초콜릿은 폴리페놀류를 다량 함유하여 항노화 작용을 하며 체내의 지방을 산화하는 HDL (high density

lipoprotein) 수치를 증가시키는 등의 효과가 보고되고 있어 초콜릿의 기능성을 부각시킬 수 있는 제품군으로 급성장하고 있다(6). 폴리페놀은 식물, 과일이나 와인 또는 차 등의 음료에 많이 포함되어 있는 성분으로서, 활성산소를 제거하여 DNA의 손상을 줄이고, 금속을 해독시키며, 혈압을 낮추며 항염, 항암작용 등 건강에 이로운 작용을 한다(7,8). 초콜릿의 항산화 능력은 이러한 폴리페놀 성분에 기인하는데, 초콜릿은 그 중에서도 epicatechin이나 catechin과 같은 플라보놀을 다량 함유하고 있다(9). 특히 다크 초콜릿의 섭취는 코티솔과 카테콜아민의 배출을 늦추고 페네틸아민, 세로토닌, 또는 아난다미드와 같은 신경전달물질을 방출시켜 스트레스를 조절하고, 초콜릿의 주요 성분인 theobromine과 caffeine과 같은 methylxanthin은 각성작용을 나타냄과 동시에 함유된 플라보놀과 시너지 작용을 하는 것으로 알려져 있어(9-14), 다크 초콜릿은 기능성 식품으로도 각광받고 있다(9).

발효는 미생물이 식품을 대사하고 여러 가지 대사산물을 생성하는 과정으로서 온화한 식품가공의 한 방법에 해당된다(15). 그 중 유산균은 체내·외 뿐만 아니라 식품의 표면에서도 자연적으로 발견되는 균으로, 이들은 발효 시에 젖산을 포함한 유기산, 하이드로콜로이드, 향미 화합물이나 향균 물질 등의 다양한 기능성 화합물을 생성한다(16). 화학 첨가물이나 과도한 가공 과정을 거치는 대신 최소한의 가공만으로도 건강하고 맛있는 식품을 소비자가 선호하면서(17), 유산균을 이용하여 향미를 증진시키기 위해 발효 기법을 활용한 제품들이 개발되고 있다. 전통적인 유산균을 사용하여 제조한 치즈나 요거트, 식초와 같은 발효 식품에

고소예[†] · 류지연[†]은 공동 1저자입니다.

*Corresponding author: Somi Kim Cho, Interdisciplinary Graduate Program in Advanced Convergence Technology & Science, School of Biomaterials Science and Technology, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Korea
Tel: +82-64-754-3348
Fax: +82-64-756-3351
E-mail: phd.kim.somi@gmail.com, somikim@jejunu.ac.kr
Received August 26, 2017; revised October 19, 2017;
accepted October 20, 2017

다른 유산균을 접목시켰을 때 새로운 향미가 관찰되었으며(18-20), 과채 주스 또는 시리얼 제작 시에도 유산균을 이용하여 발효하였을 때 풍미의 증진 및 영양성분의 증가가 보고되었다(21-24).

식품 발효에 사용되는 대표적인 유산균으로는 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, *Oenococcus*속, 그리고 *Weissella*속 등을 들 수 있으며, 이들은 요거트와 치즈(*Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속), 와인(*Lactobacillus*속, *Oenococcus*속), 김치(*Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Weissella*속), 또는 사위도우(*Lactobacillus*속, *Pediococcus*속) 등에서 발견된다. 한편, FD-DVS ABT-5 (ABT-5)는 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium species*, 그리고 *Streptococcus thermophilus*를 혼합하여 배양하는 ABT culture의 한 종류로 치즈 스타터로 상용화된 제품이다. FD는 유산균을 동결건조(freeze dry)한 상태를 의미하며 DVS는 direct vat set의 준말로, 발효 시 우유에 직접 접종하여 치즈를 제조할 수 있도록 한 방법이다. ABT-5는 배양 시에 달라질 수 있는 혼합된 균주의 비율을 일정하게 조정하여 균일한 발효 식품을 얻는 장점이 있으며(25), 단일 균에 비해 효율적으로 산을 생성하여 발효에 도달하는 시간을 단축하는 것으로 보고된 바 있다(26). 이와 같이 여러 음식 문화에서 다양한 종류의 유산균을 적용한 발효 식품을 찾아볼 수 있으며, 다양한 유산균 발효 식품들이 체내의 생리 활성에 긍정적인 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있으나(27) 아직까지 다크 초콜릿에 유산균 발효 기법을 적용한 사례는 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 상용 복합 유산균인 ABT-5를 다크 초콜릿의 발효에 적용하고, 유산균 발효 다크 초콜릿의 항산화 활성과 향미의 변화를 측정함으로써, 새로운 컨셉의 다크 초콜릿 제품 개발에 기여하고 유산균 발효 초콜릿 제품 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

발효 초콜릿 시료 제작 및 추출

동량의 증류수를 혼합하고 멸균(121°C, 15분)한 다크 초콜릿(Jekiss Dark 72%, Jekiss Co., Ltd., Jeju, Korea)에 ABT-5 (FD-DVS ABT-5, Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Denmark)를 1% (g/g) 접종하고 40°C에서 배양하며 시간대별 발효 다크 초콜릿 시료를 얻었다. 이전의 연구(28)를 참고하여, 다크 초콜릿 시료의 지방을 제거하기 위해 8g의 시료에 *n*-hexane (Daejung, Siheung, Korea) 40 mL을 가하고 5분간 초음파 추출 및 원심분리하여 지방을 제거하였다. 용매를 완전히 제거한 초콜릿 21g에 70 mL의 70% acetone (Daejung)을 가하여 10분간 초음파 추출한 후, 동량의 70% methanol (Daejung)을 두 번 가하여 추출 과정을 반복하였다. 여과한 초콜릿 추출물을 40°C에서 감압 농축 및 동결건조하고 4°C 보관하여 실험에 사용하였다.

pH 및 적정산도 측정

발효 다크 초콜릿의 시간대별 pH는 pH meter (Orion 3-star Benchtop pH meter, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 적정산도는 2.5g의 초콜릿 발효물을 pH 8.2로 적정하는데 필요한 0.1 N NaOH (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 양을 측정함으로써 계산하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = [V \times F \times 0.009 / 10] \times 100$$

V: 0.1 N NaOH의 소비량(mL)

F: 0.1 N NaOH의 역가

0.009: 유산계수(0.1 N NaOH 1 mL)

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Cheung 등(29)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 125 µL에 0.5 mL Folin-Ciocalteu's 시약(F9252, Sigma Chemical Co.)을 3분 동안 처리하고 Na₂CO₃ (sodium carbonate, Sigma Chemical Co.) 1 mL를 가한 후 실온 암조건에서 30분 동안 정치한 후, 700 nm에서의 흡광도를 분광광도계 (Sunrise-basic, Tecan, Salzburg, Austria)로 측정하였다. 단위는 gallic acid equivalents (mg GAE/g, Sigma Chemical Co.)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Brand-Williams 등(30)의 방법을 변형하여 시료 40 µL에 5% NaNO₂ (sodium nitrite, Sigma Chemical Co.) 6 µL를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl₃ (aluminum chloride, Sigma Chemical Co.) 12 µL를 혼합하여 6분간 반응시킨 다음 1 N NaOH 40 µL를 첨가한 후 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 함량은 rutin equivalents (mg RE/g, Sigma Chemical Co.)로 나타내었다.

DPPH 및 ABTS radical 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 이전에 보고된 방법(31)을 토대로 수행하였다. 시료를 200 µM DPPH (D9132, Sigma Chemical Co.) 용액 과 30분간 37°C의 암소에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하고 소거능을 계산하였다. Positive control로 catechin (catechin hydrate, Sigma Chemical Co.)을 사용하였다. ABTS radical 소거능 측정은 기존에 알려진 방법(32)을 변형하여 수행하였으며, 7 mM의 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, A1888, Sigma Chemical Co.)와 2.45 mM K₂S₂O₈ (potassium persulfate, Sigma Chemical Co.)를 혼합해 16시간 동안 냉암소에서 반응시켜 ABTS solution을 제조하였다. ABTS 용액 900 µL와 시료 100 µL를 넣어 2분간 실온에서 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하고 소거능을 계산하였다. 분광광도계(UV 1800, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하였으며, positive control로 α-tocopherol (Sigma Chemical Co.)을 사용하였다.

세포 기반 항산화 능력

세포 내 ROS 측정은 H₂DCF-DA (2,2-dichlorofluorescein diacetate, Sigma Chemical Co.)를 사용하여 flow cytometry (LSRFortessa, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)로 측정하였다. HepG2 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 6 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, 초콜릿을 처리한 후 배양하였다. 1시간 후 800 µM H₂O₂ (Hydrogen peroxide 30%, Biosesang, Seongnam, Korea)를 처리한 다음 30분 후 H₂DCF-DA를 처리하였다. 15분 후 PBS로 세척한 다음 trypsin-EDTA (0.5% Trypsin-EDTA, Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포를 회수하고 즉시 측정하였다. Positive control로 N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma Chemical Co.)을 사용하였다. 세포생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 HepG2 세포를 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 초콜릿을 농도별로 전처리한 후 800 µM H₂O₂를 처리한 다음 배양하였다. 일정시간 후 MTT solution (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Amresco Inc., Solon, OH, USA)을 넣고 4시간 동안 배양한 후 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 대조구에 대한 생존율로 나타내었다.

GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

휘발성 성분 분석은 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS, QP-2010, Shimadzu Co.)와 GC 컬럼(Rtx-5MS, 30 m length, 0.25 μm diameter, 0.25 μm thickness, Restek Corporation, PA, USA)을 사용하여 수행하였다. GC-MS 분석 시료는 1 μL를 취하여 주입하였으며, 주입 온도는 250°C로 설정하였다. 오븐 온도는 80°C로 3분간 유지한 후 분당 1.5°C씩 100°C까지 승온하였다. 100°C에서 160°C까지 분당 15°C씩 승온하였다. 160°C에서 1분간 유지한 후 분당 3°C씩 210°C까지 승온한 후 3분간 유지하였으며, 250°C까지 분당 10°C씩 승온한 후 3분간 유지하였고, 300°C까지 분당 5°C씩 승온한 후 1분간 유지하여 분석을 마무리하였다. 운반가스로는 헬륨을 사용하였다. Column flow를 1.0 mL/min으로 수행했으며, interface 온도는 280°C로 설정하였다. Scan mode로 45-500 m/z 범위에서 분석하였으며 GC-MS 분석을 통해 검출된 각 성분들의 동정은 Willey 9 library database를 이용하여 수행하였고, library와 유사도가 80% 이상인 화합물만을 동정하였다. 동정된 화합물의 성분 조성비는 해당하는 피크의 면적을 기준으로 전체 피크에서 각 피크가 차지하는 비율을 기반으로 산출하였다.

Headspace GC-MS를 이용한 향기 성분 분석

향기 성분 분석은 위에서 사용된 GC-MS 및 헤드스페이스 포집기(Headspace Autosampler, HT-3, Teledyne Tekmar, OH, USA)를 사용하여 수행하였다. 시료 1 g을 MeOH 2 mL에 희석하여 사용하였다. 오븐 온도는 처음 45°C로 7분간 유지한 후 분당 20°C씩 120°C까지 승온하였다. 120°C에서 240°C까지 승온하였으며, 15분간 유지하여 분석을 마무리하였다. MS검출기(QP-2010, Shimadzu Co.)로의 interface 온도는 240°C로 설정하였으며, 그 외의 조건과 검출된 화합물의 동정은 GC-MS 분석과 동일하게 이루어졌다.

Table 1. pH and total acidity of dark chocolate fermented by ABT-5 at fermentation time 0, 6, 12, and 24 hours

Fermentation time (h)	pH	Total acidity (%)
0	5.52	0.51
6	4.32	1.27
12	4.03	1.67
24	3.97	1.85

통계처리

실험은 3회 반복하여 평균과 표준오차로 나타내었고, 각 실험 결과는 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA one way를 시행하였다. 통계적인 유의성은 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

pH 및 적정산도

복합 균인 ABT-5를 이용하여 발효한 다크 초콜릿의 시간대별 pH와 산도를 Table 1에 나타내었다. ABT-5 복합균을 적용한 다크 초콜릿의 발효 시간대별 pH의 변화를 측정하였을 때, 발효 전의 pH는 5.52이었으며, 발효 6, 12, 24시간 후의 pH는 각각 4.32, 4.03, 3.97로 0시간 발효한 대조군 대비해서 발효 24시간 후에는 약 30% 감소하였다. ABT-5 복합균을 적용한 두유에서는 발효 4시간 후에 pH 7에서 pH 5.6로 떨어졌다고 Božanić 등(32)이 보고한 바 있으며, Park 등(26)은 우유에 ABT-5 복합 균을 접종한 지 4시간 만에 pH 6.4에서 pH 4.8로 감소했다고 보고하였다. 단 시간에 pH가 1.4-1.6 정도 감소한 두유와 우유에 비해 다크 초콜릿의 경우에는 상대적으로 pH 저하가 느리게 일어났는데, 이는 다크 초콜릿의 초기 pH가 두유나 우유보다 낮고, 해당 복합 균이 우유에 최적화되었기 때문인 것으로 사료된다. 한편, Kang 등(33)이 *L. plantarum*을 초콜릿 소스에 접종하여 발효시킨 경우, 접종 직후 pH 5.26에서 발효 4, 8, 24시간 후에 각각 pH 5.1, 4.7, 4.1로 감소하는 것을 보고한 바 있는데, 이 결과와 비교했을 때 *L. plantarum* 단일 균주보다는 ABT-5 복합균을 초콜릿 발효에 사용했을 때 pH 저하가 현저히 나타나는 것으로 확인되었다. ABT-5 복합균으로 24시간 발효 후 다크 초콜릿의 산도는 초기 0.51%에서 1.85%로 증가했으나, Kang 등(33)이 *L. plantarum*을 적용한 초콜릿 소스의 산도는 초기 0.45%에서 발효 24시간 후에는 0.99%로 측정되어, ABT-5 복합균 발효 시 산도의 절반에 그쳤다. 따라서, 다크 초콜릿 유산균 발효 시에는 ABT-5 복합균이 *L. plantarum* 단일 유산균보다 더 적절한 것으로 확인되었다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

발효 시간에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 Fig. 1에 나타내었다. 유산균 발효 직전의 다크 초콜릿의 폴리페놀 함량은 2.41 mg GAE/g이며 발효 24시간 후에는 2.39 mg GAE/g으로 나타나, 발효 전후 폴리페놀의 함량에는 큰 변화가 없음을 확

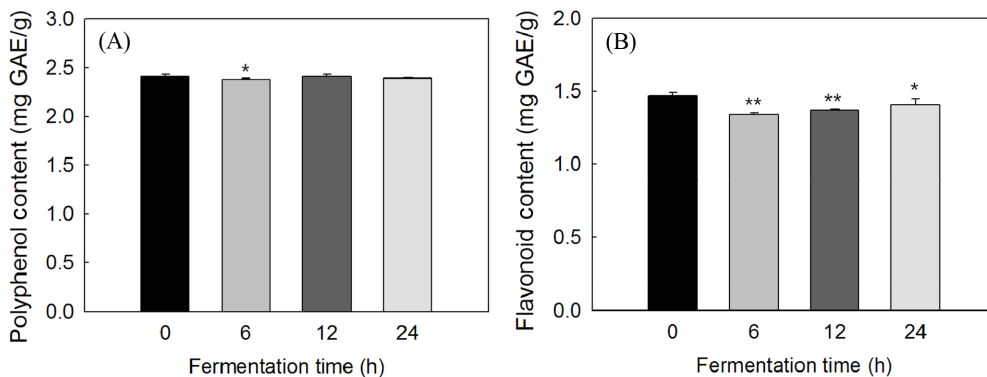


Fig. 1. Total polyphenol and flavonoid contents of dark chocolate fermented with ABT-5. Contents of polyphenol (A) and flavonoid (B) were measured on dark chocolate fermented with ABT-5. Values are mean±SE. Significant differences were compared with non-fermented chocolate versus 6, 12, and 24 h fermented chocolate at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

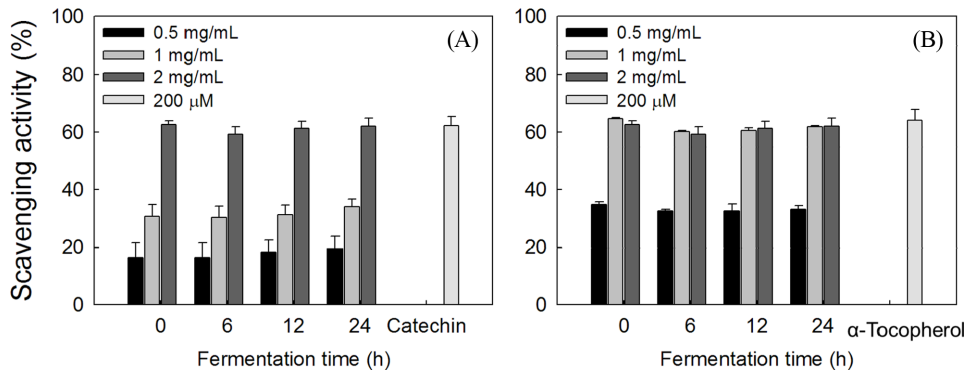


Fig. 2. DPPH and ABTS radical scavenging activities of dark chocolate fermented with ABT-5. Radical scavenging activities against DPPH (A) and ABTS (B) were measured on dark chocolate fermented with ABT-5. Values are mean±SE.

인 할 수 있었다. 이는 *L. acidophilus*와 *L. plantarum*로 사과 주스를 발효한 경우 폴리페놀이 약간 감소하였으며(34), 석류 주스를 세 종의 *L. plantarum*으로 발효한 경우에서도 폴리페놀 함량이 감소하였으며(35), 블루베리를 유산균으로 발효한 경우에서 폴리페놀 함량이 감소하였다(36)는 보고와 대조를 이루는 결과이다. ABT-5 복합균으로 다크 초콜릿을 발효 시에 플라보노이드 함량은 0시간 발효한 대조구의 1.47 mg RE/g에서 발효 6, 12, 24시간 후에는 각각 1.34, 1.37, 1.41 mg RE/g으로 확인되었다. 이는 Oh 등(36)이 보고한 블루베리 발효 시에 플라보노이드가 발효 전에 대비하여 5% 정도 감소한 것과 Sun 등(37)이 보고한 양배추 발효 전후에 플라보노이드가 23% 정도 감소한 것과 비교했을 때 감소의 폭이 상대적으로 적은 것이다. 한편, 초콜릿 소스를 단일 유산균으로 발효시킨 경우, 발효 전후의 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 5.47 mg GAE/g에서 5.38 mg GAE/g으로, 3.23 mg RE/g에서 3.39 mg RE/g으로 비슷하게 유지되었다고 보고된 바 있다(33). 앞서 언급한 사과, 석류, 블루베리 등의 보고에서와는 달리 초콜릿에서는 발효에 따른 폴리페놀과 플라보노이드 함량의 감소가 미미하였다. 이는 과일에 함유된 tannins 중에는 발효 시에 미생물에 의해 분해 가능한 hydrolysable tannins의 함량이 높은 반면, 초콜릿에서는 catechin이나 proanthocyanidin과 같은 condensed tannins의 함량이 상대적으로 높아 유산균의 tannase에 의한 폴리페놀의 감소가 적은 것으로 예상된다(34). 따라서, 사과, 석류, 블루베리 등을 유산균 발효 했을 때와 달리, 유산균 발효에 의한 다크 초콜릿의 폴리페놀과 플라보노이드의 함량의 감소는 눈에 띄게 관찰되지 않았다.

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능

DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 통한 발효한 다크 초콜릿의 항산화 능력 분석 결과는 Fig. 2와 같다. Kaprasob 등(34)과 Filannino 등(35)이 발효 전후 시료의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과, 과채 주스의 항산화 능력이 발효가 진행됨에 따라 감소한다고 보고한 바 있으나, 24시간 발효 다크 초콜릿의 DPPH 라디칼 소거능은 61.98%로, 0시간 발효한 대조구의 62.49%와 크게 다르지 않았다. 이는 폴리페놀과 플라보노이드 함량과 유사하게 DPPH 라디칼 소거능 또한 발효에 의해서 감소되지 않았으며, Kang 등(33)이 보고한 초콜릿 소스의 유산균 발효 시의 결과와도 유사하였다. 24시간 발효한 다크 초콜릿의 농도 1 mg/mL에서의 ABTS 라디칼 소거능은 61.85%로, 대조구의 64.59%와 비슷하였으며, 이는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성이 양의 상관관계를 갖는다는 Seo 등(38)의 연구와 유

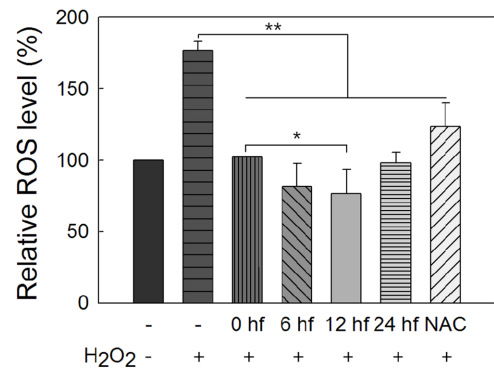


Fig. 3. Protective effect of fermented dark chocolate on H₂O₂-induced cellular oxidative stress was measured in HepG2. hf: hour of fermentation. N-acetyl-L-cysteine (NAC) 3 mM was used as a positive control. Values are mean±SE. Significant differences were compared with groups at * p <0.05 and ** p <0.01.

사한 결과를 보여주었다. 발효 전 다크 초콜릿 자체의 라디칼 소거능이 ABT-5를 이용한 유산균 발효에 의해서도 유지되는 것을 확인하였다.

세포 내 산화 스트레스 측정

ABT-5 복합균 발효 다크 초콜릿 처리에 의한 세포 내 활성산소(ROS, reactive oxygen species)의 수준을 H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 측정하고 flow cytometry 결과를 Fig. 3에 나타내었다. H₂O₂로 산화스트레스를 유발하였을 때 세포 내 ROS 수준은 무처리구 세포 대비 176.74%로 증가하였고, ROS scavenger로 잘 알려진 N-acetyl-L-cysteine (NAC)을 3 mM 전처리한 후 H₂O₂를 처리하면 H₂O₂ 단독처리 시에 비해 ROS 수준(123.51%)이 현저히 낮게 나타났다. 한편 0시간 발효한 대조구를 2 mg/mL 전처리했을 때, H₂O₂ 단독 처리 시의 176.74%에 비해 세포 내 ROS 수준이 102.19%로 관찰되어 다크 초콜릿의 ROS 소거능이 주어진 농도의 NAC에 비해 상대적으로 우수한 것을 확인할 수 있었다. 동일한 양의 6, 12시간 발효 다크 초콜릿을 처리했을 때 세포 내 ROS 수준은 0시간 발효한 대조구보다 더 낮은 값인 81.53%와 76.51%로 나타나, 다크 초콜릿의 세포 내 ROS 소거능이 발효에 의해 유의적으로 증가했음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 발효 초콜릿의 DPPH와 ABTS radical 소거능이 발효 0시간 대조구와 유사했던 결과

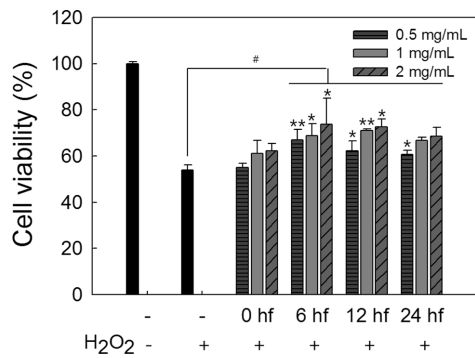


Fig. 4. Protective effect of fermented dark chocolate on H₂O₂-induced cytotoxicity was measured in HepG2. hf: hour of fermentation. Values are mean±SE. Significant differences were compared with each concentration of non-fermented chocolate treatment versus 6, 12, and 24 h fermented chocolate treatment at **p*<0.05 and ***p*<0.01.

(Fig 2A와 2B)와 상반되는 결과인데, 이는 세포 내 산화 스트레스 실험에서는 성분의 세포막 친화성 및 투과성 등의 물리적 특성이 반영되었기 때문이라고 사료된다(39). 또한, 24시간 발효 다크 초콜릿을 처리했을 때 세포 내 ROS 수준은 감소하지 않았는데, 이는 Mercier 등(40)이 보고한 유산발효시간에 따라 바이오매스가 증가하였다가 감소한 결과와 Nichols 등(41)이 보고한 시간에 따른 대사산물의 일시적 증가와 감소의 경우와 유사한 현상으로 판단된다. 다크 초콜릿을 ABT-5로 발효했을 경우, 산화스트레스로부터 세포 보호효과를 나타내었던 성분이 6, 12시간 발효 시에 증가되었다가 24시간 발효 시에는 감소하여 세포 내 ROS 소거능도 감소된 것으로 사료된다. 따라서, 이상의 결과에서 다크 초콜릿은 발효에 의해 세포 내 활성산소를 소거하는 능력이 증가한 것으로 확인되었다.

산화스트레스로부터의 세포 보호 효과

과산화수소로 유발된 산화스트레스로부터의 세포 독성에 대한 세포 보호 효과는 Fig. 4에 나타내었다. H₂O₂ 처리로 세포 독성을 유도했을 때의 세포 생존율은 H₂O₂ 무처리구 세포의 생존율 대비 53.83%로 감소하였고, 0시간 발효한 대조구 초콜릿 2 mg/mL 전처리 시의 생존율은 62.32%로 H₂O₂ 단독 처리구 세포의 생존율을 대비해서 다소 증가하였다. 한편, 6, 12, 24시간 발효한 다크 초콜릿을 2 mg/mL 전처리 했을 때의 세포생존율은 각각 73.71, 72.74, 68.54%로, H₂O₂ 단독 처리구에 대비하여 생존율이 유의적으로 증가하였다. 이는 발효 다크 초콜릿 첨가에 의해 세포 내 활성산소가 소거되어 산화스트레스에 의한 세포 독성으로부터 세포를 보호한 것으로 판단된다(42).

GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

다크 초콜릿을 ABT-5 복합균으로 발효 시 성분 변화를 GC-MS를 이용하여 분석하고 이를 Table 2에 나타냈다. 0시간 발효한 대조구 다크 초콜릿의 주요 성분은 xanthosine, theobromine, 그리고 caffeine이 검출되었으며 이들은 각각 47.21%, 16.15%, 그리고 2.40%를 차지하였다. 이들은 초콜릿의 원료인 *Theobroma cacao*의 대표적인 알칼로이드로 초콜릿의 독특한 쓴맛과 향을 내는 성분으로 기호성에 관여한다(9). 이외에도 구운 비스킷과 캐러멜 향을 내는 3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one과 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde가 검출되었으며, 바닐라 향을 내는 ethylvanillin도 검출되었다. 대조구 초콜릿에서는 미검출된 lactic acid의 성분비가 발효 24시간 다크 초콜릿에서 14.84%로 나타났으며, 이를 통해 ABT-5 복합균에 의해 초콜릿의 발효가 진행되었음을 확인할 수 있었다. 과일이나 캐러멜, 아몬드 등의 향미를 나타내는 성분인 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone과 버터, 코코넛 오일 등에 포함되어 있으며 크림, 지방의 풍미를 증진시킨다고 알려진 palmitic acid도 발효 다크 초콜릿에서 검출되었으며 이는 초콜릿의 향을 풍부하게 하는 데 기여할 것으로 예

Table 2. Compositional analysis of dark chocolate after fermentation detected by GC-MS

Compound ¹⁾	RT ²⁾ (min)	Area % ³⁾		Odor Description
		0 h	24 h	
3-Methoxypropanal	2.463	3.74	6.05	
Lactic acid	3.309	- ⁴⁾	14.84	Fruity, acidic
Allyl formate	5.616	2.87	2.31	Fruity, fermented
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	7.910	-	1.15	Fruity, caramelic, almond
Thymine	8.798	3.95	3.35	
3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one	11.573	1.14	0.55	Biscuit
Catechol	15.197	0.44	0.33	
5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde	16.720	1.51	0.77	Caramelic
Methyl 5-oxoprolinate	21.480	0.43	0.74	
Ethylvanillin	23.115	0.07	-	Vanilla
Xanthosine	25.380	47.21	38.70	
cis-4-Cyclopentene-1,3-Diol	28.787	20.09	16.00	
Caffeine	32.831	2.40	1.82	
Theobromine	33.967	16.15	12.99	
Palmitic acid	35.873	-	0.40	Creamy, oily

¹⁾Compounds were tentatively identified based on parent molecular ions, retention times, retention indices, and elution order, as well as the fragmentation spectra compared with the literature.

²⁾Retention time (min)

³⁾Peak area relative to total peak area%

⁴⁾-, not detected

Table 3. Compositional analysis of dark chocolate after fermentation detected by Headspace GC-MS

Compound ¹⁾	RT ²⁾ (min)	Area % ³⁾		Odor Description
		0 h	24 h	
Acetaldehyde	1.714	0.99	- ⁴⁾	
Methyl formate	2.063	0.31	0.25	
Methyl acetate	2.528	31.93	5.36	
Ethanol	4.588	8.19	11.91	Alcoholic, fermented
2-Pentanol	9.596	-	0.61	Greeny, fruity
3-Methylbutan-1-ol	10.812	-	0.56	Winey, malty
Acetoin	12.028	1.93	0.67	Buttery, creamy
Methyl lactate	12.376	2.23	5.70	
Benzaldehyde	16.091	0.67	0.21	Fruity, almond
2,3-Butanediol	16.717	0.89	0.50	
Acetic acid	18.375	13.32	40.93	Acidic
2-Furanmethanol	18.576	17.24	20.77	Caramellic, oily, smoked
Maltol	26.323	0.89	0.40	Coffee, sugar
Methyl palmitate	31.861	2.16	0.76	Fruity, ester
Methyl stearate	36.556	1.49	2.65	
Caffeine	38.144	15.31	8.32	
Ethylvanillin	39.543	2.45	0.44	Vanilla

¹⁾Compounds were tentatively identified based on parent molecular ions, retention times, retention indices, and elution order, as well as the fragmentation spectra compared with the literature.

²⁾Retention time (min)

³⁾Peak area relative to total peak area%

⁴⁾-, not detected

상되었다. 따라서 ABT-5 복합균을 이용한 다크 초콜릿의 발효는 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 주요 생리 활성 성분의 감소는 유발하지 않으면서 휘발성 성분 증가를 통한 풍미 향상을 유도할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

Headspace GC-MS를 이용한 향기 성분 분석

ABT-5 복합균 발효에 따른 다크 초콜릿의 향기 성분 변화를 확인하기 위해 발효하지 않은 대조구 다크 초콜릿과 24시간 발효한 다크 초콜릿을 분석하고 Table 3에 나타내었다. 발효하지 않은 다크 초콜릿의 주요 향기 성분은 methyl acetate가 31.93%로 가장 많이 함유되어 있는 것을 확인하였다. 이외에 아라비카 커피, 차, 코코아 등에서 나타나는 향기 성분인 2-furanmethanol, 코코아의 대표적인 알칼로이드인 caffeine, 유기산인 acetic acid, 과일이나 아몬드 향을 나타낸다고 알려진 benzaldehyde 등이 검출되었다. 발효한 다크 초콜릿의 휘발성 성분은 대조구에 비해 acetic acid가 40.93%까지 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 ethanol도 8.19%에서 11.91%로 증가하였는데, 유기산이 에탄올과 결합할 경우 에스터 향미성분을 생성하는데 관여한다고 알려져 있어 ABT-5 복합균에 의한 발효 다크 초콜릿에서도 이러한 유기산과 에탄올이 결합한 향미성분이 생성된 것으로 예상된다. 이외에도 발효된 와인이나 술에서 나타나는 성분으로 싱그러운 향, 과일향, 와인향, 옛기름향이 나타난다고 보고된 바 있는 2-pentanol과 3-methylbutan-1-ol이 검출되었다. 또한 furan 계통의 물질로서 식품의 향을 증진시키는 것으로 보고된 2-furanmethanol의 성분비가 17.24%에서 20.77%로 증가하였다. 이상의 결과에서 복합 유산균 ABT-5 발효에 의한 다크 초콜릿의 향기 성분 변화를 확인할 수 있었으며, 이러한 향기 성분들은 발효 초콜릿의 산미와 풍미 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 다크 초콜릿을 복합 유산균 스타터인 ABT-5를 이용하여 발효시켰을 때, 항산화 성분과 활성 그리고 향기 성분의 변화를 발효 전 다크 초콜릿과 비교하였다. 발효 시간에 따른 pH의 감소와 적정 산도의 증가 및 가스 크로마토그래피 분석에 의한 lactic acid 성분비의 증가를 측정함으로써 다크 초콜릿의 발효가 진행되었음을 확인하였다. 6, 12, 그리고 24시간 발효한 다크 초콜릿의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 활성이 발효 전 대조구 대비 유사한 수준으로 유지되었다. 한편, 6, 12시간 발효한 다크 초콜릿은 대조구에 대비하여 산화스트레스에 의한 ROS 발생 및 세포 독성으로부터 세포를 유의적으로 보호하였다. 가스 크로마토그래피에서 검출된 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone와 헤드스페이스 가스 크로마토그래피를 통해 검출된 2-furanmethanol은 중요한 향미 성분으로 확인되었으며, 해당 성분들은 발효 다크 초콜릿의 풍미를 증진시킬 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 복합유산균을 이용해 다크 초콜릿을 발효했으며, 발효 시간에 따른 항산화 활성의 변화를 분석하였으며, 발효에 의한 다크 초콜릿의 향미 성분의 증가를 측정함으로써 고부가가치 다크 초콜릿 개발 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 제주대학교 친환경농업연구소 실험 기관시설이 수행에 활용되었으며, 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지역신산업선도인력양성사업 성과임(No. 2016HID5A1910723).

References

- Hasler CM. Functional foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. *Food Technol.-Chicago* 52: 63-147 (1998)
- Ares G, Besio M, Gimenez A, Deliza R. Relationship between involvement and functional milk desserts intention to purchase. Influence on attitude towards packaging characteristics. *Appetite* 55: 298-304 (2010)
- Belscak-Cvitanovic A, Komes D, Dujmovic M, Karlovic S, Biskic M, Brncic M, Ježek D. Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chem.* 167: 61-70 (2015)
- Kang S, Lee JS, Jeong A, Kim E, Park S. The effects of using artificial sweeteners and coffee grounds in chocolate filling on quality characteristics and glycemic index. *J. Appl. Biol. Chem.* 57: 307-312 (2014)
- Lee E, Kum J, Hwang Y, Tu O, Jo H, Kim J, Chae Y. Comparative study on antioxidant capacities and polyphenolic contents of commercially available cocoa-containing products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1356-1362 (2012)
- Kim B, Kim, D, Lee S, Shin H. Preparation of coated citric acid for sensory improvement of chocolate products. *KSBB J.* 10: 443-448 (2010)
- Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: asystematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 95: 740-751 (2012)
- Suazo Y, Davidov-Pardo G, Arozarena I. Effect of fermentation and roasting on the phenolic concentration and antioxidant activity of cocoa from Nicaragua. *J. Food Qual.* 37: 50-56 (2014)
- Alañón M, Castle S, Siswanto P, Cifuentes-Gómez T, Spencer JP. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food Chem.* 208: 177-184 (2016)
- Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid. Redox Sign.* 15: 2779-2811 (2011)
- Lamuela-Raventos RM, Romero-Perez AI, Andres-Lacueva C, Tornero A. Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Sci. Technol. Int.* 11: 159-176 (2005)
- Sokolov AN, Pavlova MA, Klosterhalfen S, Enck P. Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. *Neurosci. Biobehav. R.* 37: 2445-2453 (2013)
- Konar N, Toker OS, Oba S, Sagdic O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends Food Sci. Tech.* 49: 35-44 (2016)
- Wilson PK. Centuries of seeking chocolates medicinal benefits. *Lancet* 376: 158-159 (2010)
- Park K, Kim BK. Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. 4th ed. pp. 187-211. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Lahtinen S, Ouweland AC, Salminen S, von Wright A (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (2011)
- Juvonen R, Honkapää K, Maina NH, Shi Q, Viljanen K, Maaheimo H, Virkki L, Tenkanen M, Lantto R. The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota L.*). *Int. J. Food Microbiol.* 207: 109-118 (2015)
- Dickson-Spillmann M, Siegrist M, Keller C. Attitudes toward chemicals are associated with preference for natural food. *Food Qual. Prefer.* 22: 149-156 (2011)
- Chen Y, Huang Y, Bai Y, Fu C, Zhou M, Gao B, Wang C, Li D, Hu Y, Xu N. Effects of mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in alcoholic fermentation on the physicochemical and sensory properties of citrus vinegar. *LWT-Food Sci. Technol.* 84: 753-763 (2017)
- Pogačič T, Maillard M, Leclerc A, Hervé C, Chuat V, Yee AL, Florence V, Thierry A. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* 46: 145-153 (2015)
- Jia R, Chen H, Chen H, Ding W. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *J. Dairy Sci.* 99: 221-227 (2016)
- Cagno RD, Filannino P, Gobbetti M. Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. *Int. J. Food Microbiol.* 248: 56-62 (2017)
- Dongmo SN, Sacher B, Kollmannsberger H, Becker T. Key volatile aroma compounds of lactic acid fermented malt based beverages-impact of lactic acid bacteria strains. *Food Chem.* 229: 565-573 (2017)
- Cagno RD, Minervini G, Rizzello CG, Angelis MD, Gobbetti M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* 28: 1062-1071 (2011)
- Salmeron I, Fuciños P, Charalampopoulos D, Pandiella SS. Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. *Food Chem.* 117: 265-271 (2009)
- Wah TT, Walaisri S, Assavanig A, Niamsiri N, Lertsiri S. Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 160: 282-289 (2013)
- Park J, Moon H, Oh J, Lee J, Choi K, Cha J, Lee T, Lee M, Jung H. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods and development of a starter for fermented milk. *Korean J. Food Preserv.* 20: 712-719 (2013)
- Zoumpopoulou G, Pot B, Tsakalidou E, Papadimitriou K. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *Int. Dairy J.* 67: 46-60 (2017)
- Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gossé F, Raul F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett.* 175: 147-155 (2002)
- Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 81: 249-255 (2003)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical. Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Božanić R, Lovković S, Jelić I. Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech J. Food Sci.* 29: 51-56 (2011)
- Kang HR, Koh SY, Ryu J, Osman A, Lee CK, Lim JH, Kim HA, Im GH, Cho SK. Antioxidant activities and physicochemical properties of chocolate fermented by *Lactobacillus plantarum* CK10. *Korean J. Food Preserv.* 23:576-584 (2016)
- Kaprasob R, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N, Sarkar D, Shetty K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochem.* 59: 141-149 (2017)
- Filannino P, Azzi L, Cavoski I, Vincentini O, Rizzello CG, Gobbetti M, Cagno RD. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum L.*) juice through lactic acid fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 163: 184-192 (2013)
- Oh BT, Jeong SY, Velmurugan P, Park JH, Jeong DY. Probiotic-mediated blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) fruit fermentation to yield functionalized products for augmented antibacterial and antioxidant activity. *J. Biosci. Bioeng.* 124: 542-550 (2017)
- Sun YP, Chou CC, Yu RC. Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chem.* 115: 912-917 (2009)
- Seo YH, Kim IJ, Yie AS, Min HK. Electron donating ability and contents of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids in waxy corn (*Zea mays L.*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:581-585 (1999)
- Chen C, Wang L, Wang R, Luo X, Li Y, Li J, Li Y, Chen Z. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food Chem.* 239: 260-

- 267 (2018)
40. Mercier P, Yerushalmi L, Rouleau D, Dochain D. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. J. Chem. Technol. Biot. 55: 111-121 (1992)
41. Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, van Walsum GP, Dien BS, Iten LB. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. Enzyme Microb. Tech. 42: 624-630 (2008)
42. Ha JS, Park SK, Park CH, Seung TW, Guo TJ, Kang JY, Lee DS, Kim JM, Lee U, Heo HJ. Neuronal cell protective effect of new green extract against H₂O₂-induced oxidative stress and analysis of bioactive compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 47: 673-679 (2015)