

ANIMAL

Anti-oxidant, ant-microbial and anti-inflammatory activity of yogurt with added cacao nibs (*Theobroma cacao* L.)

Nu-Ri Jeong, Woo Jin Ki, Min Ju Kim, Myoung Soo Nam*

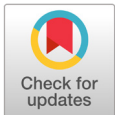
Division of Animal Resources Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding author: namsoo@cnu.ac.kr

Abstract

Cacao is recognized not only as a raw material for making chocolate but also as an excellent functional food with a high antioxidant effect. The consumption of raw cacao and its processed form of cacao has a beneficial effect on health. The aim of this study was to reveal the possible biological functions of yoghurt that was prepared with added cacao nibs (*Theobroma cacao* L.). The 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging ability of yogurt containing Cacao nibs from 1 to 5% was higher than that of the control group, and the ABTS radical scavenging ability was similar in all the test groups after 12 hours of fermentation. The antibacterial activity of the control and yogurt with the cacao nibs was shown to be very strong against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 1631, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella Typhimurium* M-15 in fermented milk for 16, 24, and 48 hours, but the fermentation times at 0, 4, and 8 hours showed no activity. The Cacao nibs powder inhibited I κ B α -phosphorylation in a concentration-dependent manner. The yogurt containing the cacao nibs significantly inhibited the expression of the anti-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in a concentration-dependent manner. Our development of yogurt that combines milk as a complete food and cacao nibs, which has several physiological functions, is expected to greatly contribute to research on new functional fermented milk.

Key words: antibacterial, antiinflammatory, antioxidant, cacao nibs, fermented milk



 OPEN ACCESS

Citation: Jeong NR, Ki WJ, Kim MJ, Nam MS. Anti-oxidant, ant-microbial and anti-inflammatory activity of yogurt with added cacao nibs (*Theobroma cacao* L.). Korean Journal of Agricultural Science 49:583-593. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220053>

Received: June 03, 2022

Revised: July 18, 2022

Accepted: August 08, 2022

Copyright: © 2022 Korean Journal of Agricultural Science



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.

Introduction

건강에 대한 관심의 증가와 천연 원재료들의 각종 생리활성 물질에 대한 학문적, 산업적인 연구가 다양해짐에 따라 초콜릿의 원재료인 cacao (*Theobroma cacao* L.)의 유효성분에 대한 관심이 높아지고 있다(Afoakwa, 2016). 초콜릿을 만드는 기본 재료이자 각 초콜릿의 특징을 결정하는 것은 그 원료인 cacao (*Theobroma cacao* L.)이다. 초콜릿을 만드는 원료인 cacao bean (*Theobroma cacao* L.)은 심혈관질환관련 사망 위험을 감소시키고, 항산화 및 항균 효과 (Lotito and Frei, 2006; Ferrazzano et al., 2009; Djousse et al., 2011; Lee et al., 2012)가 있음을 보고하였다. 또한 Bauer 등(2016)은 인간 폐암세포를 이용하여 항산화 활성과 세포독성 효과가

있음을 보고하였고, Jourdaina 등(2006)은 cacao에 함유된 polyphenols과 β -sitosterol의 prostate cancer의 성장에 미치는 효과에 대해 보고하였다. Cacao nibs는 코코아 가루, 코코아 버터 및 초콜릿 제품을 제조하는 데 사용되는 껍질을 벗긴 cacao 콩(Campos-Vega et al., 2018)이다. Cacao 추출물은 catechins, epicatechins, contain procyanidine, quercetin glycosides 같은 flavan-3-ols가 풍부한 공급원(Sanchez-Rabaneda et al., 2003; Hooper et al., 2012)이며, 또한 cacao는 methylxanthine alkaloid, theobromine 및 소량의 quercetin유도체가 함유되어 있다(Cadiz-Gurrea et al., 2014). *In vivo*와 *In vitro* 연구에서 cacao phenolic 화합물의 생물학적 활성이 확인되었다(Lotito and Frei, 2006; Ferrazzano et al., 2009; Djousse et al., 2011). 최근에 cacao에 포함되어 있는 flavonoid 성분들의 건강기능성에 대한 연구가 활발히 보고되고, 자연에 가까운 원재료 식품에 대한 관심이 증가하면서 가공된 코코아나 초콜릿 대신에 cacao nibs와 husk를 이용한 cacao 차를 기호 음료로 응용하거나 cacao nibs를 활용한 다양한 기호식품 또한 선보이고 있다(Afoakwa, 2016). Cacao는 초콜릿을 만드는 원재료일 뿐만 아니라 높은 항산화 효과까지 기대할 수 있는 뛰어난 기능성 식품으로 재인식되고 있으며, cacao 원료 및 가공식품의 섭취가 건강에 유익하다는 인식이 높아지고 있다(Ronald-Ross et al., 2012).

따라서 본 연구는 영양학적 가치가 높은 식품인 cacao nibs를 첨가한 발효유의 생리활성 특성을 밝혀 신기능 발효유 제조에 기초 자료를 제공하기위해 수행하였다.

Materials and Methods

Cacao nibs 첨가 발효유

본 실험에 사용된 cacao nibs 첨가 발효유의 제조방법과 특성은 Jung 등(2022)이 보고한 논문과 동일하다.

항산화 효과 (ABTS radical 소거능)

2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Aldrich, MO, USA) radical scavenging activity는 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 7 mM ABTS를 140 mM $K_2O_8S_2$ (Sigma Aldrich, MO, USA)와 혼합한 ABTS stock solution을 암실에서 12시간 동안 보관한 후 potassium persulfate buffer에 혼합하여 OD value가 0.7인 ABTS working solution을 제조하였다. 이를 희석한 발효유와 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응 후 precision microplate reader Emax (Molecular Devices, CF, USA)를 이용하여 OD값을 측정한 후 OD 값을 식에 대입하여 소거능을 도출했다.

$$RSA(\%) = \left(1 - \frac{Abs(sample) - Abs(sample\ blank)}{Abs(control)} \right) \times 100 \quad (1)$$

항균 활성 측정

Escherichia coli KCTC 1039, *Staphylococcus aureus* 1631, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* M-15 병원성 미생물을 KCTC (Korea Collection for Type Cultures)로부터 분양 받아 96-well plate법을 이용하여 항균 활성을 조사하였다.

96-well plate법은 Luria-Bertani (LB) broth (Difco, NJ, USA)에 각각의 균을 배양한 후 세균수를 1×10^5 CFU·mL⁻¹

가 되도록 조절한 후 96 well plate에 병원성미생물 배양액을 100 μ L씩 분주하고, 시료를 100 μ L씩 처리하여 총 200 μ L가 되도록 하였다. 접종된 병원성미생물은 37°C에서 48시간 동안 호기 배양하면서 3시간마다 precision microplate reader Emax (Molecular Devices, CF, USA)를 이용하여 650 nm의 흡광도로 성장을 측정하였다.

세포 배양

세포 배양 실험에 사용한 세포는 인간 기관지 상피세포인 BEAS-2B와 마우스 대식세포인 RAW 264.7로, ATCC (American Type Culture Collection)에서 구매해 실험에 사용하였다. 표준세포배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Rockville, MD, USA)에 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, Rockville, MD, USA) 과 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 세포를 배양하였다.

세포 독성 평가

Y (yogurt), CP (cacao nibs powder), Y + CP (yogurt with 5% cacao nibs powder), CPY (cacao nibs powder added yogurt) 가 세포활성도에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay를 수행하였다. BEAS-2B 세포를 3×10^3 cells·well⁻¹로 96 well plate에 분주하였으며, 표준세포배양법 (37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양한 후 각각의 well에 Y, CP, Y + CP, CPY를 농도 별로 처리하고 24시간 동안 동일하게 배양하였다. 이후에 MTS 시약 20 μ L를 첨가하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 식에 적용하여 각 처리에 따른 상대적 세포 활성도를 측정 및 평가하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \quad (2)$$

Immunoblot 분석

Immunoblot 분석은 RAW 264.7 세포를 1.5×10^5 cells·well⁻¹로 6-well culture dish에 분주해 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에 cacao nibs powder를 0.25, 1.25 mg·mL⁻¹ 농도로 처리한 media로 교체하여 24시간 반응시킨 뒤 염증반응을 유도하였다. 염증 반응은 각 well에 1 μ g·mL⁻¹의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Aldrich, MO, USA)를 처리하여 30분 동안 반응시켜 유도하였다. 이후 media를 제거하고 RAW 264.7 세포를 PBS (Phosphate-Buffered Saline, Gibco, MA, USA)로 세척한 뒤, tris-triton lysis buffer로 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이후 5% skim milk를 PBS-T에 녹여 blocking buffer를 사용해 1시간 동안 처리하여 항체의 비특이적인 결합을 억제시켰다. 그 후 blocking buffer에 희석된 anti-p-I κ B α (1 : 1,000), anti-I κ B α (1 : 1,000), anti-GAPDH (1 : 2,000)을 4°C에서 12시간 동안 처리하였다. 결합하지 않은 antibody를 PBS-T로 세척하고 super signal system을 이용하여 Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, MC, USA)와 반응시켰다.

Quantitative RT-PCR

Cacao nibs첨가 발효유의 염증 억제 효과를 확인하기 위해 Quantitative RT-PCR를 수행하였다. RAW 264.7 세포를 7.5×10^4 cells·well⁻¹로 12-well culture dish에 분주해 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 well을 Y, CP, Y + CP, CPY를 0.25, 1.25 mg·mL⁻¹ 농도로 처리한 media로 교체하여 24시간 반응시킨 뒤에 염증반응을 유도하였다. 염증 반응은 각 well에 1 µg·mL⁻¹의 LPS를 처리하여 6시간 동안 반응시켜 유도하였다. Y, CP, Y + CP, CPY가 처리된 media를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 세척하고 Hybrid-R RNA purification kit (Philekorea, Seoul, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, MA, USA)로 정량하여 RNA 1 µg을 부피가 9 mL이 되도록 DEPC-treated water와 희석한 후 random hexamer (100 pmol·µL⁻¹) 1 µL를 넣어 65°C에서 5 분간 반응시켰다. 반응 후 얼음에 냉각시킨 다음, 5 × M-MLV RT reaction buffer 4 µL, M-MLV reverse transcriptase 1 µL, RNase inhibitor 1 µL, dNTP mix (10 mM) 1 µL, DEPC-treated water 3 µL를 첨가하여 상온에서 10분간 둔 뒤, 50°C에서 1 h 동안 반응시켜 cDNA는 합성하였다. 반응이 끝난 cDNA를 증류수를 이용해 1/10로 희석하여 실험에 사용하였다. 2 × Prime Q-master mix 10 µL, 10 pmol·µL⁻¹의 forward primer와 reverse primer를 각각 1.5 µL, distilled water 4 µL, cDNA 3 µL를 넣은 뒤 95°C에서 denaturation 20s, 58°C에서 annealing 20s, 72°C에서 elongation 20s를 40 cycle 실시하는 조건에서 AriaMx를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 실험에 사용한 cytokine의 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Primers sequence for RT-PCR.

Gene	Primer sequence (5' to 3')
IL-6	
Forward	GTC CTT CAG AGA GAT ACA GAAACT
Reverse	AGC TTA TCT GTT AGG AGA GCA TTG
IL-1β	
Forward	AGG TCAAAG GTT TGG AAG CA
Reverse	TGAAGC AGC TAT GGC AAC TG
TNF-α	
Forward	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT
Reverse	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC
iNOS	
Forward	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
Reverse	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
GAPDH	
Forward	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
Reverse	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG

RT-PCR, real time-polymerase chain reaction; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; iNOS, induced nitric oxide synthase; GAPDH, glutaldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Results and Discussion

항산화 효과

ABTS radical 소거능

대조구와 Cacao Nibs 첨가구의 ABTS radical 소거능 결과는 Fig. 1 과 같다. 1, 3, 5% cacao nibs 첨가구는 대조구보다 높은 ABTS radical 소거능을 나타냈으며, 모든 실험구는 발효 12시간 이후 ABTS radical 소거능이 유사하게 나타났다. 이는 cacao bean의 catechin 유래 성분 들의 효능에 대한 보고(Payne et al., 2010)와 polyphenol 함량에 관한 연구(Gu et al., 2006)에서도 알 수 있듯이 cacao nibs에 일정량의 polyphenol이 함유되어 있어 cacao nibs 첨가 요구르트의

ABTS radical 소거능에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Polyphenol은 천연에 존재하는 주요한 방향족화합물로서 다양한 생리활성에 관여한다고 알려져 있으며(Liu et al., 2008), 환원제, 수소 공여체 및 singlet oxygen 소거제 등의 역할을 한다. 주요한 polyphenol 화합물에는 flavone 및 isoflavone, flavanone, anthocyanin, catechin 등이 존재하며 이러한 화합물들은 radical 소거활성과 강력한 항산화능을 포함한 폭 넓은 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Kaur and Kapoor, 2001; Guo and Wang, 2007). 대조구의 ABTS radical 소거능은 cacao nibs를 첨가한 요구르트 보다는 낮았지만 유산균에 의한 ABTS radical 소거능은 높게 나타났다. 한편 오디 요구르트의 항산화활성은 오디의 첨가량이 증가할수록 항산화활성이 높았다는 보고와 동일하다(Sung and Choi, 2014).

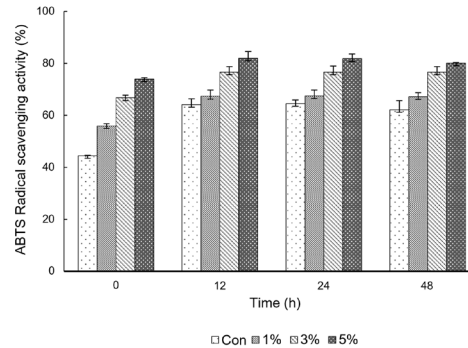


Fig. 1. 2,2-Anziobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity in yogurt added cacao nibs powder by fermentation for 48 h at 37°C. Con, yogurt; 1%, yogurt with 1% cacao nibs; 3%, yogurt with 3% cacao nibs; 5%, yogurt with 5% cacao nibs.

병원성 미생물에 대한 항균 활성

Cacao nibs bean의 catechin 유래 성분들의 효능에 대한 보고(Payne et al., 2010), polyphenol 함량에 관한 연구(Gu et al., 2006) 등에서도 찾아볼 수 있듯이 cacao nibs에 일정량의 polyphenol이 함유되어 있음을 확인할 수 있고, 높은 phenol 함량을 가진 화합물은 강력한 항산화 작용과 항균 작용에 직접적인 영향을 준다고 보고하였다(Sun and Ho, 2005; Maisuthisakul et al., 2007; Ronald-Ross et al., 2012). 병원성 미생물 4종 대한 cacao nibs 발효유의 항균 활성을 96 well plate 법으로 측정한 결과는 Fig. 2 - 5와 같다.

*Escherichia coli*의 항균활성

Fig. 2는 *Escherichia coli*에 대한 cacao nibs 발효유의 항균 활성을 측정한 결과이다. Fig. 2는 96-Well plate법을 이용한 항균 활성 조사 결과로 대조구는 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 보여주며, 첨가구 1, 3, 5%는 8, 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 나타냈다. 이는 돼지감자 분말 첨가 요구르트의 항균 활성 결과와 유사하게 *Escherichia coli*에 대한 항균 활성을 보여주었다(Park et al., 2019).

Staphylococcus aureus 1631의 항균활성

Fig. 3은 *Staphylococcus aureus* 1631에 대한 cacao nibs 발효유의 항균활성을 측정한 결과이다. Fig. 3은 항균 활성 조사 결과로 대조구는 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 보여주며, 첨가구 1, 3, 5%는 8, 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 나타냈다. 마늘즙을 첨가한 요구르트(Lee et al., 2009) 항균활성 결과와 유사하게 첨가구의 농도가 높을수록 항균활성이 증가하는 유사한 결과를 보였다. 따라서 cacao nibs 첨가 요구르트가 *Staphylococcus aureus* 1631 항균활성에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

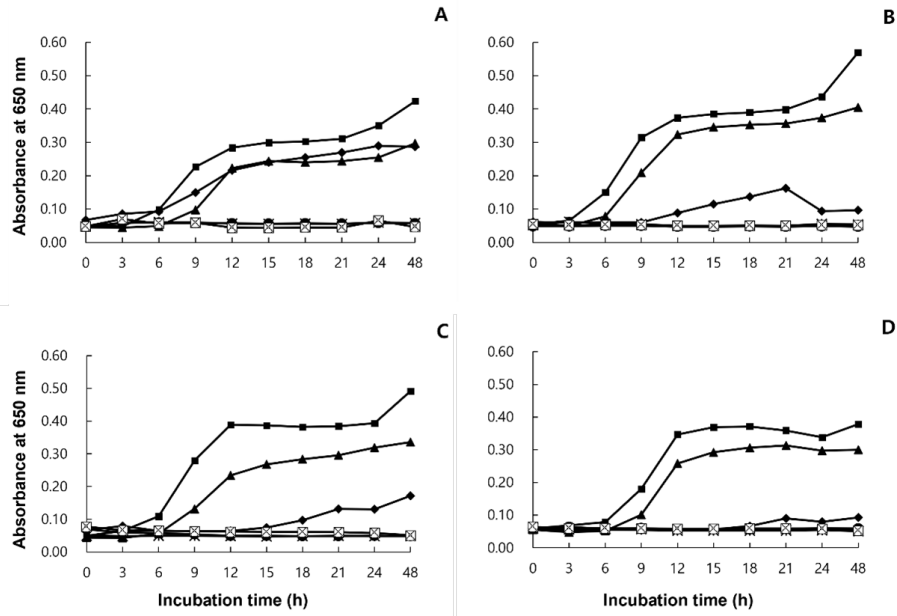


Fig. 2. Antimicrobial activity of yogurt with cacao nibs powder against *Escherichia coli* by 96 well plate method. (A) Yogurt. (B) Yogurt with 1% cacao nibs. (C) Yogurt with 3% cacao nibs. (D) Yogurt with 5% cacao nibs. ■, 0 h; ▲, 4 h; ◆, 8 h; ×, 16 h; ●, 24 h; ▩, 48 h.

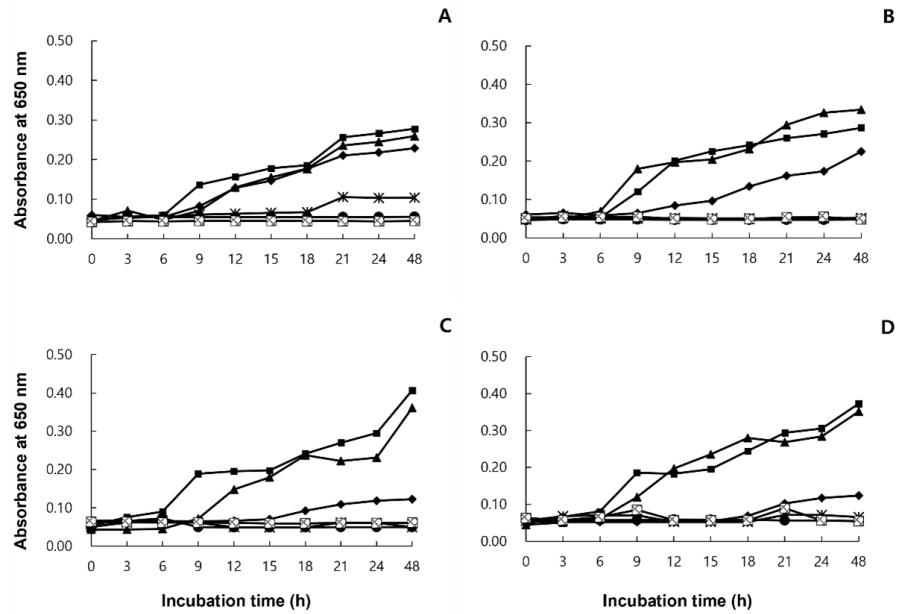


Fig. 3. Antimicrobial activity of fermented milk with cacao nibs powder against *Staphylococcus aureus* 1631 by 96 well plate method. (A) Yogurt. (B) Yogurt with 1% cacao nibs. (C) Yogurt with 3% cacao nibs. (D) Yogurt with 5% cacao nibs. ■, 0 h; ▲, 4 h; ◆, 8 h; ×, 16 h; ●, 24 h; ▩, 48 h.

***Pseudomonas aeruginosa*의 항균활성**

Fig. 4는 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 cacao nibs 발효유의 항균 활성을 측정한 결과이다. Fig. 4는 96-Well plate 법을 이용한 항균 활성 조사 결과로 대조구는 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 보여주며, 처리구 1, 3, 5%는 8, 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 나타냈다. 따라서 cacao nibs 첨가 요구르트가 *Pseudomonas aeruginosa* 항균 활성에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

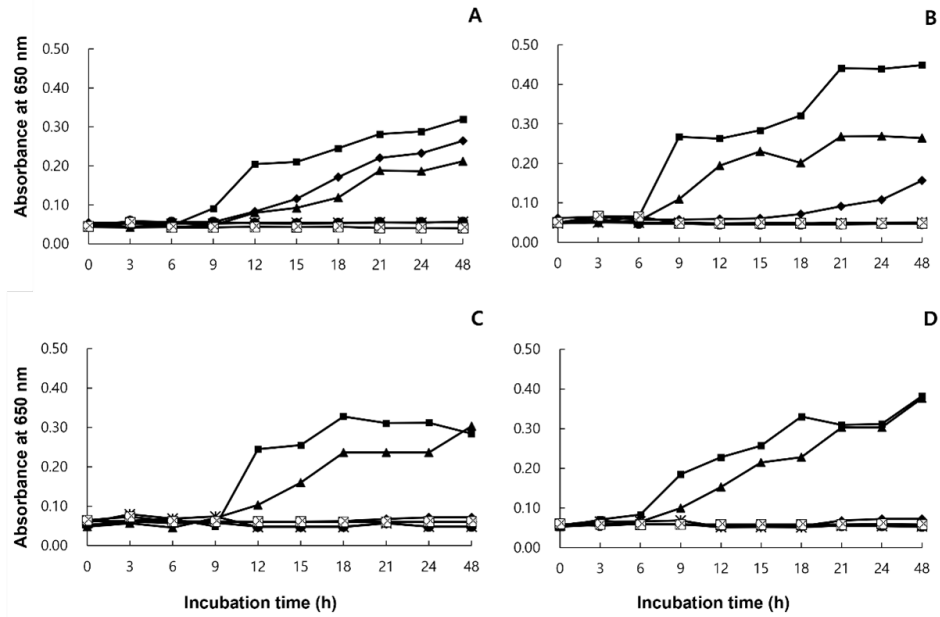


Fig. 4. Antimicrobial activity of yogurt with cacao nibs powder against *Pseudomonas aeruginosa* by 96 well plate method. (A) Yogurt. (B) Yogurt with 1% cacao nibs. (C) Yogurt with 3% cacao nibs. (D) Yogurt with 5% cacao nibs. ■, 0 h; ▲, 4 h; ◆, 8 h; ×, 16 h; ●, 24 h; ▣, 48 h

Salmonella typhimurium M-15의 항균활성

Salmonella typhimurium M-15에 대한 cacao nibs 첨가 요구르트의 항균 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5는 96-Well plate법을 이용한 항균 활성 조사 결과로 대조구는 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 보여주며, 처리구 1, 3, 5%는 8, 16, 24, 48시간에서 항균 활성을 나타냈다. 따라서 cacao nibs 첨가 요구르트가 *Salmonella Typhimurium* M-15 항균활성에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

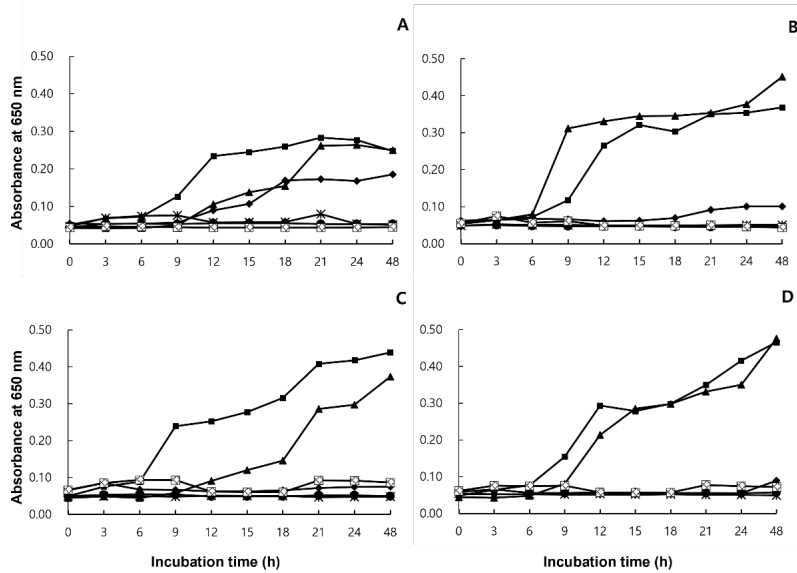


Fig. 5. Antimicrobial activity of yogurt with cacao nibs powder against *Salmonella typhimurium* M-15 by 96 well plate method. (A) Yogurt. (B) Yogurt with 1% cacao nibs. (C) Yogurt with 3% cacao nibs. (D) Yogurt with 5% cacao nibs. ■, 0 h; ▲, 4 h; ◆, 8 h; ×, 16 h; ●, 24 h; ▣, 48 h.

항염 효과

Cacao nibs의 독성 평가를 MTS assay를 RAW 264.7 세포에 $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 까지 처리하여 실시한 결과 세포 독성이 없는 것을 확인 후 실험에 이용하였다. 염증반응은 I κ B α 의 인산화 작용을 통해 NF- κ B 신호 작용을 촉진한다. 이러한 세포 신호전달 체계를 통하여 염증성 cytokine인 유전자의 mRNA 발현을 촉진한다. Cacao nibs 첨가 발효유의 염증성 cytokine의 발현 억제 효능이 I κ B α 의 인산화 작용에 의한 것인지 확인하기 위하여 immunoblot 분석을 수행하였다. Fig. 6은 염증성 cytokine 유전자 mRNA 발현을 촉진할 수 있는 확인된 농도로 동일하게 24시간 동안 처리하여 LPS에 의한 염증 반응을 유도해 I κ B α 의 인산화를 확인한 immunoblot 결과를 나타낸 것이다. 대조군과 비교하였을 때 CP 농도 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 처리구는 51%, $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 처리구는 69%로 I κ B α 의 인산화가 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 cacao nibs가 농도의존적으로 I κ B α 의 인산화를 억제하는 것으로 확인되었다.

염증 cytokine의 발현량

Cacao nibs 첨가 발효유의 염증 억제 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7세포에 Y, CP, Y + CP, CPY를 24시간 동안 처리한 후 LPS를 추가적으로 처리하여 염증 반응을 유도하였다. 염증 반응이 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine 유전자들의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인하여 염증 반응의 정도를 평가하였다. Fig. 7은 qRT-PCR 결과이다. TNF- α 는 대조군과 비해 CP에서 54.7% 감소하여 항염 효과를 확인하였고, Y + CP는 16.8%, CPY는 21.4%로 요구르트에 의한 염증성 cytokine의 발현량은 차이가 없음을 알 수 있었다. IL-6는 CP는 94% 감소하여 항염효과를 확인할 수 있고, Y + CP는 82.4%, CPY는 85.6%로 요구르트에 의한 염증성 cytokine의 발현량은 차이가 없음을 확인하였다. 특히 IL-1 β 는 대조구보다 Y가 193% 발현량이 증가하였고, CP는 96.2% 감소로 항염 효과가 매우 높음을 확인하였다. Y + CP는 감소하지 않은 반면에 CPY는 77% 감소하여 CP를 첨가한 요구르트의 영향으로 발현량의 차이를 확인할 수 있다. iNOS는 CP에서 발현량이 가장 높았고 Y + CP, CPY, Y 순서로 발현이 감소하는 경향을 보였다.

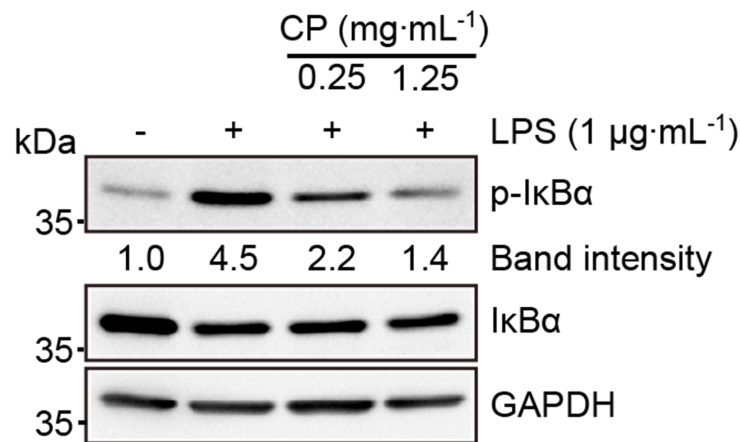


Fig. 6. Effect of cacao nibs powder on I κ B- α phosphorylation. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of cacao nibs with LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or without for 24 h. Immunoblot analysis was performed with anti-I κ B- α , anti-phosphorylation I κ B- α anti-bodies; GAPDH as internal control. Graphical intensity of phosphorylation I κ B- α was measured by Image software. CP, cacao nibs powder; LPS, lipopolysaccharide; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

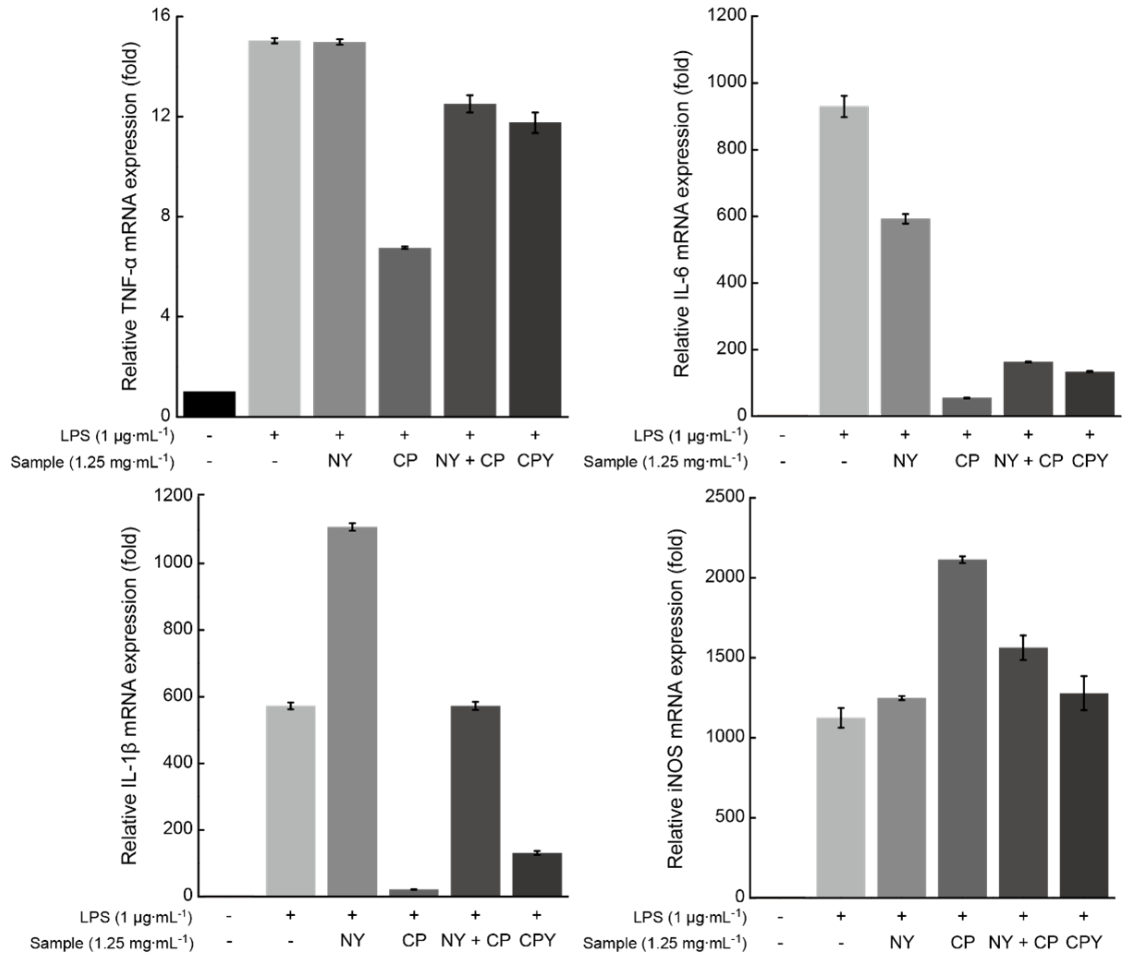


Fig. 7. Effects of Y, CP, Y + CP and CPY on mRNA expression level of IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentration of Y, CP, Y + CP, CPY for 24 h and inflammation were induced with LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 6 h. Total RNA was isolated and analyzed for mRNA expression with qRT-PCR. Average \pm S.E. -, not treated; +, treated; Y, yoghurt; CP, cacao nibs powder; Y + CP, yogurt with 5% cacao nibs powder; CPY, cacao nibs powder added yogurt; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; iNOS, induced nitric oxides synthase; LPS, lipopolysaccharide.

Conclusion

본 실험은 발효유와 cacao nibs를 접목하여 기능성 발효유를 제조하고 생화학적 특성을 연구하기 위해 수행하였다. Cacao nibs를 첨가한 요구르트의 항산화, 항균활성 및 항염효과가 뛰어나 완전식품에 가까운 우유와 생리활성 가치가 높은 cacao nibs를 첨가한 요구르트 개발은 신기능성 발효유 연구에 크게 기여할 것으로 기대한다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Authors Information

Nu-Ri Jeong, Chungnam National University, Researcher
Woo Jin Ki, Chungnam National University, Master Course
Min Ju Kim, Chungnam National University, Master Course
Myoung Soo Nam, 0000-0003-0866-1041

References

- Afoakwa EO. 2016. Chocolate science and technology. History, origin and taxonomy of cocoa. 2nd ed. pp. 1-15. Wiley Blackwell, York, UK.
- Bauer D, de Abreu JP, Oliveira HSS, Goes-Neto A, Koblitz MGB, Teodoro AJ. 2016. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of cocoa beans subjected to different processing conditions in human lung carcinoma cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:7428515. DOI:10.1155/2016/7428515.
- Cadiz-Gurrea ML, Lozano-Sanchez J, Contreras-Gamez M, Legeai-Mallet L, Fernandez-Arroyo S, Segura-Carretero A. 2014. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods* 10:485-498.
- Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. 2018. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* 81:172-184.
- Djousse L, Hopkins PN, North KE, Pankow JS, Arnett DK, Ellison RC. 2011. Chocolate consumption is inversely associated with prevalent coronary heart disease: The national heart, lung, and blood institute family heart study. *Clinical Nutrition* 30:182-187.
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. 2009. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 80:255-262.
- Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior RL. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54:4057-4061.
- Guo J, Wang MH. 2007. Antioxidant and antidiabetic activities of *Ulmus davidiana* extracts. *Food Science and Biotechnology* 16:55-61.
- Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. 2012. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 95:740-751. DOI:10.3945/ajcn.111.023457.
- Jourd'aine C, Tenca G, Deguercy A, Troplin P, Dirk Poelman D. 2006. *In-vitro* effects of polyphenols from cocoa and b-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *European Journal of Cancer Prevention* 15:353-361.
- Jung NR, Ki WJ, Kim MJ, Nam MS. 2022. Fermentation properties of fermented milk with added cacao nibs (*Theobroma cacao* L.). *Korean Journal of Agricultural Science* 49:571-582. [in Korean]
- Kaur C, Kapoor HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 36:703-725. DOI:10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x.
- Lee H, Colin K, Asmaa A, Paul AK, Jeffrey SC, Eric BR, Aedi'n C. 2012. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 95:740-751.
- Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han GS, Jeong SG, Jang A, Chae HS, Kim DH, Ham JS. 2009. Quality characteristics and inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* KCCM 40510 of yogurts manufactured with garlic juice. *Food Science of Animal Resources* 29:500-505. [in Korean]
- Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R. 2008. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International* 41:363-370.

- Lotito SB, Frei B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine* 41:1727-1746.
- Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100:1409-1418.
- Park BB, Renchinkhand G, Nam MS. 2019. Physicochemical properties of fermented milk supplemented with *Helianthus tuberosus* powder. *Journal of Milk Science and Biotechnology* 37:196-205. [in Korean]
- Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart DA. 2010. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:10518-10527.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Ronald-Ross W, Victor RP, Lamuela-Raventos S, Rosa MSLR, María IP, Ramón E. 2012. Chocolate in health and nutrition. In *Nutrition and Health*. Chapter 9. Industrial and home processing of Cocoa polyphenols. Volume 7. edited by Lamuela-Raventos RM, Izquierdo-Pulido M, Estruch R. pp. 119-124. Springer, AG, Switzerland.
- Sanchez-Rabaneda F, Jauregui O, Casals I, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventos RM. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* 38:35-42.
- Sun T, Ho CT. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90:743-749.
- Sung JM, Choi HY. 2014. Effect of mulberry powder on antioxidant activities and quality characteristics of yogurt. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 43:690-697. [in Korean]