

Bifidobacterium으로 발효한 이소플라본 함유물 첨가 초코렛의 품질 특성

문성원^{1,2} · 박명수³ · 안준배⁴ · 지근억^{*1,3}

¹서울대학교 식품영양학과, ²영동대학교 호텔외식조리학과,
³(주)비피도, ⁴영동대학교 생명공학부 식품공학전공

Quality Characteristics of Chocolate Blended with Bifidobacterium-fermented Isoflavone Powder

Sung Won Moon^{1,2}, Myung Soo Park³, Jun Bae Ahn⁴ and Geun Eog Ji^{*1,3}

¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University
²Department of Food Service and Preparation, Youngdong University
³Research Center, Bifido Co.
⁴Department of Food Science and Technology, Youngdong University

Development of chocolate products to improve the quality and functional properties with Bifidobacterium-fermented isoflavone powder (BFIP) was attempted. Effects of BFIP on sensory value, isoflavone contents, and microbiological characteristics of chocolate products during storage at room temperature (24 ± 0.5°C) for 90 day were studied. Five different BFIP concentrations of 0, 1, 2, 3, and 4% (w/w) were added and blended into the chocolate products. Results of sensory evaluation showed that the scores for softness and bitter taste decreased as the BFIP contents increased. In sweet and sour taste, the highest score was shown at 1% BFIP treatment. In overall acceptability, 1% treatment was the most favored, followed by 2% treatment. Contents of isoflavone in chocolate products were stably maintained during 90 storage days. The viable cell numbers of Bifidobacterium remained relatively stable until 70 day, followed by a slow decrease thereafter in all treatments.

Key words: Bifidobacterium, isoflavone, chocolate

서 론

콩은 단백질과 지방이 풍부한 식물성 식품으로 오랜 세월 동안 한국인의 식생활에서 큰 비중을 차지해 왔으며, 이러한 영양적 우수성 이외에 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 올리고당 등 여러 기능성 성분이 함유되어 있음이 밝혀지면서 기능성 식품소재로서 관심과 연구의 대상이 되고 있다. 콩에 들어있는 여러 기능성 성분 중 이소플라본은 포유동물에서 약한 에스트로겐 활성을 보이므로 phytoestrogen으로 분류하며, 폐경기 증후군, 골다공증, 심혈관계질환, 유방암, 전립선암, 대장암 등과 같이 호르몬과 관련된 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다⁽¹⁻⁶⁾.

대두에 함유되어 있는 이소플라본은 genistein과 daidzein, 이들의 배당체인 genistin, daidzin과 그 밖에 여러 유도체 등으로 구성되어 있다. Genistein은 역학조사^(7,8), 동물실험⁽⁹⁻¹¹⁾,

in vitro^(9,11) 실험에서 뛰어난 항암효과를 보이며, 특히 유방암과 전립선암의 예방효과가 높다고 알려지고 있다⁽⁷⁾. 또한 genistein은 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 작용을 하기 때문에 phytoestrogen으로 불리기도 하고, 따라서 폐경기 여성의 에스트로겐 결핍으로 인해 유발되는 골다공증의 예방과 진행 억제에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다⁽¹²⁾.

대두 이소플라본은 포도당 잔기가 β-1,4 glycoside 결합을 한 배당체 형태로 대부분 존재하지만, 발효식품에는 당이 분해된 aglycone 형태가 많이 존재한다. 배당체 형태의 이소플라본은 섭취된 후 위산과 장내 미생물에 의해 생성된 β-글루코시다제에 의하여 비배당체로 전환되어 장에서 흡수된다⁽¹³⁾. Aglycone인 genistein을 섭취한 경우와 배당체인 genistin을 섭취한 경우에 이들의 체내 대사는 약간 차이가 있는데, 실험 동물을 이용한 실험결과 인체 실험에서 genistein이 더 빨리 흡수되는 현상을 보였다. 인체실험결과 genistein의 소변 중 회수량이 genistin 보다 더 높게 나타나 배당체가 비배당체로 전환되었을 때 이소플라본의 생체 이용성이 더 높아졌다⁽¹⁴⁾.

일반적으로 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환시키는 방법에는 산을 이용하여 이소플라본을 가수분해하는 산 가수분해방법, β-글루코시다제를 이용한 효소가수분해 방법 및

*Corresponding author: Geun Eog Ji, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-8749
Fax: 82-2-884-0305
E-mail: geji@bifido.com

Table 1. Isoflavone contents (mg/g) in raw BFIP powder

Isoflavones	Genistein	Genistin	Daidzein	Daidzin	Glycitein	Glycitin	Total
Content (mg/g)	2.5	1.7	2.4	11.4	1.5	2.3	21.8

미생물을 이용해서 생물 전환하는 방법 등이 있다. 현재까지 알려진 이소플라본 배당체를 가수분해하는 미생물은 *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus bulgaricus*, *Aspergillus niger*, *Saccharopolyspora erythraea* 등이 있으며, 이들은 모두 공통적으로 β -글루코시다제를 생산하는 균들이다. 유산균의 일종인 *Bifidobacterium* spp.는 장내 미생물들이 적당한 균형을 이루도록 하는데 중요한 역할을 하는 균으로서, 인체에 해롭지 않아 식품첨가물로 이용되는 식품용 미생물이다. 이러한 *Bifidobacterium* spp.는 숙주의 면역기능을 강화시키고, 암에 대한 저항능력을 향상시킨다고 알려져 있다⁽¹⁵⁾. 지금까지 이소플라본에 관한 연구는 식품⁽¹⁶⁻¹⁹⁾이나 발효가공식품⁽²⁰⁾에 존재하는 이소플라본의 함량을 분석하거나 이소플라본의 기능성에 대하여 연구한 논문들이 주를 이루었다. 본 연구에서는 기능성 소재로 알려진 *Bifidobacterium*과 이소플라본을 실제 식품에 적용하여 실질적인 식품 가공 상태에서의 활용성을 높이고자 초코렛을 이용한 식품적용 실험을 실시하고자 하였다.

본 실험에서는 이소플라본의 생체 이용성을 증가시키기 위하여 프로바이오틱스로 사용되는 *Bifidobacterium*을 이용하여 이소플라본을 발효시킨 원료를 동결건조하였고 이를 함유한 기능성 초코렛 제품을 개발하고, 이들의 품질특성을 관능적, 화학적 및 미생물학적 특성을 통하여 알아보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 *Bifidobacterium*-fermented isoflavone powder(BFIP)는 (주)비피도에서 원료를 제공 받았다. BFIP는 대두배아를 *Bifidobacterium* 균주로 발효시킨 것⁽²¹⁾으로서 BFIP의 이소플라본 조성은 Table 1에 나타냈으며, 초기 *Bifidobacterium*의 균수는 5×10^8 cfu/g이었다. 초코렛의 제조는 경기도 용인 소재의 (주)로얄제과에서 밀크초코렛과 화이트초코렛을 사용하여 만들었다. 밀크초코렛은 정백당 43%, 코코아조제품 22%, 식물성경화유 13%, 코코아매스 11%, 코코아버터 10%, 레시틴 0.2%와 바닐린 0.04%의 배합비였고, 화이트초코렛은 정백당 34%, 전지분유 29%, 코코아버터 20%, 식물성경화유 17%, 레시틴 0.2%와 바닐린 0.04%의 배합비였다.

초코렛의 제조

초코렛의 제조는 (주)로얄제과의 one shot line에서 제조하였고, 예비실험을 통하여 초코렛의 외피와 중심의 비율은 가장 적합한 6:4로 고정하였다. 외피는 밀크초코렛을 사용하였고, 중심의 초코렛은 화이트초코렛으로 여기에 BFIP를 실험처리구별로 각각 paste를 만들어 기계적으로 중심에 자동 주입하여 제조하였다. 완성 초코렛의 모양은 18파이의 원형으로 무게는 4 g/ea이었다. 제조시 성형틀의 온도는 20~25°C

였고, 초코렛의 품온은 29.5°C, 실내온도는 26~28°C, depositor 온도는 28~29.5°C였다. 성형틀 이동 속도는 10~15개/min였고, 성형 후에 숙성은 15, 12, 15°C의 3단계로 하였다. 숙성터널의 통과시간은 15~20분 소요되었고, 제조 후에 각각 밀봉하여 실험재료로 사용하였다.

실험처리구

*Bifidobacterium*으로 전환시킨 BFIP가 함유된 기능성 초코렛 제품의 품질특성을 알아보기 위하여 실험처리구는 BFIP의 함량을 초코렛의 무게에 대해 0(대조구), 1, 2, 3, 4%(w/w)로 각각 달리하여 5가지로 제조하였다. 각각의 초코렛은 실온(24±0.5°C)에서 폴리에틸렌 봉투에 밀봉 보관하면서 90일 동안 품질특성을 보았다.

관능적 평가

BFIP 함량을 달리하여 만든 초코렛의 관능적 특성을 평가하기 위하여 90일 동안 13회에 걸쳐 10명의 훈련된 관능검사원(식품영양학과 대학원생)을 통하여 초코렛의 외관, 부드러운 정도, 단맛, 신맛, 쓴맛, 전반적인 기호도의 6가지 특성에 대하여 기호특성 조사를 7점 평점법⁽²²⁾으로 2회 반복 실시하였다. 기호도는 “대단히 좋음(like extremely)”-7점, “대단히 싫음(dislike extremely)”-1점으로 평가하였다. 시료는 세자리 숫자로 표기하였으며, 흰색의 그릇에 초코렛을 3개씩 담아 매 실시마다 제시하였다.

이소플라본 분석

이소플라본 성분의 정량은 Wang 등의 방법⁽²³⁾을 일부 수정한 HPLC법을 사용하였다. 주요 이소플라본 중 대부분을 차지하는 genistein, genistin, daidzein, daidzin, glycitein, glycitin의 6가지를 정량하였다. 표준물질 genistein, genistin, daidzein과 glycitein은 Sigma(USA)사에서 daidzin과 glycitin은 Hujicco(Japan)사에서 각각 구입하여 사용하였다. 초코렛의 이소플라본 분석은 시료 25 mg을 70% 에탄올 1.5 mL에 녹여서 Table 2와 같은 분석조건으로 분석하였다.

Table 2. HPLC conditions for isoflavone analysis

Items	Conditions
HPLC	Young-Lin Co.
Column	YMC-Pack ODS-AM-303
Solvent	MeOH : H ₂ O : AcOH = 15 : 84.9 : 0.1 ~35 : 64.9 : 0.1 gradient (50 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	38°C
Detector	UV (254 nm)
Injection volume	20 μ L

Table 3. Sensory characteristics of chocolate blended with BIFP during storage at room temperature

Sensory characteristics	Days	BFIP (%)					F-value
		0	1.0	2.0	3.0	4.0	
Appearance	0	4.6 ± 0.7 ^{a1)}	4.6 ± 0.7 ^a	4.7 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.7 ^a	0.04 ^{NS}
	3	4.6 ± 1.2 ^a	4.7 ± 1.3 ^a	4.6 ± 1.2 ^a	4.5 ± 1.2 ^a	4.4 ± 1.3 ^a	0.07 ^{NS}
	7	5.0 ± 0.9 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	4.8 ± 1.2 ^a	4.7 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	0.18 ^{NS}
	10	4.7 ± 0.9 ^a	4.7 ± 0.8 ^a	4.9 ± 1.2 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	0.14 ^{NS}
	16	4.8 ± 0.7 ^a	4.6 ± 0.7 ^a	4.8 ± 0.7 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.9 ^a	0.07 ^{NS}
	21	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	0.10 ^{NS}
	30	4.2 ± 1.1 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	4.2 ± 0.5 ^a	0.00 ^{NS}
	40	4.6 ± 1.1 ^a	4.6 ± 1.1 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	4.6 ± 1.1 ^a	4.6 ± 0.9 ^a	0.00 ^{NS}
	50	5.4 ± 1.1 ^a	5.4 ± 1.1 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	5.4 ± 0.6 ^a	0.07 ^{NS}
	60	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	0.00 ^{NS}
	70	5.4 ± 0.9 ^a	5.4 ± 0.6 ^a	5.4 ± 0.9 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	5.4 ± 0.9 ^a	0.30 ^{NS}
	80	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 0.5 ^a	0.29 ^{NS}
90	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	0.17 ^{NS}	
Softness	0	5.2 ± 0.9 ^a	5.2 ± 0.9 ^a	4.7 ± 0.7 ^a	4.6 ± 1.1 ^a	4.5 ± 1.2 ^a	1.20 ^{NS}
	3	4.7 ± 0.9 ^a	4.5 ± 1.1 ^a	4.3 ± 1.3 ^a	4.1 ± 1.2 ^a	3.9 ± 1.1 ^a	0.90 ^{NS}
	7	5.0 ± 0.9 ^a	4.8 ± 1.0 ^a	4.7 ± 1.0 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	4.0 ± 0.9 ^a	1.33 ^{NS}
	10	5.3 ± 1.0 ^a	5.1 ± 1.2 ^a	4.7 ± 1.1 ^a	4.3 ± 1.3 ^a	4.1 ± 0.9 ^a	1.49 ^{NS}
	16	4.8 ± 0.7 ^a	4.5 ± 0.9 ^a	4.4 ± 0.9 ^a	4.1 ± 0.8 ^b	4.0 ± 0.5 ^a	1.12 ^{NS}
	21	5.0 ± 0.7 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 1.8 ^a	4.4 ± 1.5 ^a	4.0 ± 1.6 ^a	0.40 ^{NS}
	30	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.9 ^a	4.4 ± 0.9 ^a	4.2 ± 1.1 ^a	3.6 ± 2.1 ^a	0.68 ^{NS}
	40	5.2 ± 1.3 ^a	5.2 ± 1.8 ^a	4.8 ± 2.1 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^{ab}	3.2 ± 0.5 ^b	1.87 [*]
	50	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 1.4 ^a	5.0 ± 1.2 ^a	4.4 ± 1.3 ^a	0.56 ^{NS}
	60	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 1.1 ^a	4.4 ± 1.3 ^a	4.0 ± 1.2 ^a	3.6 ± 1.3 ^a	0.82 ^{NS}
	70	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 1.6 ^a	4.4 ± 0.6 ^a	1.06 ^{NS}
	80	5.4 ± 0.9 ^a	5.2 ± 1.3 ^{ab}	4.6 ± 1.3 ^{ab}	4.4 ± 0.9 ^{ab}	3.8 ± 0.8 ^b	1.78 [*]
90	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.6 ± 1.5 ^{ab}	4.2 ± 0.8 ^{ab}	3.6 ± 0.6 ^b	2.29 [*]	
Sweet taste	0	4.9 ± 1.2 ^{a1)}	5.0 ± 1.3 ^a	4.9 ± 1.0 ^a	4.7 ± 1.1 ^a	4.8 ± 1.0 ^a	0.10 ^{NS}
	3	4.9 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.9 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.9 ^a	4.7 ± 1.2 ^a	0.34 ^{NS}
	7	5.0 ± 1.3 ^a	5.2 ± 1.0 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.7 ± 1.0 ^a	4.5 ± 1.2 ^a	0.37 ^{NS}
	10	5.0 ± 1.4 ^a	5.0 ± 1.2 ^a	4.9 ± 1.1 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	4.6 ± 1.0 ^a	0.17 ^{NS}
	16	4.4 ± 0.5 ^a	4.5 ± 0.8 ^a	4.4 ± 1.1 ^a	4.3 ± 1.2 ^a	4.0 ± 1.2 ^a	0.30 ^{NS}
	21	5.0 ± 0.7 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	4.6 ± 1.3 ^a	0.42 ^{NS}
	30	4.8 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.9 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	0.79 ^{NS}
	40	5.0 ± 0.7 ^{ab}	5.2 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.6 ^{abc}	4.2 ± 0.5 ^{bc}	4.0 ± 0.7 ^c	3.82 ^{**}
	50	5.2 ± 0.8 ^a	5.4 ± 0.9 ^a	5.2 ± 1.1 ^a	5.0 ± 1.2 ^a	4.6 ± 1.5 ^a	0.35 ^{NS}
	60	5.0 ± 0.7 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 0.5 ^a	4.4 ± 1.5 ^a	0.72 ^{NS}
	70	5.2 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	0.93 ^{NS}
	80	5.4 ± 0.6 ^a	5.6 ± 0.9 ^a	5.4 ± 0.9 ^a	5.0 ± 0.0 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	1.04 ^{NS}
90	5.4 ± 0.6 ^{ab}	5.6 ± 0.6 ^a	5.4 ± 0.6 ^{ab}	4.8 ± 0.5 ^{bc}	4.6 ± 0.6 ^c	3.36 [*]	

Bifidobacterium 균수 측정

초코렛의 시료를 무균적으로 취하기 위하여 준비한 생리 식염수를 coming tube에 36 mL씩 미리 멸균처리한 후 각각의 처리구별로 2 반복하여 초코렛을 넣고 45°C의 항온수조에서 5분간 녹인 후 vortexing 하여 1 mL씩 취하여 0.85% 생리 식염수로 단계 희석한 후 젖산균 분리용 배지(Lactobacillus MRS agar and broth, Difco Lab., USA)에 L-cysteine 0.05%를 첨가하여 사용하였고, 1 mL씩 pouring culture method로 접종한 다음 Anaerobic system(ANOXOMAT WS8000 system, MART Microbiology BV, Lichtenvoorde, The Netherlands)을 사용하여 혐기상태로 치환한 후 37°C에

서 48~72시간 배양 후에 형성된 집락을 계수하였다(24).

통계처리

ANOVA 및 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)(25)을 통하여 5% 수준에서 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

관능적 특성

BFIP의 함량을 달리하여 만든 초코렛의 관능검사를 90일

Table 3. Continued

Sensory characteristics	Days	BFIP (%)					F-value
		0	1.0	2.0	3.0	4.0	
Sour taste	0	4.7 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.9 ^a	4.9 ± 1.0 ^a	4.8 ± 1.2 ^a	4.7 ± 1.2 ^a	0.16 ^{NS}
	3	4.6 ± 0.9 ^a	4.8 ± 0.9 ^a	4.7 ± 1.0 ^a	4.5 ± 1.2 ^a	4.3 ± 0.7 ^a	0.34 ^{NS}
	7	4.5 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	4.7 ± 0.5 ^a	4.5 ± 0.6 ^a	4.3 ± 0.5 ^a	0.99 ^{NS}
	10	4.7 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	4.9 ± 0.4 ^a	4.6 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	0.62 ^{NS}
	16	4.8 ± 0.5 ^a	4.9 ± 0.6 ^a	4.5 ± 1.1 ^a	4.4 ± 0.7 ^a	4.3 ± 0.7 ^a	0.95 ^{NS}
	21	4.8 ± 0.5 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	4.8 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	0.88 ^{NS}
	30	4.0 ± 0.0 ^a	4.4 ± 0.6 ^a	4.2 ± 0.8 ^a	4.2 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.5 ^a	0.93 ^{NS}
	40	4.6 ± 0.6 ^{ab}	5.2 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.8 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	1.94 [*]
	50	4.8 ± 0.8 ^a	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 1.0 ^a	5.2 ± 1.1 ^a	0.17 ^{NS}
	60	4.6 ± 0.6 ^{ab}	5.2 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.5 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.4 ± 0.6 ^b	1.77 [*]
	70	5.2 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 1.1 ^a	5.0 ± 1.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	0.22 ^{NS}
	80	4.8 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.8 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	4.4 ± 1.3 ^a	0.43 ^{NS}
90	4.6 ± 0.9 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.6 ± 0.6 ^a	4.4 ± 0.6 ^a	4.4 ± 0.9 ^a	0.24 ^{NS}	
Bitter taste	0	4.7 ± 1.1 ^{a,1)}	4.8 ± 1.5 ^a	4.6 ± 1.2 ^a	4.4 ± 1.6 ^a	4.4 ± 1.4 ^a	0.17 ^{NS}
	3	4.6 ± 0.8 ^a	4.8 ± 0.8 ^a	4.5 ± 1.1 ^a	4.2 ± 1.2 ^a	3.9 ± 1.3 ^a	1.23 ^{NS}
	7	4.3 ± 0.5 ^a	4.2 ± 0.4 ^{ab}	4.0 ± 0.0 ^{ab}	3.8 ± 0.4 ^{ab}	3.7 ± 0.5 ^b	2.40 [*]
	10	4.6 ± 1.0 ^a	4.7 ± 1.6 ^a	4.1 ± 0.7 ^a	3.9 ± 0.4 ^a	3.7 ± 1.4 ^a	1.10 ^{NS}
	16	4.3 ± 0.5 ^a	4.1 ± 0.4 ^a	3.9 ± 1.0 ^a	3.8 ± 0.7 ^a	3.6 ± 0.5 ^a	1.29 ^{NS}
	21	4.2 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.0 ^a	3.8 ± 0.8 ^a	3.8 ± 0.5 ^a	3.6 ± 0.6 ^a	0.93 ^{NS}
	30	4.0 ± 0.0 ^a	3.8 ± 0.5 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.6 ^{ab}	3.4 ± 0.6 ^b	1.30 [*]
	40	3.8 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.8 ^a	3.6 ± 0.6 ^a	3.4 ± 0.6 ^a	3.2 ± 0.5 ^a	1.00 ^{NS}
	50	4.6 ± 0.6 ^a	4.6 ± 0.9 ^a	4.4 ± 1.1 ^a	4.2 ± 1.3 ^a	4.0 ± 1.0 ^a	0.33 ^{NS}
	60	4.2 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.0 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.6 ^{ab}	3.4 ± 0.6 ^b	2.50 [*]
	70	4.6 ± 0.6 ^a	4.4 ± 0.6 ^{ab}	4.0 ± 0.7 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.9 ^b	2.05 [*]
	80	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 1.0 ^a	4.6 ± 1.3 ^a	4.4 ± 1.1 ^a	4.0 ± 0.7 ^a	0.88 ^{NS}
90	5.0 ± 1.4 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	4.8 ± 1.3 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}	3.6 ± 0.6 ^b	2.49 [*]	
Overall acceptability	0	4.9 ± 0.6 ^{ab}	5.2 ± 0.4 ^a	5.0 ± 0.9 ^{ab}	4.7 ± 0.8 ^{ab}	4.5 ± 0.9 ^b	1.31 [*]
	3	4.8 ± 0.7 ^{ab}	5.2 ± 0.7 ^a	4.9 ± 0.8 ^{ab}	4.7 ± 1.2 ^{ab}	4.4 ± 1.0 ^b	1.33 [*]
	7	4.8 ± 0.4 ^{ab}	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.0 ^{ab}	4.7 ± 0.5 ^{ab}	4.3 ± 0.8 ^b	1.85 [*]
	10	4.6 ± 0.5 ^{ab}	5.1 ± 0.7 ^a	4.9 ± 0.7 ^{ab}	4.4 ± 0.5 ^{ab}	4.3 ± 1.0 ^b	1.71 [*]
	16	4.5 ± 0.5 ^{ab}	4.8 ± 0.7 ^a	4.6 ± 0.5 ^{ab}	4.1 ± 0.6 ^{ab}	4.0 ± 0.8 ^b	2.06 [*]
	21	4.8 ± 0.5 ^{ab}	5.2 ± 1.1 ^a	5.0 ± 0.0 ^{ab}	4.6 ± 0.9 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	1.54 [*]
	30	4.8 ± 1.1 ^{ab}	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.0 ^{ab}	4.4 ± 0.6 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	1.79 [*]
	40	5.0 ± 0.0 ^{ab}	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.5 ^{ab}	4.6 ± 0.9 ^{bc}	4.2 ± 0.5 ^c	3.87 [*]
	50	4.8 ± 0.8 ^{ab}	5.4 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	3.35 [*]
	60	4.8 ± 0.8 ^{ab}	5.2 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.7 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	1.54 [*]
	70	5.0 ± 0.7 ^{ab}	5.4 ± 0.6 ^a	5.0 ± 0.0 ^{ab}	4.6 ± 1.1 ^{ab}	4.4 ± 0.6 ^b	1.58 [*]
	80	5.2 ± 0.5 ^{ab}	5.4 ± 0.6 ^a	4.8 ± 1.3 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.4 ± 0.6 ^b	1.54 [*]
90	4.8 ± 0.8 ^{ab}	5.2 ± 1.1 ^a	4.8 ± 0.5 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^{ab}	4.2 ± 0.5 ^b	1.27 [*]	

1) a,b,c Superscriptive letters indicate significant difference at α=0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

^{NS}Not significant, *p<0.05, **p<0.01.

동안 13회 실시한 결과는 Table 3과 같다. 외관은 BFIP의 함량이 다른 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

부드러운 정도는 저장 40일, 80일과 90일에만 유의적(p<0.05)인 차이를 보였는데, BFIP 0%인 대조구가 5.2 또는 5.4점으로 다른 처리구에 비해 부드러운 정도가 가장 좋은 것으로 나타났고, 그 다음으로는 1% 처리구순으로 BFIP의 첨가량이 많을수록 낮은 점수를 받았다.

단맛은 저장 40일(p<0.01)과 90일(p<0.05)에만 유의적인 차이를 보였다. 가장 좋은 점수를 받은 단맛은 BFIP 1% 처리

구로 나타났고, 그 다음 순서로는 대조구로 나타났다. BFIP 4% 처리구가 가장 낮은 단맛의 점수를 받았다.

신맛은 저장 40일과 60일에만 유의적(p<0.05)인 차이를 보였다. 가장 좋은 점수를 받은 신맛은 BFIP 1% 처리구로 나타났고, 그 다음으로는 2% 처리구로 보였다. 가장 낮은 점수를 받은 신맛은 BFIP 4% 처리구로 나타났다. 이러한 결과는 BFIP 자체가 가지고 있는 신맛이 영향을 미친 것으로 약간 첨가된 신맛이 기호의 향상을 나타낸 것으로 생각되었다.

쓴맛은 저장 7일, 30일, 60일, 70일과 90일에 유의적

Table 4. Isoflavone content (mg/g) in chocolate blended with BFIP during storage at room temperature

Isoflavones	BFIP (%)	Storage period (day)				
		0	10	30	60	90
Genistein	1.0	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16
	2.0	0.21	0.21	0.22	0.23	0.23
	3.0	0.24	0.23	0.23	0.24	0.24
	4.0	0.25	0.25	0.25	0.29	0.25
Genistin	1.0	0.06	0.07	0.07	0.08	0.05
	2.0	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	3.0	0.10	0.14	0.12	0.13	0.10
	4.0	0.16	0.17	0.15	0.16	0.15
Daidzein	1.0	0.12	0.17	0.11	0.17	0.14
	2.0	0.18	0.19	0.24	0.23	0.23
	3.0	0.26	0.26	0.27	0.26	0.26
	4.0	0.37	0.31	0.38	0.36	0.33
Daidzin	1.0	0.41	0.44	0.37	0.41	0.37
	2.0	0.66	0.69	0.66	0.73	0.66
	3.0	0.88	0.86	0.89	0.95	0.86
	4.0	1.03	0.99	1.00	1.01	1.03
Glycitein	1.0	0.06	0.05	0.05	0.07	0.08
	2.0	0.09	0.11	0.12	0.13	0.13
	3.0	0.16	0.16	0.15	0.14	0.18
	4.0	0.22	0.20	0.23	0.21	0.21
Glycitin	1.0	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11
	2.0	0.14	0.14	0.15	0.16	0.16
	3.0	0.19	0.22	0.22	0.22	0.19
	4.0	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25

($p < 0.05$)인 차이를 보였다. 쓴맛의 기호도 평가 결과 대조구가 가장 높은 점수를 받았고, 4% 처리구가 가장 낮은 점수를 받아 BFIP의 첨가량이 많을수록 낮은 점수를 나타냈다. 이것은 BFIP 자체가 가지고 있는 약간의 쓴맛이 최종 초코렛 제품의 기호에 영향을 미친 것으로 생각되었다.

전반적인 기호도는 전체 저장기간 동안에 BFIP 함량이 다른 모든 처리구에서 유의적($p < 0.05$)인 차이를 보였다. BFIP 1% 처리구가 유의적으로 가장 높은 점수를 받아 선호하는 것으로 평가되었고, 그 다음으로는 2% 처리구가 좋게 평가되었다. BFIP 4% 처리구가 가장 낮은 점수를 받았다. 저장 일별로 처리구들의 점수변화는 크지 않았고, 처리구 별로 각각 거의 비슷한 점수를 저장기간 동안 나타냈다.

이소플라본

BFIP의 함량을 달리하여 만든 초코렛을 90일 동안 실온에 저장하면서 저장 0일, 10일, 30일, 60일과 90일에 각각 초코렛에 함유된 이소플라본을 HPLC로 분석한 결과는 Table 4와 같다.

초코렛 제조에 사용된 원재료(Table 1)에서는 가장 많은 함량을 보인 것은 11.4 mg/g의 daidzin이었고, 그 다음으로는 genistein이 2.5 mg/g으로 많은 함량을 나타냈다. 가장 적은 함량을 보인 것은 glycitein으로 1.5 mg/g이었고, 이소플라본 전체 함량은 21.8 mg/g으로 나타났다. 본 실험에 사용된 BFIP는 *Bifidobacterium*으로 배당체를 비배당체로 전환시킨 대두

배아 발효분말로 비배당체인 genistein이 genistin 보다 많은 함량을 보였다. 대두 배아의 이소플라본의 조성 및 함량은 대두 전체의 이소플라본과는 차이를 보이며 배아의 이소플라본 함량이 대두에 비하여 약 5-10배 높다. 대두에는 genistein, daidzein 및 이들의 배당체와 유도체로 구성된 이소플라본이 함유되어 있으며, 대두의 이소플라본 함량은 daidzein에 비해 genistein이 많다⁽²⁶⁾. Tyrosinase kinase 활성 저해작용⁽²⁷⁾을 갖는 genistein은 항종양활성을 보유하는 것으로 보고 되었고^(9,11), 대두에 존재하는 이소플라본은 대부분이 genistin, daidzin과 같은 배당체 형태이지만, 대두 발효 식품에는 미생물의 β -glucosidase에 의해 당 잔기가 가수분해되어 aglycone인 genistein, daidzein 형태가 상대적으로 증가한다. 일부 유산균이 이소플라본 배당체를 가수분해시키는 것으로 알려지고 있고, Kiyosawa 등⁽²⁸⁾에 의하면 *Bifidobacterium longum*으로 제조한 대두 요구르트의 경우 이소플라본의 94%가 aglycone으로 전환되었다고 하였다. 본 실험에서 사용한 BFIP는 미생물을 이용하여 이소플라본을 생물 전환한 것으로 섭취시에 BFIP에 존재하는 *Bifidobacterium*이 장속에서 비배당체로 전환이 계속 일어나 이용성 측면에서 유리할 것으로 생각되었다.

Table 4에서 BFIP의 함량을 달리하여 제조한 초코렛을 90일 동안 실온에 저장한 후 초코렛에 함유된 이소플라본 함량을 분석한 결과 저장기간 동안에는 큰 변화 없이 제조당일의 이소플라본 함량 %를 기준으로 처리구별로 함량 차이

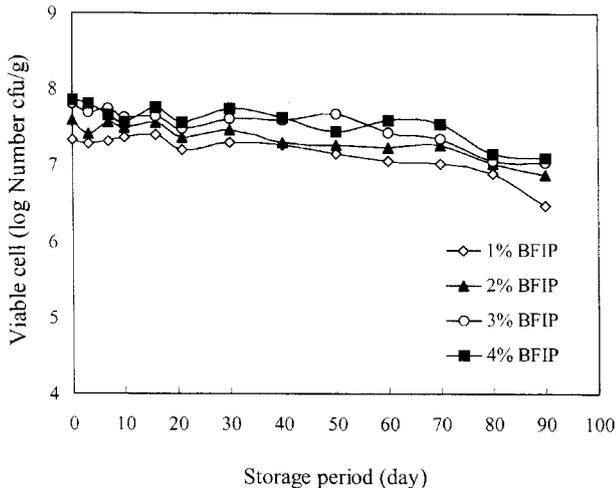


Fig. 1. *Bifidobacterium* cell number in chocolate blended with BFIP during storage at room temperature.

는 약간씩 있었지만, 거의 유지하였다. BFIP의 원료자체 분석결과에서와 마찬가지로 처리구별로 가장 많은 함량을 나타낸 것은 daidzin이었고, 그 다음으로는 1%와 2% 처리구는 genistein이 약간 많았고, 3%와 4% 처리구는 genistein보다 daidzein이 약간 많이 나타났다. 처리구별로 가장 적은 함량을 나타낸 것은 genistin으로 나타났다.

유산균수

BFIP의 함량을 처리구별로 달리하여 만든 초코렛의 *Bifidobacterium* 균수 측정 결과는 Fig. 1과 같다.

초코렛 제조후 저장 70일까지 대부분의 처리구에서 *Bifidobacterium* 균수가 비교적 잘 유지되었고, 저장 80일과 90일에는 모든 처리구에서 약간씩 감소하였다. BFIP의 첨가량에 따라 처리구별로 약간의 *Bifidobacterium* 균수의 차이를 보였다. 이러한 결과는 초코렛의 제조과정상 BFIP가 초코렛의 중심 부분에 미리 반죽한 상태로 같이 섞여 들어가고, 외피 부분에 밀크초코렛이 둘러싸고 있기 때문에 혐기상태를 유지할 수 있어 *Bifidobacterium*의 생존수가 유지되는 것으로 생각된다. 또한 BFIP 자체의 생존수 보다 제조직후에 약간 줄어드는 것은 화이트초코렛에 BFIP를 반죽할 때 버무리는 공정에서 외부의 노출에 의한 생존수의 감소로 생각되었다.

본 연구의 결과는, *Bifidobacterium*으로 발효한 이소플라본 함유물 초코렛을 제조하였을 때 초코렛의 관능적 특성의 개선과 함께 *Bifidobacterium*과 이소플라본이 비교적 안정적으로 유지되는 제품의 제조가 가능함을 제시하였다.

요 약

*Bifidobacterium*을 이용하여 이소플라본을 비배당체로 전환시킨 *Bifidobacterium*-fermented isoflavone powder(BFIP)를 실생활에서 쉽게 이용할 수 있도록 기능성 초코렛 제품을 개발하고자 BFIP의 첨가량을 0, 1, 2, 3, 4%(w/w)의 5가지 실험처리구로 달리하여 초코렛을 제조한 후 실온(24±0.5°C)에서 90일 동안 저장하면서 관능적, 화학적 및 미생물학적 특

성을 보았다. 관능평가 결과 BFIP가 많을수록 부드러운 정도가 좋지 않은 것으로 나타났고, 쓴맛을 많이 나타내어 낮은 점수를 받았다. 단맛과 신맛은 1% 처리구가 높은 점수를 받았고, 전반적인 기호도 결과 BFIP 1% 처리구를 가장 선호하였고, 그 다음으로 2% 처리구를 좋아하는 것으로 나타났다. 이소플라본 분석결과 처리구별로 저장 90일 동안 이소플라본 함량을 거의 유지하였다. 초코렛에 첨가된 *Bifidobacterium* 균수의 생존율을 경시적으로 조사한 결과 초코렛 제조후 첨가구별 *Bifidobacterium* 균수가 저장 70일까지 거의 유지되었고, 저장 80일과 90일에 모든 첨가구에서 약간씩 감소하였다. 연구결과 기능성 초코렛의 제조는 초코렛의 본래의 기호를 유지시킬 수 있는 BFIP 1% 처리구가 바람직한 것으로 나타났고, 기능성과 기호성을 생각한다면 2% 처리구까지 가능한 것으로 보였다.

감사의 글

본 연구는 국가지정연구실 지원(M1-0302-00-0098)의 일부로 수행되어 이에 감사드립니다. 실험에 참여한 서울대학교 식품영양학과 식품미생물실험실 대학원생들에게도 감사를 드립니다.

문 헌

1. Knight, D.C. and Eden, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* 87: 897-904 (1996)
2. Cassidy, A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 399-417 (1996)
3. Barrett, J. Phytoestrogens. Friends or foes? *Environ. Health Perspect* 104: 478-482 (1996)
4. Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. and Coward, A. Phyto-oestrogens: where are we now? *Br. J. Nutr.* 79: 393-406 (1998)
5. Setchell, K.D.R. and Cassidy, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129: 758S-767S (1999)
6. King, L.A. and Carr, B.R. Phytoestrogens: Fact and fiction. *Patient Care* 33: 127-143 (1999)
7. Adlercreutz, H. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect* 103: 103-112 (1995)
8. Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hamalainen, E., Fotsis, T. and Ollus, A. Effect of dietary components including lignans and phytoestrogens on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin. *J. Steroid Biochem.* 27: 1135-1144 (1987)
9. Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Bowen, R. and Barnes, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistin. *Nutr. Cancer* 20: 1-12 (1993)
10. Sharma, O.P., Adlercreutz, H., Strandberg, J.D., Zirkin, B.R., Coffey, D.S. and Ewing, L.L. Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43: 557-564 (1992)
11. Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., Hamalainen, E., Wahala, K., Makela, T. and Hase, T. Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41: 331-337 (1992)
12. Messina, M. and Messina, V. *The Simple Soybean and Your Health*, p. 67. Avery Publishing Group, New York, USA (1994)
13. Axelson, M. and Setchell, K.D.R. The extraction of lignans in

- rats-evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Lett.* 123: 337-342 (1981)
14. Hutchins, A.M., Slavin, J.L. and Lampe, J.W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet Assoc.* 95: 545-551 (1995)
 15. Lee, J., Ametani, A., Enomoto, A., Sato, Y., Motoshima, H., Ike, F., Kaminogawa, S. Screening for immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 2127-2132 (1993)
 16. Lee, M.H., Park, Y.H., Oh, H.S. and Kwak, T.S. Isoflavone content in soybean and its processed products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 365-369 (2002)
 17. Choi, Y.B. and Sohn, H.S. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 745-750 (1998)
 18. Oh, H.S., Park, Y.H. and Kim, J.H. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 498-504 (2002)
 19. Kim, C.H., Park, J.S., Sohn, H.S. and Chung, C.W. Determination of isoflavone, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides and lecithins from commercial soy products based on the one serving size - Some bioactive compound from commercialized soy products-. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 96-102 (2002)
 20. Choi, Y.B., Woo, C.G. and Noh, W.S. Hydrolysis of β -glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 189-195 (1999)
 21. Kim, N.J., Park, S.J., Yum, E.M., Kim, H.Y., Lee, S.H., Min, J.H., Park, M.S. and Ji, G.E. Effect of *Bifidobacterium*-fermented soy hypocotyls intake on the composition of human large intestinal bacteria in the elderly. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 178-179 (2003)
 22. Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. *Sensory Evaluation Techniques*. 2nd ed., p. 53. CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1991)
 23. Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. and Carman, A.S. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.* 38: 185-190 (1990)
 24. Collins, C.H. and Lyne, P.M. *Microbiological Methods*. 5th ed., pp. 130-133. Butterworth & Co. Ltd., Oxford, UK (1995)
 25. Song, M.S., Lee, Y.C., Cho, S.S. and Kim, B.C. *The Use of SAS Statistical Data Analysis-Regression Analysis*. Ja-Yu Academy, Seoul, Korea (1993)
 26. Kim, J.S. and Yoon, S. Isoflavone contents and β -glucosidase activities of soybeans, meju, and doenjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1405-1409 (1999)
 27. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. Genistin, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595 (1987)
 28. Kiyosawa, L., Matsuyama, J., Arai, C. and Setoguchi, T. Suppressive effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones. *Nippon Shokuhin Kagaku Kai-shi* 42: 835-842 (1995)

(2003년 8월 19일 접수; 2003년 11월 4일 채택)