

Cacao Mass 가공 중 페놀 화합물의 성분조성 변화와 항산화 활성

이정숙 · 권익부* · 이신영**

(주) 일화연구소, *롯데중앙연구소, **강원대학교 바이오산업공학부

Change of Phenolic Compounds and Its Antioxidant Activity in Cacao Products during Cacao Mass Processing

Jung-Suk Lee, Ik-Boo Kwon* and Shin-Young Lee**

Ilwha Co. Ltd.

**Lotte Group R & D Center*

***School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University*

Abstract

This study was carried out to elucidate the physiological activity of phenolic compounds from cacao (*Thebroma cacao* L.) and its subproducts during cacao mass processing. Phenolics from cacao were fractionated and their anti-oxidative effect was investigated. Free phenolic acid (FPA), soluble phenolic acid ester (SPA) and insoluble bound phenolic acid (IPA) were extracted from defatted cacao and its subproducts. The anti-oxidative activity of these samples was compared by measuring of thiobarbituric acid value, peroxide value (linoleic acid substrate) and electron donating ability (EDA). The IPA and SPA extracts were highest anti-oxidative activity among the three kind of phenolic extracts and showed higher antioxidative activity than that of FPA. Three fractions (procyanidin B-2, epicatechin and catechol) on TLC were detected and epicatechin was assumed as major active component of anti-oxidative action.

Key words: *Thebroma cacao* L., subproducts of cacao mass processing, phenolic compounds, anti-oxidative activity

서 론

페놀성 화합물(phenolic compound)은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서, 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능도 매우 다양하게 나타난다(Burns *et al.*, 2000). 한 개 또는 두 개 이상의 수산기로 치환된 방향족 고리를 공통적으로 갖는데, 이 phenolic hydroxyl group 때문에 단백질, 효소 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질이 있으며, 2가 금속 이온과의 결합력도 갖는다(Lee와 Lee, 1994). 이러한 성질로 인하여 페놀성 화합물은 항 바이러스

작용, 항 HIV 작용, DNA 절단작용, 항 종양작용, 항 알러지 작용, 항 ACE(angiotensin converting enzyme) 활성 저해작용 등 많은 생리활성을 가짐이 밝혀지고 있다(Lee *et al.*, 1998; Shetty, 1997; Cook과 Samon, 1996; Hertog *et al.*, 1993; Cliffe *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1992, 1986; Kwon, 1991).

이 중에서도 특히, 식품의 유지 산화억제는 물론, 노화가 생체조직의 노화나 질병의 억제에 관여하는 항산화에 대한 강력한 효과를 갖는 것으로 확인되고 있어, 점차 천연 항산화제로의 활용 가능성 측면에서 크게 기대되고 있다(Larson, 1988; Pratt과 Hudson, 1990; Bocco *et al.*, 1998). 이는 현재 주로 사용되는 인공합성 항산화제의 경우 강력한 항산화 효과 및 경제성에도 불구하고 안정성에 대한 논란이 많고, 소비자들의 거부감이 높기 때문이다.

따라서 그 동안 각종 식물 등 천연물로부터 항산화 물질을 추출·분리하여 천연 항산화제로 사용하

Corresponding author: Shin-Young Lee, School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

Phone: 033-250-6273, Fax: 033-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

려는 탐색 및 개발 연구가 매우 활발히 진행되어 왔었다(Kahkonen *et al.*, 1999).

한편, 이러한 페놀성 생리소재로서 최근 cacao bean이나 mass의 폴리페놀류 성분들도 항충치 작용, 항스트레스 작용, 동맥경화, 알레르기 질환 및 암의 예방 효과 등, 각종 심장 질환으로부터 새로운 면역조절 작용 등에 이르는 다양한 기능을 가짐이 보고되어 점차 관심이 높아지고 있다(Takizawa, 1996).

국내에서도 그 동안 초콜릿의 주원료인 cacao bean(CB)은 물론, 가공 중 폐기되었던 CBH(cacao bean husk)에서 부터도 각종의 생리 활성을 탐색하는 등, 초콜릿 관련 성분에 대한 새로운 기능성 탐색 연구는 큰 성과를 거두고 있는 실정이다(Kwon, 1991; Lee *et al.*, 1998).

하지만 다량의 폴리페놀을 함유하며, 주로 epicatechin, procyanide, catechin 중합체 등의 flavon-3-ol로 구성되어 있어, 페놀 OH기에 의한 강력한 항산화 활성 및 활성산소의 소거능이 기대되는 카카오 유래 페놀 화합물의 항산화 활성에 대한 보고는 미미하고(Yamaguchi and Naito, 1984), 특히, cacao 가공 중의 변화에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 지금까지 cacao 유래의 페놀 화합물에 대한 미미한 연구 보고, 카카오콩의 가공에 따른 자료의 부재 및 제조과정 중 폐기처분되고 있는 CBH(cacao bean husk)를 이용할 경우, 폐자원의 재활용 및 환경보전이라는 측면에서의 부가적 효과도 얻을 수 있다는 점 등에 착안하여 cacao mass 가공 중(winning, reaction 및 roasting)의 중간 제품을 시료로 폴리페놀 성분을 분획하였고, 각 분획물의 조성 변화 및 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 Cacao bean(*Theobroma cacao* L.)은 Ghana 산으로 L-사로부터 제공 받았다. L-사의 BTC 가공 공정(Buhler, 1997; Lee *et al.*, 2001)에 따라 얻은 각 공정별 중간 제품(Cacao bean husk, cacao bean, winnowed sample, reacted sample 및 cacao mass)을 재료로 사용하였으며(Fig. 1), 각 재료는 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

페놀성 물질의 추출

Phenol성 물질은 Krygier *et al.*(1982)의 방법에 준

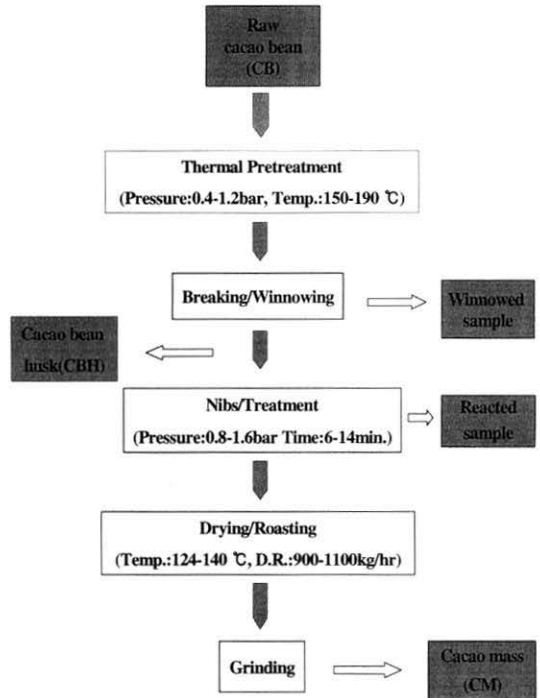


Fig. 1. Flow diagram for sample preparation from fermented cacao bean.

하여 다음과 같이, 추출하였다. 즉, 시료를 Soxhlet 법으로 diethyl ether를 사용하여 12시간 추출한 후 70°C로 유지한 건조기에서 건조하고 30 mesh 체를 통과시켰다. 각 공정별 시료 1g에 70% methanol과 70% acetone(1:1, v/v)의 혼합용매 20 ml을 가하여 균질기(homogenizer, 동양(주) model 0802)로 5분간 추출한 후, 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 이 조작을 6회 반복 실시한 다음, 상등액을 합하여 20 ml이 되도록 감압농축하였고, 이를 Fig. 2에 따라 FPA(free phenolic acid) SPA(soluble phenolic acid ester) 및 IPA(insoluble-bound phenolic acid)로 추출·분획하였다. 즉, FPA의 추출에서는 위의 농축액을 6N HCl로 pH 2로 조절하고, 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하였으며, 동량의 n-hexane으로 5회 추출하여 유리 지방산과 지방질 오염물질들을 제거하였다. 물층은 diethyl ether와 ethyl acetate(DE/EA-1:1, v/v)의 동량으로 혼합한 혼합용매로 6회 추출하였으며, sodium sulfate(anhydrous)로 잔여 수분을 제거하고 감압농축하여 FPA로 하였다. 또 SPA의 추출에서는 sodium sulfate를 세척한 물과 남은 물층 및

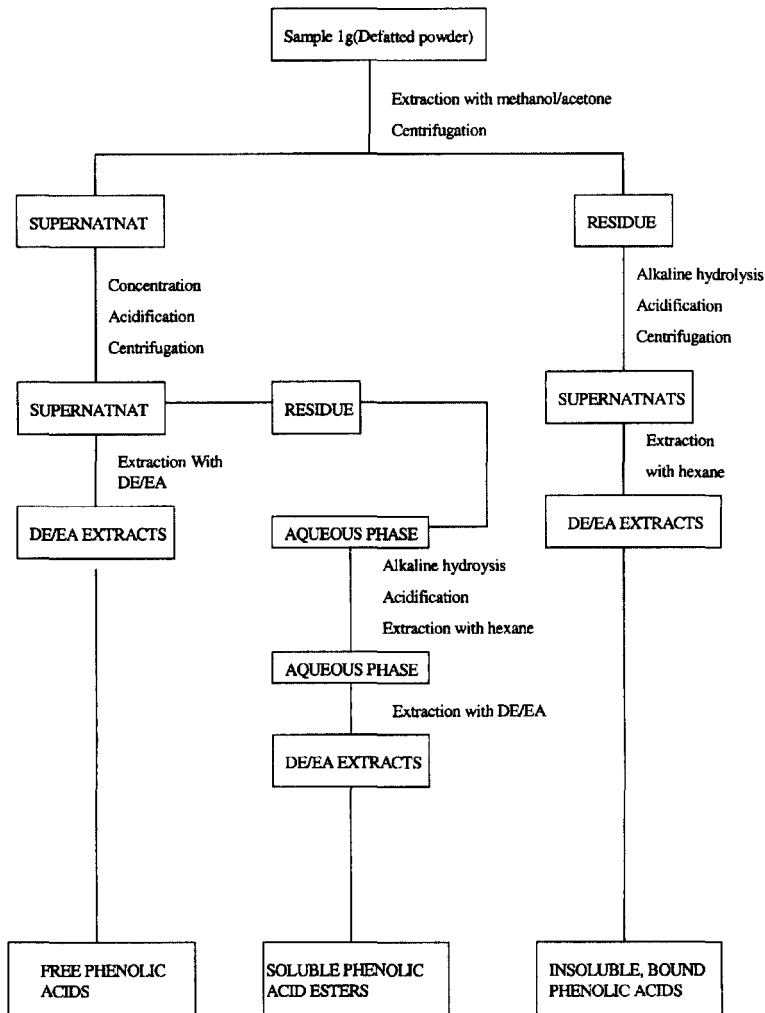


Fig. 2. Extraction and purification of phenolic acids (Free, Esterified and Insoluble-bound).

침전물을 혼합하였다. 이 혼합액을 4 N NaOH 20 ml로 질소가스 기류하의 상온에서 4시간 동안 가수분해시킨 후, 6 N HCl로 pH를 2로 조절한 다음, n-hexane으로 추출하고, DE/EA 혼합용매로 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하여 SPA로 추출·분리하였다. IPA의 경우는 70% methanol과 acetone 혼합용매로 추출하고 남은 잔사에 4 N NaOH 10 ml를 가하여 질소가스 기류하의 상온에서 4시간동안 가수분해시켰다. 다시 6 N HCl로 pH 2로 조절한 다음, 6000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 n-hexane으로 추출하고, DE/EA 혼합용매로 위와 동일한 방법으로 추출, 농축하였으며, 이를 IPA로 추출·분리하였다.

Phenol성 물질의 함량 측정

추출한 각 phenol성 물질의 함량 측정은 총 phenol 함량을 측정하는 Bray와 Thrope(1954)의 방법으로 측정하였다. 즉, 각 페놀성 물질 0.2 ml에 2% Na₂CO₃ 2.0 ml를 가하여 충분히 혼합하고 2분 후에 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 ml를 가하여 상온에서 30분 동안 방치한 다음, 분광광도계(Spectronic, GENESYS-5, USA)로 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Phenol 함량은 catechin(Sigma, C-1251)을 표준물질로 이용한 표준곡선으로부터 구하였다.

항산화 활성 측정

TBA(thiobarbituric acid) 값 측정: 각 phenol성 물

질의 항산화 활성은 α -tocopherol을 대조로 하여 Sidwell *et al.*(1954)의 방법에 의한 TBA값을 측정하여 구하였다. 즉, linoleic acid를 0.03 M이 되도록 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol 혼합용매 (4:1, v/v)에 첨가하여 기질용액을 제조하였다. 이 기질용액 20 ml에 0.1 M phosphate buffer 19.2 ml와 1% 시료용액 0.8 ml를 첨가하여, $40 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지한 항온기에서 1~7일간 진탕하면서 경시적으로 TBA값을 측정하였다. 시료액 2.0 ml에 35% TCA(trichloroacetic acid)용액 1.0 ml와 0.75% TBA(Sigma T-5500) 시약 2.0 ml를 가하여 혼합한 후, 끓는 항온수조에서 40 분간 반응시킨 후, 실온으로 냉각하고, acetic acid 1.0 ml와 chloroform 2.0 ml를 가하였다. 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 TBA값을 구하였다.

과산화물가(Peroxide value, POV)의 측정: 과산화물가는 로단-철 법(Osawa와 Namiki, 1981)을 사용하여 다음과 같이 구하였다. 즉 0.1 M linoleic acid 20 ml와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 20 ml의 혼합액에 적정 시료액(질소 함유량으로 약 1 mg이 되는 량)을 가해서 50 ml로 pooling up하였다. 이 시험액을 45°C 의 항온조에서 차광 보존하면서 경시적으로 시험액 0.1 ml을 취하여 75% ethanol 4.7 ml에 가하였다. 여기에 30% NH_4SCN 0.1 ml와 20 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 3.5\% \text{HCl}$ 0.1 ml를 가하여 3분간 방치한 후, 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

전자 공여능의 측정: 전자 공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법(1958)을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 0.2 ml에 4.1×10^{-5} M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma D-9132) 용액 1.0 ml를 가한 후 10초 동안 진탕하고, 10분간 반응시켜 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 다음 식에서와 같이 계산하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

여기서 A는 무첨가구의 흡광도, B는 시료 첨가구의 흡광도이다.

Polyphenol류의 동정

Cacao 시료에서 추출한 각 phenolic 분획에 대하여 Silica gel-coated TLC plate(Silica gel 60 F254, 5.0×5.0 cm, Merck, Sweden)를 사용하여 페놀성 물질을 동정하였다(Kwon, 1991). 0.025 g/ml의 시료 및 표준물질(catechin, procyanidin B-2, epicatechin, catechol)을 TLC plate에 2-5회 spotting하였고, benzene, ethylformic acid 및 formic acid(2:5:1, v/v/v)의 용매로 전개한 다음 전개정도를 자외선 램프로 확인하였다. 발색제로는 FeCl_3 와 p-anisaldehyde를 사용하였고, FeCl_3 에 의해서 청색으로 발색되는 물질은 가수분해형 polyphenol, 그리고 FeCl_3 에 대하여 청색 및 anisaldehyde에 의해 갈색으로 발색되는 물질은 축합형 polyphenol로 동정하였다.

결과 및 고찰

Cacao 시료의 phenolic acid 함량 및 가공중의 변화

페놀성 물질은 일반적으로 하나 또는 둘 이상의 수산기로 치환된 방향족 고리를 가지고 있는 식물성분을 말하며, 당과 결합하여 배당체로서 존재하는 경우가 많고 단백질이나 섬유에 결합된 경우도 있다(Bravo *et al.*, 1994). 이러한 페놀성 물질 중 phenolic acid는 free phenolic acid(FPA), soluble phenolic acid ester(SPA) 및 insoluble-bound phenolic acid(IPA)로 분류된다(Krygier *et al.*, 1982).

따라서, Cacao의 각 탈지 시료로부터 FPA, SPA 및 IPA 형태의 각 phenol acid를 추출하였고, 이들의 함량을 catechin을 표준물질로 하여 측정하였으

Table 1. Content of each type of phenolic acids in the phenolic extracts from defatted cacao and its subproducts

Samples ²⁾	Free Phenolic Acid (FPA, %)	Insoluble-Bound Phenolic Acid (IPA, %)	Soluble Phenolic Acid (SPA, %)	Total Phenolic acid (TPA, %)
CBH	27.73±2.57 ¹⁾	38.89±1.35	33.22±1.82	100
Cocoa bean	32.92±2.57	33.80±1.25	33.29±1.83	100
Winnowed	31.60±1.87	49.76±0.49	18.63±1.00	100
Reacted	21.05±1.06	50.26±2.91	28.26±0.67	100
Cocoa mass	25.18±1.46	48.58±1.92	26.23±3.94	100

1) Mean±S.D.

2) See the legend of Fig. 1.

며, 그 결과는 Table 1과 같다. Cacao의 탈지 시료에서 추출한 세가지 형태의 phenol성 물질이 총 phenol성 물질에서 차지하는 비율은, CBH에서는 IPA 추출물과 SPA 추출물의 함량이 각각 38.89 및 33.22%이었고, CB에서는 각각 33.80 및 33.29%로, CBH와 CB에서의 함량의 차이는 볼 수 없었다. 그러나 각 공정별 시료의 함량은 winnowing, reaction 및 roasting 시료에서 IPA가 각각 49.76, 50.26 및 48.58 %로 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 또 FPA의 함량은 CBH와 CB에서 각각 27.73 및 32.92%를 나타내었고, 공정별 시료의 함량을 보면 winnow, reaction 및 roasting 시료에서 각각 31.60, 21.05 및 25.18%로 CB의 가공처리에 의하여 다소 낮아지는 경향을 보였다. 이는 steam 처리 및 볶음 처리에 의해 열을 가함으로써 raw bean에서 수용성의 페놀성 물질이 유리되었기 때문이라고 생각되었다. 또한 IPA 및 SPA 추출물 함량이 FPA 추출물의 함량보다 대체적으로 많거나 비슷한 경향을 나타내었는데, 이러한 결과는 탈지 들깨 밖에서 추출한 세가지 형태의 phenol성 물질(Lee, 1993), 또는 자소자(*Perillae semen*) 탈지 시료에서 추출한 phenol성 물질의 함량과는 다른 경향으로 시료간의 차이를 보였다(Kim et al., 1997).

Cacao 페놀성 물질의 항산화 활성

TBA값의 변화에 의한 항산화 활성

Cacao 폴리페놀류의 항산화 활성을 α -tocopherol (0.05%, w/v)을 표준으로 하여 TBA값의 측정에 의하여 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3~7과 같다. 각 그

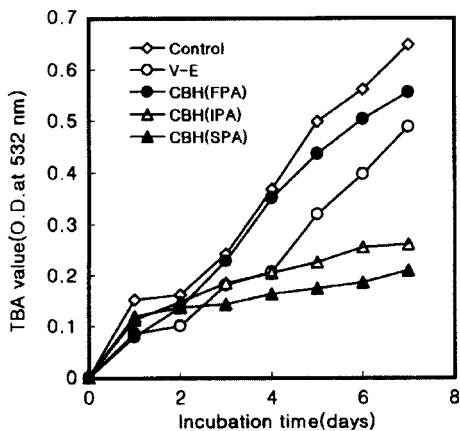


Fig. 3. Antioxidative activity of cacao bean husk (FPA, IPA, SPA) by TBA method.

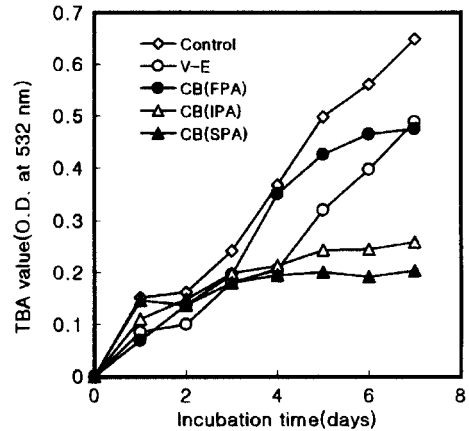


Fig. 4. Antioxidative activity of cacao bean (FPA, IPA, SPA) by TBA method.

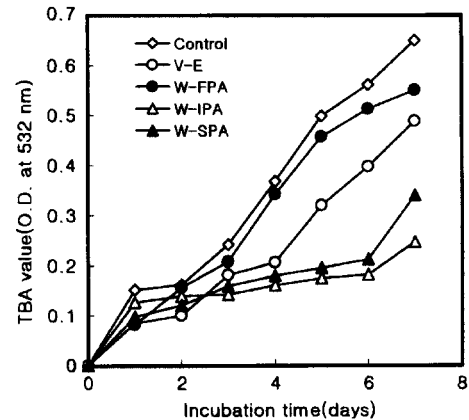


Fig. 5. Antioxidative activity of winnowed sample (FPA, IPA, SPA) by TBA method.

림은 여러 Cacao 시료로부터 추출한 세가지 형태의 각 phenol성 추출물(FPA, IPA 및 SPA)의 항산화 활성을 linoleic acid를 기질용액으로 하여 TBA값의 경시변화로 나타낸 것이다. 모든 시료의 SPA와 IPA에서는 저장기간에 따라 TBA값의 변화가 적어서 SPA 및 IPA의 항산화 활성이 높은 것으로 나타났으며, FPA의 항산화 활성은 낮게 나타났고, CBH, CB 및 winnowing 시료간의 활성의 차이도 현저하였다. 그러나 reaction 및 roasting 시료에서는 SPA, IPA 및 FPA의 항산화 활성이 거의 비슷하여 reaction이나 roasting에 의하여 영향을 받지 않았다. 특히, 각 공정별 Cacao 시료의 phenol성 물질의 항산화 활성은 비교구로 사용한 α -tocopherol의 항산화 활성보다도 더 높게 나타나 매우 강력한 항산화능을 가짐

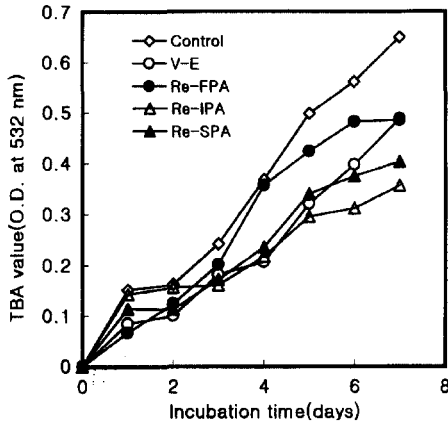


Fig. 6. Antioxidative activity of reacted sample (FPA, IPA, SPA) by TBA method.

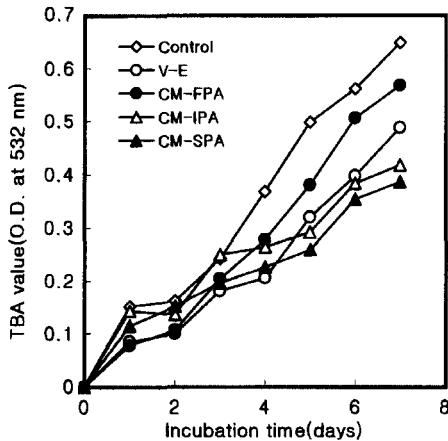


Fig. 7. Antioxidative activity of roasted sample (FPA, IPA, SPA) by TBA method.

을 알 수 있었다. 또 저장기간이 길어지면서 α -tocopherol 및 대조구의 TBA값은 크게 저하하나, SPA 및 IPA의 추출물의 TBA 값은 큰 변화를 보이

지 않았으며, 특히 산화과정 말기에 더욱 항산화 효과가 있음을 보였다. 따라서 Cacao 유래 각 phenol성 추출물들의 항산화 활성은 SPA와 IPA가 FPA보다 더 높음을 알 수 있는데, 이러한 결과는 탈지 들깨박에 대한 Lee(1993)의 결과와 비슷하였다. FPA는 유지에 녹기 어렵고, 이들의 함량도 다른 두 형태의 추출물보다 다소 낮거나 비슷하므로 이러한 SPA와 IPA의 더 높은 항산화 활성은 실제의 활용 측면에서 더욱 효율적일 것으로 생각되었다.

POV의 변화에 의한 항산화 활성

유지의 산화 초기단계에서 산화의 정도를 나타내는 과산화물가를 로단-철법(Osawa and Namiki, 1981)으로 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 8과 같다. 그림은 CBH와 CB로부터 추출한 세가지 형태의 각 phenol성 추출물(FPA, IPA 및 SPA)의 항산화 활성을 linoleic acid를 기질용액으로 하여 POV에 의한 경시변화로 나타낸 것이다. 세가지 형태의 phenol성 물질의 항산화 활성을 POV로 비교한 결과, 각 시료 모두 TBA값의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 즉, 저장기간에 따라 대조구와 비교하였을 때, 각 시료의 POV 변화는 낮아서 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 비교구인 0.05%(w/v) BHT 보다는 항산화 활성이 다소 떨어지는 경향을 볼 수 있었다. 또 다른 비교구인 Vitamin C의 경우, 저장기간 7일째부터 항산화 활성이 급속도로 떨어지는 반면, SPA와 IPA는 큰 변화를 나타내지 않아서, TBA값의 결과에서와 마찬가지로 산화과정 말기에 매우 높은 항산화 활성을 나타냄을 보였다. Cacao 유래 페놀성 물질의 이러한 결과는 Lee(1993)의 탈지 들깨 박에서 추출한 페놀화합물의 항산화 효과를 측정 한 결과와 비슷하였으며, 이상의 결과로부터 Cacao 유래 phenol성 물질들은 천연 항산화제로의 활용 가능성이 크게 기대되는 것으로 생각되었다.

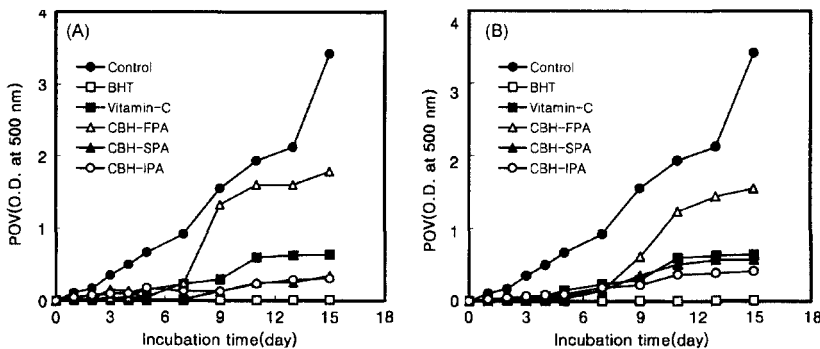


Fig. 8. Changes in peroxide value of SPA, IPA and FPA extracted from cacao bean husk (A) and cacao bean (B).

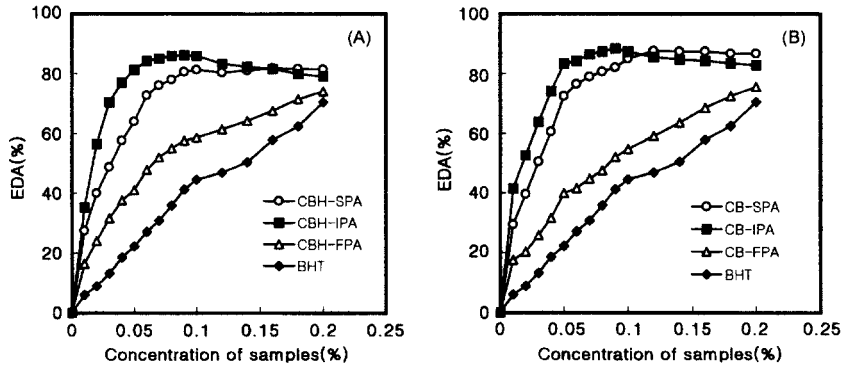


Fig. 9. Electron donating ability (EDA) of BHT and phenolic acids extracted from defatted cacao bean husk (A) and cacao bean (B).

전자공여 작용

항산화 물질의 대표적인 기능은 free radical의 포착체로서의 기능이며, 작용 기구로는 수소 공여체로 작용하는 경우, 전자 공여체로 작용하여 전하이동 복합체를 형성하는 경우 및 연쇄반응으로 생성되는 과산화물을 분해하여 안정된 비 free radical성 생성물을 형성하는 경우 등이 있다. 이외에도 지질의 과산화에서 촉매로 작용하는 lipase나 lipoxygenase 등의 효소를 불활성화하는 효소저해제로서의 역할도 중요하다(中村 良 等, 1989).

최근 페놀성 항산화 물질질의 작용 기구로는 전자 공여체로서의 기능이 중요한 것으로 추정되고 있다. 따라서 본 시료의 높은 항산화 활성에 대한 작용 기구를 알아보기 위하여, CBH 및 CM의 탈지 시료로부터 추출한 세가지 형태의 phenol성 물질(FPA, IPA 및 SPA)의 DPPH에 대한 전자 공여 작용을 BHT와 비교하면서 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 9 및 Table 2와 같다. 시료 모두 대조구에서는 phenol성 물질의 농도가 0.01~0.20%로 증가할수록 DPPH에 대한 전자공여능도 증가하였다. 0.10% BHT의 전자공여능은 46%이었으나 0.10% 시료 농도에서 CBH 및 CB의 IPA 전자 공여능은 각각 86.00 및

87.44%로, 매우 높은 전자공여능을 나타내었다. 또 SPA의 전자 공여능도 각각 84.06% 및 85.02%로, FPA 추출물에서의 58.70% 및 54.83% 보다 훨씬 높은 전자 공여능을 나타내었다. 따라서 IPA나 SPA는 FPA보다 높은 전자 공여능을 나타내어 free radical 제거능이 FPA보다 우수함을 알 수 있었으며, 아울러 이러한 결과는 TBA값이나 POV로 측정된 항산화 활성 결과와 높은 상관관계를 보여서 이들 항산화 활성의 작용은 전자 공여능에 기인함을 알 수 있었다.

항산화 활성 성분의 확인

Cacao에서 추출한 phenol성 물질을 TLC법으로 분리 및 확인한 결과는 Fig. 10과 같다. CBH와 CB에서 추출한 phenol성 물질(SPA, IPA 및 FPA)은 FeCl₃ 및 anisaldehyde 용액으로 발색시켰을 때 각각 청색 및 갈색으로 발색되었고, 따라서 SPA, IPA 및 FPA는 모두 축합형 polyphenol인 것으로 나타났다.

SPA와 IPA에서는 각각 3개의 spot(A, B, C)가 검출된 반면, FPA에서는 A와 C만이 검출되었다. Fig. 10에서 보는 바와 같이, spot A, B 및 C의 R_f 값은 각각 0.554, 0.761 및 0.917로, 각각 표준물질인 procyanidin B-2, epicatechin 및 catechol과 일치하였다. 특히, spot B(epicatechin)는 높은 항산화 활성과 전자 공여능을 나타낸 SPA와 IPA에서만 나타나므로 항산화 활성의 주성분은 epicatechin인 것으로 생각되었다.

Table 2. Electron donating ability (EDA) of BHT and phenolic acid extracts from defatted Cacao Bean Husk (CBH) and Cacao Bean (CB)

Samples	Electron donating ability(%)		
	CBH (0.1%)	CB (0.1)	BHT (0.1%)
FPA	58.70	54.83	-
SPA	84.06	85.02	-
IPA	86.00	87.44	-
BHT	-	-	46.38

결론

Cacao 시료의 폴리페놀 함량은 1.746~2.959 g/L이었으며, SPA(soluble phenolic acid), IPA(insoluble

- Katan, and D. Kromhout. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* **342**: 1007-1011
- Huang, M.T., C.T. Ho and C.Y. Lee. 1992. Phenolic compounds in food and their effects on health I, II. ACS symposium series, 506 and 507. American Chemical Society, Washington, DC
- Huang, H.M., G.L. Johannig, and B.I. O'Dell. 1986. Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. *J. Agric. Food Chem.* **34**(1): 48-51
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala and M. Heinonen. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**(10): 3954-3962.
- Kim, Y.J., C.K. Kim and Y.J. Kwon. 1997. Isolation of antioxidative compounds of *Perillae semen*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**(1): 38-43
- Krygier, K., F. Sosulski and L. Hogge. 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **30**(2): 330-334
- Kwon, I.B. 1991. Studies on Glycosyltransferase Inhibitors from Cacao Bean Husk. Kangwon National University, Ph. D. Thesis(1991)
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**: 969-978
- Lee, J.H. and S.R. Lee. 1994. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**(3): 317-323
- Lee, K.Y. 1993. Antioxidant effects of phenolic compounds isolated from defatted Perilla seed flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**(1): 9-14
- Lee, M.J., Y.R. Chang and M.H. Yim. 1998. Chemical structure of polyphenols isolated from cacao bean and their inhibitory effect on ACE. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.* **41**(1): 110-117
- Lee, S.Y., S.S. Yoo, M.J. Lee, I.B. Kwon and Y.R. Pyun. 2001. Optimization of nibs roasting in cocoa bean processing with Lotte-better taste and color process. *Food Sci. Biotechnol.* **10**(3): 286-293
- Osawa, T. and M. Namiki. 1981. A novel type of antioxidant isolated from *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**(3): 735-739
- Pratt, D.E. and B.J.F. Hudson. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially. In *Food Antioxidants*(Hudson, B.J.F., ed.), Elsevier., New York, pp.171-192
- Shetty, K. 1997. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics: Focus on Laminaceae. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **6**: 162-171
- Sidwell, C.G., H. Salwin, M. Benca and J.H. Mitchell Jr. 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**: 603-609
- Yamaguchi, N.H. and S.Z. Naito. 1984. Isolation of antioxidants from cacao bean husk and its application. *New Food Industry* **26**: 1
- Takizawa, T. 1996. Functions of cacao. Up-to-date Food Processing **31**(6): 48-51
- 中村 良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, 大澤俊彦. 1989. 食品機能化學. 三共出版, 東京, pp. 54-99