



Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂

김 범 근

식품기능성연구팀

I. 서론

Cocoa-derived food (카카오 분말, 초코렛, 코코아 관련 산물)은 *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae)로부터 얻어 발효, 로스트, 분쇄한 것들을 말한다. 전 세계 모든 곳에서 소비되고 있는 이 물질은 몇몇 페놀 성분 (phenolic acids, procyanidins, flavonoids)에 대한 항산화 및 항라디칼 성질을 갖고 있기 때문에 광범위하게 연구되고 있다(Wollgast & Anklam, 2000a). Cocoa phenolics는 항산화, 항라디칼, 항암 등의 성질을 갖고 있는 생물 활성 화합물 (bio-active compounds)로서 알려져 왔다 (Ren, Qiao, Wang, Zhu, & Zhang, 2003; Sanbongi et al., 1998; Wollgast & Anklam, 2000b). 또한, cariogenic bacteria (Osawa et al., 1990) 뿐만 아니라 food bacterial pathogen에 대해서도 cocoa phenolic이 항균성을 가지고 있다고 이미 보고된 바 있다. 항균활성은 세균 내 세포막을 통과하는 성질에 직접적으로 관련이 있다(Arlorio, Coisson, Turri, & Martelli, 2000; Osawa et al., 1990). 커피나 야채

등의 식품으로부터 나온 phenolics 뿐만 아니라 Cocoa phenolics의 생체 내 생물 활성 (*in vivo* bio-activity)에 대해서는 많은 연구가 되어 있다. 이러한 활성은 그들의 흡수 및 대사와 관련이 있다(Shahidi & Naczk, 2003). 1994년 EU(Europe Union)에서 조사한 바에 의하면, 국민 1인당 소비된 코코아/초코렛 및 초코렛 과자의 양이 적게는 1.3 kg/year (포르투갈), 많게는 8.8 kg/year (독일) 정도 되었다고 한다. 초코렛 (특히 짙은 초코렛)은 일반적인 phenolic antioxidant로서 널리 사용된다. Flavonol외에 식품으로서 polyphenol의 생체적합성에 대해서는 그다지 연구가 되어 있지 않다. 최근에 독일의 식이요법 (다섯가지 flavonol과 flavonon에 기초)에 의하면 flavonoid의 섭취가 23 mg/day라고 한다. 이 평가에 catechin과 proanthocyanidins은 포함되지 않는다. 어쨌든, flavonol의 생체적합성 (모든 phenolic을 포함하여)에 대해서는 여전히 논란의 여지가 되고 있다. 예를들어, 섭취되는 초코렛과 카카오의 양 중에서 catechin은, plasma 내에서 unbound form 혹은 소변을 통해서 약 0.5% 정도

밖에 회수되지 않는다 (Wollgast & Anklam, 2000b).

Cacao (*T. Cacao* L.)의 phenolic compound는 다양한 종류가 있는데, catechins, epicatechins, anthocyanins, pro-anthocyanidins, phenolic acids, condensed tannins, other flavonoids 그리고 여러 부수적인 compounds (Sanchez-Rabaneda et al., 2003; Wollgast & Anklam, 2000a) 등이 그것들이다.

(-)Epicatechin은 양적으로 볼 때 cocoa phenolics의 주요 화합물을 차지한다 (발효되지 않은 Forastero cocoa bean의 경우 약 35%의 polyphenol 함유). 잘 발효된 건조 cocoa bean의 총 soluble phenolics는 2-6%이며, 지리적 기원 뿐만 아니라 다양성에 의존도가 높다. Forastero typical content는 약 6% Criollo cacao 내의 soluble phenolic 함량은 Forastero의 2/3 정도 된다. 함량이 많은 경우 발효가 잘 되지 않았다는 것을 뜻한다. 발효 과정시 cocoa nibs (빵은 코코아 열매)의 phenolic 함량에 약간의 변화가 수반된다. Soluble phenolic 함량의 총 함량이 크게 감소하는 경우도 있으며, 몇몇 constituent의 polymerization이 일어난다 (Shahihi & Naczka, 2003). 초콜릿 내에 존재하는 저분자량 polyphenol은 약간 쓰지만 신선한 맛의 원인이 된다. 몇몇 polyphenolic compounds는, 물론 분자적으로 다른 부류에 들어가지도 하나 (주로 Maillard 반응에 관여하는 단백질과 환원당), colour development에 포함되어 발효과정 및 roasting 과정에 작용한다. “Cocoa red”는 전형적인 pigment colour인 “good fermented cocoa beans”의 common name이며, 다양한 자연적 미생물 발효에 의해서 생성된다. 따라서, roasting 과정은 cacao nib colour의 변화를 수반한다.

Cocoa의 항산화 성질은 지난 수년간 연구되어 왔는데, 항산화 중의 화학적 동정 (chemical characterization) (HPLC, HPLC-MS) (Adamson et al., 1999),

DPPH[·] 및 ABTS^{·+}와 같은 라디칼을 제거하는 역할을 연구하기 위한 시험관 내 화학적 연구 (*in vitro* chemical studies) (Hatano et al., 2002), 시험관 내 생물학적 연구 (*in vitro* biological studies) 및 nutrigenomic에 기초한 연구가(bioavailability, *in vivo* interaction with cellular/molecular species) 이루어졌다(Motohashi et al., 1999). Cocoa의 생물활성적 (bio-active) 특성은 Maillard 반응으로부터 나온 compounds (비효소적 brown pigments)이외에도 phenol 함량과 많은 관련이 있다.

Cocoa hull은 cocoa 산업을 통해서 나오는 주요 부산물로, theobromine, caffeine 그리고 cocoa lipids의 2차적 공급원으로 이용된다(그들의 높은 산도 및 높은 unsaponifiable content로 인해서 cocoa butter로는 생각되지 않는다). Cocoa hull은 cocoa bean의 일부분으로서, *T. cacao*의 pre-roasting 과정 혹은 roasting 과정 후, 싹이 틈과 동시에 cotyledons로부터 분리된다(de-hulling/de-husking 과정).

T. cacao husk 및 hull에 관해서는 몇몇 연구가 되어 있다(Martin-Cabrejas, Valiente, Esteban, Molla, & Waldron, 1994). 최근에, pectin 함량이 많다는 이유로 인해, 이 부산물의 이용이 제기되어 왔다(Arlorio, Coisson, Restani, & Martelli, 2001). 초임계 이산화탄소 방법은 유기용매를 이용하지 않고도 추출 정제가 가능한 방법이다. 향기 성분 뿐만 아니라 cocoa nibs theobromine, 지질 등을 추출하기 위해 초임계 이산화탄소를 사용하여 왔다. 하지만 phenol 화합물 추출 시 초임계 이산화탄소를 이용하는 데는 연구가 미비한 상태이다. 빈혈 (ischemia)에 의해 발생한 neuronal degeneration을 통하여 phenolic bio-active molecule의 *in vitro* 활성을 확인할 수 있다. 실제로, dopamine은 빈혈에 큰 효과가 있다. 손상된 세포에 의해서 분비된 dopamine은 효소적 혹은 비효소 계에 의해서 산

화될 수 있다. 두 반응 모두 자유라디칼을 생성한다. 부가적으로, 분비된 dopamine은 glutamate 분비를 유도한다. 또한 glutamate는 자유라디칼류의 2차적 발생의 원인이 될 수 있다. 항산화 활성을 가진 bio-active molecule (vitamine E)뿐 아니라 약물(cabergoline, 맥각증 관련 화합물, a dopamine D2 receptor 작동물질)도 *in vitro*에서 항산화 활성을 가진 모델로 사용가능하다. 이러한 *in vitro* approach는 항산화 활성을 갖는 물질류를 평가하는데 유용한 방법이 된다.

본 연구의 목표는 (1) 이산화탄소를 이용한 초임계 용매 추출 (Supercritical Fluid Extration, SFE)을 적용하여 cocoa hull로부터 다양한 phenol 물질을 추출하고, (2) HPLC로 그들의 조성을 동정하며, (3) cellular ischemia를 이용한 *in vitro* model을 사용하여 항산화 효과 등을 밝히는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. Samples and chemical analyses

T. cacao L. (Sterculiaceae) hull은 Ferrero SpA (Alba, Italy)로부터 공급받았다. Cocoa hull은 분쇄하여 sieving한 후 분석하고, 바로 화학적 분석 및 *in vitro* 실험에 사용되었다. 화학적 분석으로는 총질소함량, 단백질 %, 지방 함량, 총 식이 섬유, 총 phenol 함량, 재, 수분 등이 포함되었다. 이러한 분석 방법 및 과정은 Arlorio et al., (2001)의 방법을 참고로 하였다.

2. SFE conditions

시험재작용 초임계장치를 사용하였다. 50 g의 cocoa hull로부터 추출 조건 및 각기 다른 용매를 사용하여 phenol (C1-C5)을 추출한 방법은 Table 2에 나타내었다. 초임계 추출 시 유기물질은 사용하지 않았다. 이산화탄소 추출 후 추출물을 녹이기 위해 사용된 유기용매도 Table 2에 나타내었다.

3. Antiradical/antioxiant activity

항라디칼/항산화 성질은 DPPH· 라디칼의 제거를 통해 평가하였다 (Brand-Williams, Cuvelier, and Berset, 1995). 항산화 성질은 IP (inhibition percent; %)를 통해서 표현되었다. DPPH 라디칼의 IP 계산 방법은 다음과 같다.

$$\frac{Absorbance_{t=0min} - Absorbance_{t=15min}}{Absorbance_{t=0min}} \times 100$$

4. HPLC analysis

Shimadzu Class VP 5 HPLC system을 이용하여 추출물들을 분석하였다.

5. Biological activity test

15일간 retinoic acid를 이용하여 neuronalphenotype으로 분화시킨 Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)를 이용하여, 산소 및 당을 주지 않은 채로 5시간 동안 ischemic damage에 노출 (oxygen glucose deprivation-OGD-phase)시킨 후 20시간동안 재산화시켰다. 모든 추출물들은 진공상태 (RVC 2-18-Christ, GMBH)에서 증발시킨 후 고순도 에탄올 (1 ul/ml) 500 ul에 다시 녹였다. 여과시킨 후 (0.45 um syringe filter) 1000배 희석하여 culture buffer (glucose-free, oxygen-glucose deprivation buffer: NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, HEPES 5.0 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, CaCl₂ 2.3 mM, pH7.4, 95% N₂, 5% CO₂)를 이용하여 2시간 bubbling 후 사용)로서 제조하였다. 에탄올은 buffer로 희석하여 positive-negative control로 사용될 뿐 모든 실험에서 효과를 나타내지는 않았다.

모든 OGD phase 동안에 모든 세포는 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 Cocoa hull 추출물

(C1-C5)에 노출시켰으며, 표준물질은 전 연구의 것과 동일 (α -tocopherol: 50 μ M; cabergoline: 10 μ M)하였다. Cocoa hull 추출물과 세포간의 접촉은 reoxygenation phase를 통해서 유지하였다.

Cellular vitality (viable cell의 %로 표현)는 MTT 방법을 이용하여 재산화 과정 후에 측정하였다 (Mosmann 1983).

III. 결과

Cocoa hull 내의 대략적인 조성은 Table 1과 같다. 위에서 언급한 바와 같이, hull의 주 구성 물질은 섬유질 (수불용성 섬유)이고, 이 외에 높은 메틸도 (methylation degree)를 갖는 pectin도 함유되어 있다. Folin Ciocalteu 방법에 의해 평균 1.8%의 phenol 화합물이 포함되어 있다는 것을 확인하였다(Arlorio et al., 2001).

Table 1
Proximate composition of cocoa hulls (g kg⁻¹ \pm SD, dry weight)

| | Composition |
|---|-----------------|
| Fat | 68.1 \pm 2.5 |
| Nitrogen | 29.0 \pm 1.3 |
| Proteins (N \times 6.25) | 181.2 \pm 8.1 |
| Ashes | 81 \pm 3.9 |
| Fiber | 606 \pm 6.4 |
| Phenolics (Folin-Ciocalteu's method) | 18.2 \pm 8.4 |
| Phytic acid (spectrophotometric method) | 5.9 \pm 0.6 |
| Moisture | 101.2 \pm 6.0 |
| Theobromine (HPLC) | 12.9 \pm 1.8 |

Cocoa hull로부터 추출한 'whole' phenol의 항산화 활성은, Soxhlet 방법으로 얻은 methanol을 이용하여 DPPH[·] 법을 통하여 확인하였다. Cocoa hull 내 phenolic pigment의 methanol 추출물에 대한 제거 성질 (scavenging property)은 Table 2에 나타내었다. Cocoa hull로부터 메탄올 추출물(메탄올에 500배 희석)은 BHA (butyl-hydroxy-anisole) 10⁻⁵M의 것과 비슷하게 inhibition percent (IP%)를 나타내었다. 최고 라디칼 제거 활성은 500배 희석한 Cocoa bean을 발효하여 얻은 메탄올 추출물에 의해서 확인하였다.

Table 2
Antiradical activity measured with DPPH[·] method (IP%)

| Samples and reference antioxidants | IP (%) |
|--|--------|
| Trolox (10 ⁻³ M) | 97.90 |
| Caffeic acid (10 ⁻³ M) | 97.70 |
| BHA (10 ⁻⁵ M) | 54.08 |
| Cocoa bean (methanolic extract, Arriba) 1:500 | 85.58 |
| Cocoa bean (methanolic extract, Ivory Coast) 1:500 | 80.14 |
| Cocoa bean (methanolic extract, Ghana) 1:500 | 96.55 |
| Cocoa hulls (methanolic extract) 1:500 | 66.06 |
| C1 (SFE Conditions: CO ₂ 100 bar, 50 °C) (dissolved in methanol) | 33.33 |
| C2 (SFE Conditions: CO ₂ 150 bar, 50 °C) (dissolved in methanol) | 71.71 |
| C3 (SFE Conditions: CO ₂ 150 bar, 50 °C) (dissolved in acetone) | 40.40 |
| C4 (SFE Conditions: CO ₂ 200 bar, 50 °C) (dissolved in methanol) | 69.60 |
| C5 (SFE Conditions: CO ₂ 200 bar, 50 °C) (dissolved in acetone) dil. 1:200 | 2.50 |

Methanolic hull 추출물의 phenol 화합물은 이전 연구를 통해 결정하였다 (Azizah, Nik Ruslawati, & Swee Tee, 1999; Coisson et al., 2003). Hull의 메탄올 추출물을 통해 확인된 모든 phenol 화합물은 항산화 혹은 항라디칼 분자로서 판단된다. 이러한 사실은 *in vitro* 연구를 통해서 강조된 Cocoa hull 추출물의 모든 활성을 확인하는 결과이다. Hull에 함유되어 있는 주요 구성 물질은 epicatechin과 p-hydroxybenzoic acid (각각 2753, 2252ppm)이다. HPLC를 통해서 알려지지 않은 미량성분을 존재를 확인하였다. 우리는 anthocyanins 및 proanthocyanidins가 존재한다고 보고 있다. 또한 이러한 화합물들은 *in vitro*에서 강한 항산화역할을 하는 것으로 보고되었다 (Adamson et al., 1999). 각각의 phenol 추출물들의 HPLC-MS를 통한 동정 등 부가 연구가 수행되고 있다.

초임계 이산화탄소를 통한 추출을 통해서 지질로 인한 약간의 오염 발생을 확인하였다. 이와 같이 추출되는 것을 방지하기 위해 추출 조건의 최적화가 기본적으로 필요하다. 그럼에도 불구하고, hull로부터 지방이 같이 추출되는 것을 피하기 위해서 예전 연구에 사용된 추출방법을 사용할 수 있다. 이러한 점을 감안하여, 이러한 topic에 대해 발표되었던 연구결과들을 고려하여 예전의 변

수들 (100, 150, 200bar에서 50°C)을 선택하였다 (Li & Hartland, 1992; Li & Hartland, 1996; Rossi, Arnoldi, Savioni, & Schiraldi, 1989; Saldana, Mohamed, & Mazzafera, 2002; Saldana, Zetzl, Mohamed, & Brunner, 2002). 초임계이산화탄소에 의한 phenol 추출물을 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다. 우리들의 예상과는 달리 flavonoid 뿐만 아니라 모든 phenolic acid가 존재하는 것은 아니었다. 단지 caffeine을 비롯한 여러 peak만이 발견되었다. Caffeine 농도는 0.014-0.031 mg/ml (C1: 0.014 mg/ml, C2: 0.031 mg/ml, C4: 0.015 mg/ml). 초임계 이산화탄소를 통해 추출된 추출물의 항산화-항라디칼 활성을 평가하기 위해, 재료 및 결과에서 언급한 바와 같이, ischemic damage의 방어를 평가하는데 최적화된 *in vitro* model 계를 이용하였다. 이러한 실험 결과, 이산화탄소에 의해 추출 후 아세톤에 재용해시킨 C3 및 C5 (150bar, 200bar)가 강한 생물학적 활성을 나타내었다. Caffeine 함량이 많은 C1, C2 및 C4의 경우는 생물학적 활성을 나타내지 않고, ischemia damage를 촉진시켰다 (Fig. 1). 실제로, caffeine이 없는 C3 및 C5만이 ischemic damage에 대해 방어효과를 나타내었으며, 이들의 효과는 cabergoline (10um) 및 vitamin E (50um)의 그것과 비슷하였다.

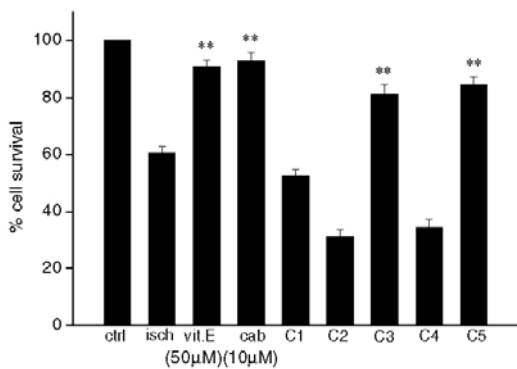


Fig. 1. Effect of protection from ischemic oxidative damage with cocoa hulls extract and some reference antioxidants (** $P \leq 0.01$). Legend: ctrl: control cells; isch: ischemic cells; Vit. E: α -tocopherol; Cab: cabergoline; C1 C5: fractionated pigment extracts.

Procyanidin과 같은 oligomeric polyphenol 역시 damage protection에 기여한다. 최근에 기술된 바에 의하면 (Hatano et al., 2002), cacao의 pro-anthocyanidin glycosides의 경우, (1) microsome 내 NADP 의존적 lipid peroxidation (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation) 및 (2) linoleic acid의 자연산화에 대한 저해효과가 있다고 한다. 이러한 효과는 peroxidation 연쇄 반응에서 나타나는 높은 라디칼 제거 활성에 기인한다. 다른 가설로는 강한 항산화제인 clovanide의 존재를 들 수 있다. 다른 빈혈 (ischemic) 뿐만 아니라 발작 등에 대한 caffeine의 방어기작에 관해서 보고된다 하더라도, 본 연구를 통해서 얻은 결과에 의하면 hull로부터 추출된 unknown 물질들의 방어기작도 무시할 수 없다고 판단된다.

예전의 메탄올로 추출한 Cocoa hull의 사용을 통해 본 결과를 통해서 이러한 추출물들은 '유기용매를 사용하지 않는' 중요한 항산화물질로서 식품에 적용가능하다 (dietary, nutraceutical, flavouring)는 결론을 내렸다. C3 및 C5 등의 방어적 활성 등은 빈혈과정 (ischemic process) 등과 같이 산화적 손상을 연구하는데 중요한 결과로서 많은 관심의 대상이 될 것이 분명하다. 이러한 이유로 인해, HPLC-MS 등을 이용하여 항산화 역할을 가진 다른 미량의 phenol류 물질들 (pro-anthocyanidins 및 free phenols 등)을 확인/제거할 계획이다.

결론적으로, phenol 함량이 많은 Cocoa hull 추출물은 특유의 색깔과 기능을 가진 매우 관심있는 bio-active compounds라고 할 수 있다.

IV. 결론

초임계 이산화탄소 추출법은 bio-active한 항산화 및 항라디칼 성질을 갖는 cocoa hull로부터 pigmented phenolic fraction을 얻을 수 있는 매우 유용한 방법이다. 이러한 phenolic들의 항산화 활

성을 평가하는데 *in vitro* 방법을 이용하여 최적화하였다. SH-SY5Y cell을 이용하여 *in vitro* 평가를 수행한 결과 OGD damage에 방어효과가 있다고 평가되었다.

식품 산업에 있어서 functional colorant ingredient 혹은 향산화 복합체 추출 등으로 안전하게 이용되기 위한 phenolic pigments의 생물활성 동정이 무엇보다도 더욱 중요한 일이라고 본다.

V. 참고문헌

1. Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., et al. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4184 - 4188.
2. Arlorio, M., Coisson, J. D., Restani, P., & Martelli, A. (2001). Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls. *Journal of Food Science*, 66, 653 - 656.
3. Arlorio, M., Coisson, J. D., Turri, A., & Martelli, A. (2000). Effetto anti-batterico di estratti fenolici in *Theobroma cacao*. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, 30(suppl 3), 251 - 260.
4. Aronowski, J., Strong, R., Shirzadi, A., & Grotta, J. C. (2003). Ethanol plus caffeine (caffeinol) for treatment of ischemic stroke: preclinical experience. *Stroke*, 34(5), 1246 - 1251.
5. Azizah, A. H., Nik Ruslawati, N. M., & Swee Tee, T. (1999). Extraction and characterization of antioxidant from cocoa byproducts. *Food Chemistry*, 64, 199 - 202.
6. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28, 25 - 30.
7. Coisson, J. D., Capasso, M., Travaglia, F., Piana, G., Arlorio, M. & Martelli, A., (2003). Proprieta' antiossidanti di estratti fenolici da sottoprodotti di lavorazione di cacao e nocciola. In *Proceedings of 5th National Congress of Food Chemistry* (pp. 154 - 158). Parma, Morgan Edizioni tecniche, Milano.
8. Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., et al. (2002). Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, 59, 749 - 758.
9. Li, S., & Hartland, S. (1992). Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xantines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 5, 7 - 12.
10. Li, S., & Hartland, S. (1996). A new industrial process for extracting cocoa butter and xantines with supercritical carbon dioxide. *JAOCS*, 73, 423 - 429.
11. Martin-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Molla, E., & Waldron, K. (1994). Cocoa hull: a potential source of dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 307 - 311.
12. Miglio, G., Varsaldi, F., Francioli, E., Battaglia, A., Canonico, P. L., & Lombardi, G. (2004). Cabergoline protects SH-SY5Y neuronal cells in an *in vitro* model of

- ischemia. *European Journal of Pharmacology*, 489, 157 - 165.
13. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55 - 63.
 14. Motohashi, N., Kawase, M., Kurihara, T., Shirataki, Y., Kamata, K., Nakashima, H., et al. (1999). Relationship between radical intensity and biological activity of cacao husks extracts. *Anticancer Research*, 19, 1125 - 1130.
 15. Osawa, K., Matsumoto, T., Maruyama, T., Naito, Y., Okuda, K., & Takazoe, I. (1990). Inhibitory effects of aqueous extract of cacao bean husk on collagenase of *Bacteroides gingivalis*. *Bulletin of Tokyo dental college*, 31, 125 - 128.
 16. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medical Research Review*, 23, 519 - 534.
 17. Rossi, M., Arnoldi, C., Savioni, G., & Schiraldi, A. (1989). Characterization of cocoa extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Italian Journal of Food Science*, 3, 41 - 50.
 18. Saldaña, M. D. A., Mohamed, R. S., & Mazzafera, P. (2002). Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane. *Fluid Phase Equilibria*, 194 - 97, 885 - 894.
 19. Saldaña, M. D. A., Zetzel, C., Mohamed, R. S., & Brunner, G. (2002). Extraction of methylxanthines from guarana' seeds, mate' leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4820 - 4826.
 20. Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998). Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 454 - 457.
 21. Sánchez-Rabaneda, F., Ja'uregui, O., Casals, I., Andre's-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuel Ravento' s, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35 - 42.
 22. Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
 23. Wollgast, J., & Anklam, E. (2000a). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423 - 447.
 24. Wollgast, J., & Anklam, E. (2000b). Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33, 449 - 459.
- <출처 : *Food Research International*, 38, 1009-1014, 2005>