

## Cacao Bean Husk 추출물의 Glucosyltransferase 저해효과

권익부 · 이용우 · 안봉전 · 이신영\*  
롯데그룹중앙연구소 생물과학연구팀, \*강원대학교 발효공학과

### Inhibitory Effect of Cacao Bean Husk Extract on Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* B13

IK-Boo Kwon, Yong-Woo Lee, Bong-Jeon An and Shin-Young Lee\*

Dept. of Biotechnology, Lotte R & D Center

\*Dept. of Fermentation Engineering, Kangweon National University

#### ABSTRACT

The inhibitory effect of cacao bean husk(CBH) extract on glucosyltransferase(GTase) from *Streptococcus mutans* B13 was investigated.

Water soluble extract from CBH showed a strong inhibitory effect(88-89%) on GTase from *Streptococcus mutans* B13. GTase inhibitors from sequential extraction by hot water or water-methanol had the strongest inhibition. The effect was not influenced by sources, fermentation, types of solvents and fumigation processes. These active compounds proved to be polyphenols through acid hydrolytic analysis of the precipitates by ammonium sulfate or ethanol and proteinase K. It was also confirmed by additional column chromatography of Sephadex G-50, Sephadex LH-20 and DEAE-Sephadex A-50.

#### 서 론

치아우식증(충치)은 현재 전세계적으로 가장 널리 만연되고 있는 문화병의 하나로 국내의 경우도 점차 그 이환율이 높아지고 있는 실정이다.

따라서 최근 10년동안 충치 발생기작에 대한 기초적인 연구와 함께 충치예방의 측면에서 매우 활발한 연구가 이루어졌다. 특히, 치면 세균막 형성저해제 즉, *Streptococcus mutans*의 glucosyltransferase(GTase) 활성 저해제가 가장 유효한 충치예방수단으로 인정되어 이의 탐색 및 개발에 대한 각종의 연구가 진행되어 왔다(1, 3).

이러한 충치예방물질의 탐색연구는 미생물이나 각종 화합물 등에서 뿐만 아니라 녹차류나 한방재 등의 각종 천연물을 대상으로 하여 새로운 탐색, 개발

이 계속되고 있는데, 이들에 함유되어 있는 polyphen-이류 등은 각종 생리활성을 나타내는 것을 알려지고 있다(4, 5)

Cacao bean은 *Byttneriaceae*과에 속하는 다년생 식물인 cacao(*Theobroma cacao* L.)나무의 과실속에 펄프질로 싸여있는 종자로서 현재 세계적으로 널리 애용되고 있는 초코렛의 주원료인 cocoa mass 및 butter를 함유하고 있다(6). 이 종자는 형태학적으로 외피, 내피 배유 및 배아 등으로 구성되어 있는데, 이중 cacao bean husk(CBH)는 초코렛 생산과정 중 탈각되어 중량비 약 15%의 부산물로 생성되어 폐기되고 있다. 현재 cacao bean의 전세계적인 총 생산량은 약 250만톤으로 40만톤에 달하는 엄청난 양의 CBH가 얻어지고 있으며, 국내의 경우도 약 600만톤이 폐기물화되고 있는 실정이다(7).

이들 CBH의 화학적 성분분석은 미미하나 다당류, 단백질 및 phenolics 등의 유효성분이 풍부하여 CBH의 재활용 및 폐자원 이용의 측면에서 재검토의 필요성이 높다. 특히, 각종 생리활성을 나타내는 phenol류 등을 다량 함유하여 생리활성물질 탐색의 소재로서도 충분한 가치가 있으나 이에 대한 연구는 보고된 바 없다.

그러므로 본 연구에서는 이들 CBH로부터 천연 생리활성물질의 탐색연구 일환으로 CBH추출물의 GTase 저해효과를 탐색하였고, 저해작용의 요인성분을 분획, 정제하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구의 재료는 초콜렛 제조과정중 탈각되어 부산물로 생산되는 카카오콩의 외피(cacao bean husk 또는 shell, CBH)이다. CBH는 가나산 및 말레이시아산의 생 및 훈증 또는 발효처리된 cacao bean (*Theobroma cacao* L.)으로부터 얻었고, 100mesh로 분쇄하여 4°C의 저온실에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### CBH 추출물의 조제

CBH 분말 50g에 증류수 또는 water:methanol (50:50, v/v) 1ℓ를 넣고 약 100°C의 열수로 1시간 동안 1~2회 추출하였으며, 원심분리(300g, 20min)한 후 그 상층액을 냉동건조기(Labconco 75040, USA)로 건조하여 추출물 시료로 하였다. (Table 1).

Table 1 Preparation of cacao bean husk extract

Group	Source	Treatment	Extraction times	Solvent	Filtration
I	Malaysia	Raw	2	Water	No
II	Malaysia	Raw	2	Water	Yes
III	Ghana	Raw	1	Water	Yes
IV	Ghana	Fumigation	2	Water	No
		Fermentation	2	Water	No
		Raw	2	Water:	No
				methanol (50:50, v/v)	

### CBH 추출물의 침전 및 가수분해 처리

CBH 추출물의 침전 처리는 4°C의 70% 포화 ammonium sulfate 용액 및 -20°C 이하로 냉각시킨 absolute ethanol을 첨가한 후 각각 30 및 60분간 방치하였으며, 10000g에서 10분간 원심분리한 다음 침전물을 냉동건조하여 침전물 시료로 하였다.

한편, ethanol 분획물은 6N HCl로 완전 가수분해하거나 proteinase(200mg/ml in 0.01M Tris buffer, pH 7.8, Sigma co. 제)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시켜 가수분해 시료로 하였다.

### Glucosyltransferase 저해물질의 분획

CBH 추출물로부터 glucosyltransferase(GTase)에 대한 저해물질의 분획의 Sephadex G-50 column(1.5×20cm), Sephadex LH-20 column(2.5×50cm) 및 DEAE-Sephadex A-50 column(2.5×120cm)을 사용한 column chromatography에 의하여 행하였다.

앞의 두 경우는 증류수로 유출(flow rate:1.0ml/min.)시킨 후 분획하였고, 뒤의 경우는 0-1.0M의 NaCl농도 범위에서 linear gradient로 1.2ml/min.의 속도로 유출시킨 다음 8ml씩 분획하였다.

### GTase의 활성 및 저해를 측정

GTase의 활성은 sucrose를 기질로 하여 생성된 불용성 glucan을 분광광도법으로 측정하는 遠藤 등(8)의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 측정하였다. 즉, 시험관에 기질용액 및 GTase를 첨가하여 최종 용량이 1ml가 되도록 조정하였다.

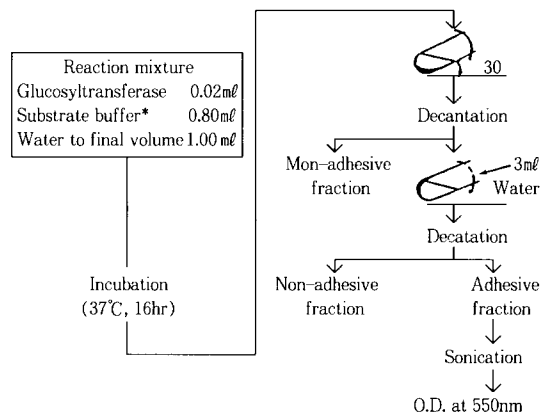


Fig 1. Assay for glucosyltransferase activity. Sucrose 12.5g, sodium azide 0.25g in 1ℓ 0.0625M potassium phosphate buffer(pH 6.5).

시험관을 수평에 대해 약 30°의 각도로 기울인 상태에서 3회 회전하고 세척한 다음, 앞에서와 같은 방법으로 상층액을 제거하였으며, 다시 3ml의 증류수를 가하고 초음파처리(Ultrasonic Generator US-300, Nissei)에 의해 glucan을 분산시켰다. 분산직후 분광광도계(UV-VIS spectrophotometer UV-260, Shimadzu)로 550nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 저해활성은 대조구의 물대신에 CBH추출물 또는 이의 침전 및 가수분해물을 0.1ml 넣어 최종 용량이 1ml가 되도록 조정하고, 흡광도를 측정 후 다음식에 따라 %저해율로써 구하였다.

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

여기서 A는 대조구에서 형성된 부착성 glucan의 OD<sub>550</sub>값이고, B는 CBH 추출물 첨가구에서 형성된 부착성이 불용성 glucan의 OD<sub>550</sub>값이다.

이때 사용한 기질용액은 sucrose 12.5g, sodium azide 0.25g을 1ℓ의 0.0625 M potassium phosphate buffer(pH6.5)에 혼합하여 조제하였으며, GTase는 *Streptococcus mutans* B13(d형)유래의 것으로 일본 합동주정에서 입수한 원액의 15배 희석액을 실험에 사용하였다.

#### CBH 추출물의 물리화학적 특성 조사

CBH 추출물의 UV흡수스펙트럼 조사는 시료 분말 5g에 butanol 또는 water:methanol(50:50, v/v) 50ml를 첨가하고, 2시간동안 저어주면서 추출한 후 원심분리(3000g, 30min.)한 다음, 이 과정을 2회 반복하여 얻은 상층액을 UV-Vis spectrophotometer로 200~400nm에서 scanning하여 실시하였다.

pH에 따른 용해도는 potassium phosphate 용액에 CBH분말을 첨가하고 산 또는 알칼리로 pH를 2-12의 범위로 조절한 다음, 2시간 동안 shaking한 후 원심분리(3000g 30min.)하였다. 이와같은 조작을 3회 반복한 후 그 상층액을 모아 Lowry법(9)에 의해 반응시킨 다음, 750nm에서의 흡광도를 측정하였다.

#### GTase 활성저해 분획물의 성분분석

활성 분획물의 carbohydrate류 정성실험은 Molish, Seliwanoff법 및 Bial법에 의하였다(10). 또, carbohydrate성분에 대한 HPLC분석은  $\mu$ -Bondapak carbohydrate column(35~75  $\mu$ m, Waters Associate Inc., USA)을 사용하여 행하였고, 80% acetonitrile을 전개용매로 사용하였다.

한편, polyphenol류의 정성실험은 FeCl<sub>3</sub> 및 anisaldehyde 등 시약과의 발색반응에 의하여 관찰하였고(11), polyphenol의 정량은 Folin들의 방법(12)에 의해 각종 tannic acid를 표준물질로 하여 측정하였다. Polyphenol 성분에 대한 HPLC분석은 PICO-TAG C<sub>18</sub> column(4×250mm)를 사용하였고, water:methanol(50:50, v/v)을 전개용매로 하여 gradient system으로 분석하였다(13).

## 결과 및 고찰

#### CBH 추출물의 GTase활성 저해효과의 검토

가나산 CBH의 열수 추출물에 대해서 농도변화에 따른 GTase활성 저해효과를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

CBH농도 0.1mg/ml 이하에서는 거의 GTase저해능을 보이지 않았으나 이 이상의 농도에서는 GTase의 활성이 급격히 저하되어 0.1mg/ml 이상의 농도에 이르러 거의 완전히 저해되었다.

한편, 산지 및 추출방법이 다른 각 시료 CBH추출물의 GTase활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

Group I (말레이지아산)과 Group IV(가나산)의 경우 산지에 따른 차이없이 모두 0.1mg/ml의 농도에서 약 90%의 GTase활성 저해효과를 나타내었으며 통계적으로 유의하였다.

또, 추출횟수별 GTase활성 저해효과는 열수로 1회 추출한 경우(Table 2, Group III)와 2회 반복 추출한 경우(Table 2, Group IV)에서 볼 수 있는 바

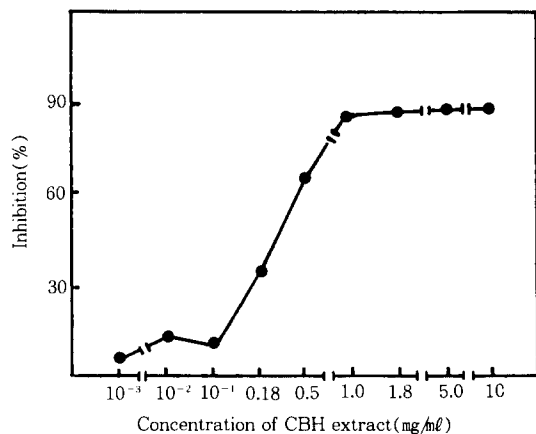


Fig. 2. Effect of various concentrations of cacao bean husk (CBH) extract on glucosyltransferase activity.

**Table 2. Effect of various concentration of cacao bean husk extract on glucosyltransferase activity.**

Group I <sup>a</sup>		
Concentration of CBH <sup>b</sup> extract (mg/ml)	Glucosyltransferase activity	Inhibition (%)
0	1.261 ± 0.108	—
1.0 × 10 <sup>-6</sup>	1.168 ± 0.002	7
1.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.149 ± 0.051	9
1.0 × 10 <sup>-4</sup>	1.154 ± 0.129	8
1.0 × 10 <sup>-3</sup>	1.184 ± 0.082	6
1.0 × 10 <sup>-2</sup>	1.164 ± 0.036	8
1.0 × 10 <sup>-1</sup>	1.215 ± 0.170	5
1.0	0.060 ± 0.033	95*

\* P<0.001

Group II <sup>b</sup>		
Concentration of CBH <sup>b</sup> extract (mg/ml)	Glucosyltransferase activity	Inhibition (%)
0	0.751 ± 0.087	—
1.0 × 10 <sup>-2</sup>	0.668 ± 0.055	11
1.0 × 10 <sup>-1</sup>	0.839 ± 0.009	—
1.0	0.070 ± 0.036	91*

\* P<0.001

Group III <sup>a</sup>		
Concentration of CBH <sup>b</sup> extract (mg/ml)	Glucosyltransferase activity	Inhibition (%)
0	0.889 ± 0.103	—
1.0 × 10 <sup>-5</sup>	0.834 ± 0.101	6
1.0 × 10 <sup>-4</sup>	0.825 ± 0.063	7
1.0 × 10 <sup>-3</sup>	0.820 ± 0.030	8
1.0 × 10 <sup>-2</sup>	0.860 ± 0.033	3
1.0 × 10 <sup>-1</sup>	0.800 ± 0.016	10
1.0	0.713 ± 0.151	20
10	0.243 ± 0.006	73*

\* P<0.001

Group IV <sup>a</sup>		
Concentration of CBH <sup>b</sup> extract(mg/ml)	Glucosyltransferase activity	Inhibition (%)
0	0.926 ± 0.084	—
1.0 × 10 <sup>-4</sup>	0.899 ± 0.022	3
1.0 × 10 <sup>-3</sup>	0.913 ± 0.031	1
1.0 × 10 <sup>-2</sup>	0.820 ± 0.025	11
1.0 × 10 <sup>-1</sup>	0.840 ± 0.024	9
1.0	0.123 ± 0.029	87*

\*P<0.001

<sup>a</sup> For illustration of groups, see Table 1

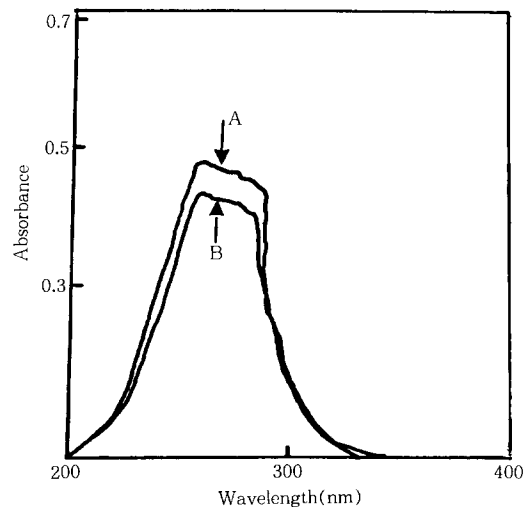
<sup>b</sup> CBH: Cacao Bean Husk

와 같이 2회 반복 추출한 경우가 1회 추출한 경우보다 약 10배 이상의 GTase 활성 저해효과를 나타내었다. 그러나 증류수와 증류수:methanol(50:50, v/v)의 2중 추출용매에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

열수로 2회 추출한 CBH 추출물을 여과하지 않은 경우(Table 2, Group I)와 여과한 경우(Table 2, Group II)도 모두 1.0mg/ml의 농도하에서 GTase 활성이 거의 완전히 저해(각각 95% 및 91%)되었고, 추출횟수율도 거의 비슷하여서 여과과정은 GTase 활성 저해효과와는 무관함을 보였고, 아울러, 훈증 및 발효처리된 시료의 추출물도 0.5mg/ml 이상의 농도에서 GTase의 활성이 완전히 저해됨을 보여 훈증처리 및 발효과정도 저해효과에는 영향을 미치지 않음을 보였다.

#### GTase 저해활성의 요인 성분 검토

CBH 추출물의 200~400nm에서의 최대 흡광도 분포를 조사한 결과는 Fig. 3에서와 같이 추출용매에 상관없이 240~280nm에서 최대값을 나타내었다. 이 파장범위의 값은 단백질, 핵산 및 polyphenol 등과 같은 일반적으로 분자구조내에 phenol ring을 함유한 물질들의 최대 흡광범위이며, 400nm 부근에서의 중합된 double spectrum은 나타내지 않아서 CBH 추출물의 유효성분은 거의 독성이 없는 물질일 것으로 생각되었다(14).



**Fig. 3. UV-spectrum of the extract from cacao bean husk.**

A: butanol extract

B: water extract

한편, CBH 추출물을 ammonium sulfate 및 ethanol로 처리한 후 그 침전물의 GTase 활성 저해효과를 조사한 결과는 Table 3과 같다(14).

**Table 3. Effect of ammonium sulfate and ethanol precipitate of cacao bean husk extract on glucosyltransferase activity**

	GTase activity	Inhibition(%)
Control	0.992 ± 0.082	—
Ammonium sulfate precipitate	0.017 ± 0.01	98*
Ethanol precipitate	0.084 ± 0.04	92*

\* P<0.01

The values are the mean of five determinations.

각 침전물은 92~98%의 매우 높은 GTase 활성의 저해능을 나타내어 단백질 성분이 GTase 활성 저해능을 나타내는 것으로 생각되었다. 그러나 위의 ethanol 침전물을 단백질 분해효소 및 산 가수분해 처리한 경우(Table 4), 가수분해처리구 모두 대조구와 거의 비슷한 GTase 활성의 저해능을 나타내었다. 또, pH2~12범위에서의 용해성을 조사한 결과에서도 Fig. 4와 같이 pH에 따른 용해도의 뚜렷한 경향이 없어 단백질에 의한 등전점 침전현상(15)을 관찰할 수 없었다. 그러므로 CBH 추출물내의 GTase 활성 저해물질은 비단백질 성분일 것으로 생각되었다.

**Table 4. Effect of proteinase K and acid-treated hydrolysate of ethanol precipitate of cacao bean husk extract on glucosyltransferase activity**

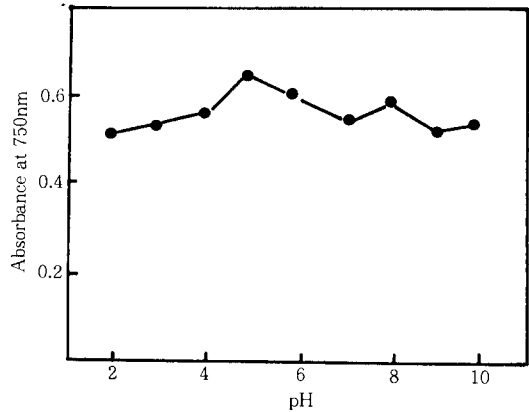
	GTase activity
Ethanol precipitate	0.084 ± 0.04
Proteinase K hydrolysate	0.079 ± 0.03
Acid hydrolysate	0.075 ± 0.02

The values are the mean of five determinations.

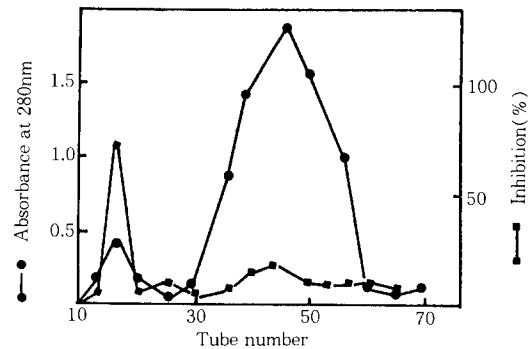
**GTase 활성 저해물질의 분획 및 동정**

CBH 추출물내의 GTase 활성 저해능을 갖는 생리활성 물질을 분리하기 위하여 Sephdex G-50, Sephdex LH-20 및 DEAE-Sephadex A-50 등에 의한 column chromatography를 실시하였다.

Fig. 5는 Sephdex G-50 column chromatogra-



**Fig. 4. Change of soluble protein in the supernatant of cacao bean husk at varying pHs.**



**Fig. 5. Fractionation of cacao bean husk extract by Sephadex G-50 column chromatography. Column: 1.5 × 20cm, flow rate: 1.0ml/min**

phy의 결과로 F-I (11-20 fractions) 및 F-II(35-55 fractions)에서 활성 분획물을 얻었다. 이를 다시 Sephdex LH-20 column chromatography법으로 분획하여 GTase 활성의 저해능이 우수한 분획물(11~20 fractions)을 pooling하였고(Fig. 6), 이 활성 분획물을 다시 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography하여 Fig. 7에서 보는 바와 같은 GTase 활성이 저해능을 갖는 분획물(1~20 fraction)을 얻었다.

이와 같이 분획제한 활성 분획물들이 GTase 활성에 미치는 영향을 결과는 Table 5와 같으며, 표에서 보는 바와 같이 각 분획 모두 현저한 GTase 활성의 저해효과를 나타내었으나 조추출물보다는 다소 낮은 값 범위이었다.

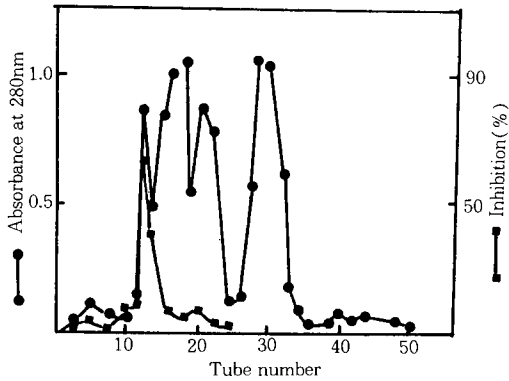


Fig. 6. Fractionation of cacao bean husk extract by Sephadex LH-20 column chromatography. Column:  $2.5 \times 50$ cm, flow rate:  $1.0\text{ml}/\text{min}$ , elution solvent: 60% MeOH

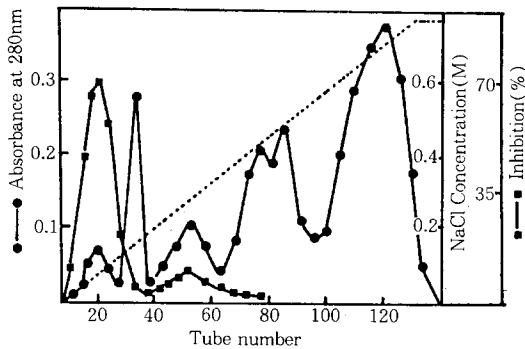


Fig. 7. Fractionation of cacao bean husk extract by DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. Column:  $2.5 \times 120$ cm, flow rate:  $1.2\text{ml}/\text{min}$ . Dotted line denotes the gradient elution of NaCl.

한편, 각 활성 분획물에 대한 carbohydrate류의 정색시험 결과에서는 Molish, Seliwanoff 및 Bial test 등 당류의 발색시험에서 음성이었다. 또, 각종 단당류 및 이당류를 표준시료로 하여 HPLC를 행한 결과에서도 Fig. 8과 같이 carbohydrate의 peak가 전혀 관찰되지 않아 GTase 활성의 저해능을 나타내는 물질중에는 carbohydrate가 존재하지 않는 것으로 생각되었다. 그러나 polyphenol류에 대한 정성 및 정량실험의 결과에서는 Table 6에서와 같이  $\text{FeCl}_3$  및 anisaldehyde 등과 양성반응을 나타내므로써 활성 분획물내에는 polyphenol 성분이 포함되어 있음을 확인할 수 있었고, 그 함량도 활성분획  $1\text{ml}$

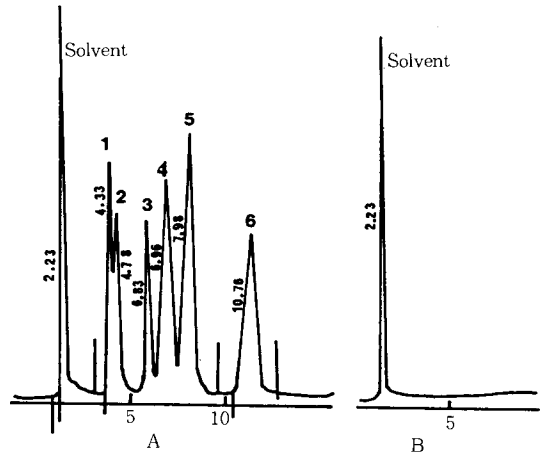


Fig. 8 HPLC chromatogram of partially purified active fraction of cacao bean husk extract.

A: Carbohydrate standards.

1. Fructose 2. Glucose 3. Sucrose  
4. Maltose 5. Lactose 6. Maltotriose

B. Active Fraction(F-1) isolated by Sephadex G-50 Column:  $\mu$ -Bondapak carbohydrate ( $2.9 \times 300$ mm, 35-75m)

Solvent: acetonitrile, Detector: RI.

Flow rate:  $1.8\text{ml}/\text{min}$ , Attenuation: 16x

Table 5. Effect of partially purified active fractions on glucosyltransferase activity.

Purification	GTase activity	Inhibition(%)
Control	$1.06 \pm 0.02$	—
Sephadex G-50 F-1 fraction	$0.15 \pm 0.01$	86*
Sephadex LH-20	$0.14 \pm 0.03$	87**
DEAE-Sephadex A-50	$0.29 \pm 0.01$	77*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

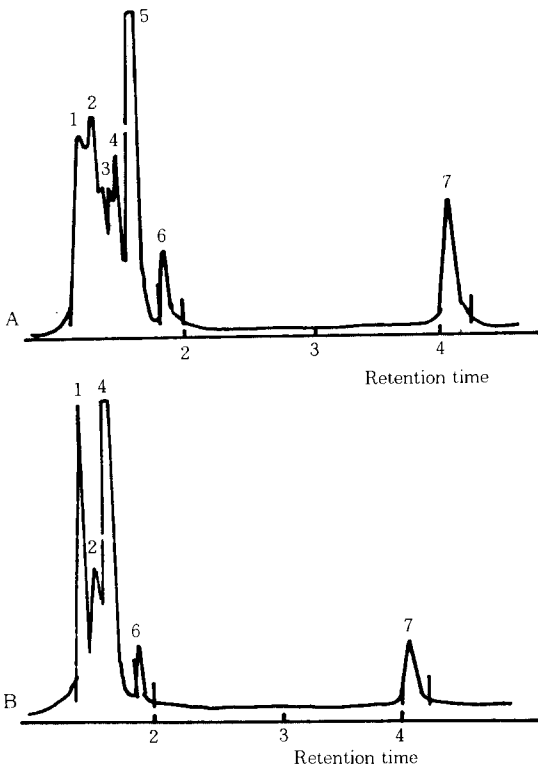
The values are the mean of five determinations.

당  $55 \sim 78\text{mg}$ 으로 다량의 polyphenol 성분을 함유함을 알 수 있었다.

Fig. 9는 위의 시료에 대하여 몇가지 polyphenol을 표준시료로 하여 HPLC분석한 결과로 F-I fraction의 경우 (Fig. 9B)는 1.12의 retention time에서 monomer인 epicatechin, 1.30~1.5의 범위에서 dimer인 procyanidin B-1과 B-2가 동정되었다. 또한, 1.85에서 trimer인 procyanidin C-1이, 그리고 마지막으로 4.53에서 cinnamtannin A-2

**Table 6. Qualitative and quantitative polyphenol test of partially purified fraction of cacao bean husk extract.**

Purification	Qualitative test		Qualitative test Polyphenol content (mg/active fraction)
	FeCl <sub>3</sub>	Anisaldehyde	
Sephadex G-50 F-1 fraction	+	+	72
Sephadex LH-20	+	+	78
DEAE-Sephadex A-50	+	+	55



**Fig. 9. HPLC chromatogram of partially purified active fractions of cacao bean husk extract.**

A: Polyphenol standards,

B: F-1 fraction isolated by Sephadex G-50,

1. (+)-Catechin, 2. (-)-Epicatechin

3. Procyanidin B-1, 4. Procyanidin B-2

5. Procyanidin B-3, 6. Procyanidin C-1

7. Cinnamtannin A-2

Column: PICO-TAG C<sub>18</sub> (4×250mm)

Solvent: Water-Methanol(50:50, v/v)

Detector:UV Flowrate: 1.0ml/min

Attenuation: 16x

(tetramer)가 확인되었으며, polyphenol을 HPLC로 분석할 경우 저분자에서 고분자 polyphenol로 용출된다는 森元들(16)의 실험결과와도 잘 일치하는 경향이였다.

그러므로 column chromatography법에 의해 얻은 활성 분획물들은 polyphenol류가 주성분으로 하는 혼합물로 구성되어 있으며, 따라서 이들 polyphenol류가 GTase 저해활성을 나타내는 생리활성의 기능을 갖는 물질인 것으로 판단하였다. Polyphenol류는 식물체내에서 단백질과 결합된 상태 혹은 carbohydrate류와 결합된 배당체의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으나 본 실험결과에 의하면 GTase 활성을 저해하는 생리활성은 polyphenol moiety에만 국한되는 것으로 생각된다.

## 결론

Cacao bean husk(CBH)추출물의 glucosyltransferase(GTase) 활성 저해효과를 조사하였다. 열수 또는 water-methanol로 2회 반복 추출한 CBH추출물은 농도 0.1mg/ml 이상에서 88~89%의 높은 저해활성을 보였으며, 산지, 발효 및 훈증처리, 추출 용매, 여과과정 등의 차이는 나타나지 않았다. 추출물의 물리화학적 특성과 ammonium sulfate 또는 ethanol 침전 및 proteinase K 또는 가수분해처리에 의한 GTase 저해능을 조사한 결과, CBH 추출물내의 생리활성 유효성분 polyphenol류인 것으로 추정되었으며, Sephadex G-50, Sephadex LH-20 및 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography법에 의한 분획 및 성분분석으로 확인되었다.

## 참고문헌

1. 田茂幸, 古賀敏比古(1981), 化學と生物, **19**, 695.
2. T. Nambada, M. Tsunozuka, and M. Hattori (1982), *Planta Med.*, **44**, 100.
3. A. Endo, O. Hayashima, and S. Murakawa (1983), *J. Antibiotics*, **36**, 203.
4. T. Nambada, M. Tsunozuka, Y. Takehara, S. Nunome, K. Takeda, Y. Z. Kakiumhi, S. Takagi, and M. Hattori(1984), *Shoyakugaku Zasshi*, **38(3)**, 253.
5. T. Sakai, K. Kobashi, M. Tsunozuka, M. Hattori, and T. Nambada(1985), *Shoy akugaku*

- Zasshi*, **39(2)**, 165.
6. 中西喜次, (1965), チョコレート・ココア・製造の理論と実際, 光林書院, p. 51.
  7. Cocoa Market Report No. 339 : E. D. & F. Man Cocoa Ltd., p. 12.
  8. 村川茂雄, 遠藤 章(1986) 微生物の分離法, R & D Planning, p. 732.
  9. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
  10. W. Pigman and D.(1980), Hortor, The Carbohydrates Chem. & Biochem. (1a), Academic Press, New York, p. 25.
  11. M. Nishizawa, G. Nonaka and I. Nishioka (1983), *Chem. Pharm. Bull.*, **31(8)**, 2593.
  12. O. Folin, and V. Ciocalteu(1927), *J. Biol. Chem.*, **73**, 627.
  13. M. Nishizawa, G. Nonaka and I. Nishioka, I (1989), *Chem. Pharm. Bull.*, **37(4)**, 999.
  14. 大村 智(1987), 抗生物質研究の最先端, 東京化学同人, p. 56.
  15. S. Omura(1981), *Method in Enzymology*, 72, 520.
  16. 森元 聰, 野中源一郎, 西岡五夫(1985), 和漢醫藥學會誌, **2(3)**, 17.