

최 종
연구보고서

GOVP1200628494

GA 0625-06039

발아홍화의 제조와 기능성성분분석 및 건강기능성 식품 개발에 관한 연구

Germinated Safflower Seeds : Production, Analysis of Functional
Components, and Development of Functional Foods

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

T0009660

본 보고서를 “발아홍화의 제조와 기능성성분분석 및 건강
기능성 식품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출
합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김 승 호

세부연구책임자 : 박 동 준

연 구 원 : 권 대 영

연 구 원 : 이 경 애

요 약 문

I. 제 목

발아홍화의 제조와 기능성성분분석 및 건강기능성 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

홍화씨는 한국을 포함한 일부 아시아국가에서 심혈관계 질환, 골다공증, 관절염 등을 예방하거나 치료하기 위하여 쓰여져 오고 있다. 최근, 홍화씨가 쥐의 골절된 뼈를 치유해 주며, 고지방 고콜레스테롤 식이 쥐의 지방대사를 개선하며, 또한 암세포에 대해 세포독성을 나타낸다고 밝혀졌다. 이 세포독성은 홍화씨의 폴리페놀류(*N*-feruloylserotonin, *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin, matairesinol, 8'-hydroxyarctigenin, luteolin, and acacetin)에 기인하였다. 홍화씨 폴리페놀류의 항산화능도 연구되었다. 폴리페놀류는 항산화능을 가진 주요 식물 물질인 듯하다. 폴리페놀류는 또한 항암, 항알리지, 항염증, 항혈전과 혈관확장을 포함하는 광범위한 생리효과를 보여준다.

페놀류는 fava bean과 pigeon pea의 발아씨에서 증가했으며, lentil의 경우에는 procyanidin 류 물질의 중요한 구조적 변화가 관찰되었지만 별로 증가하지 않았다. 또한 발아중 항산화물질인비타민 C의 증가가 많은 식물체에서 보고되었다. 따라서, 발아가 홍화씨의 가치를 올리는 한가지 방법으로 사용될 수 있겠다.

본 연구의 목표는 1) 홍화씨의 발아를 최적화하며, 2) 발아홍화씨의 기능성성분을 분석하며, 3) 이를 이용한 기능성 식품을 개발함에 있었다.

성 식품을 개발함에 있었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 발아

- 1) 실험실 규모에서의 발아 최적화
- 2) scale-up 검토

2. 기능성 성분 분석

- 1) in vitro, in vivo 콜다공증 예방 효과
- 2) in vitro, in vivo 콜레스테롤 저감 효과
- 3) in vitro, in vivo 항혈전 효과

3. 분말과 추출물 생산 최적화

- 1) 분말 생산을 위한 건조, 분쇄, 껍질 제거
- 2) 건식 및 습식 추출
- 3) scale-up 검토
- 4) 분말 및 추출물의 저장안정성

4. 기능성 모델식품의 제조

- 1) 관능검사
- 2) 저장안정성

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 결과

1) 홍화의 발아는 암소에서 20C에서 최적이었다. 기능성의 지표로 삼은 항산화능과 혈소판응집저해능이 발아가 진행되면서 계속 증가하였다.

2) 증가된 기능성들은 발아가 진행되면서 증가된 총페놀이나 (상관관계가 잘 들어 맞지 않음), 증가된 비타민 C (기능성에 대한 기여도가 아주 미미함)로 설명될 수 없었으나,

isoflavone으로 추정되는 물질의 획기적 증가(38.6 mg/100g에서 1238.7 mg/100g으로)가 증가된 기능성들을 설명할 수 있을 것이다.

3) 대형발아기의 운행이 별 문제없이 성공했다.

4) 홍화씨의 도정이 발아를 촉진시켰다.

5) 발아가 골다공증 예방효과, 콜레스테롤 저감효과, 항혈전 효과 등의 기능성을 증가시켰다.

6) 홍화씨의 껍질이 발아 후 쉽게 제거되었다.

7) 발아홍화 분말과 물추출물은 비교적 저장중 안정하였다.

8) 발아홍화를 이용한 모델식품들은 좋은 관능적 특성을 보였다.

2. 활용에 관한 건의

발아홍화의 획기적으로 높은 isoflavone 함량과 높은 건강 기능성은 홍화씨의 부가가치를 팔목할 만큼 높일 것이다. 또한, 발아 후 쉽게 껍질이 제거됨으로 홍화씨의 섭취시 발생하는 위장장애를 없앨 수 있는 점, 도정에 의한 쉬운 발아, 분말 및 추출물의 좋은 저장성, 모델식품들의 좋은 관능특성 등의 요인들은 발아홍화에 관련된 모든 사업을 성공적으로 하는데 기여할 것이다.

여 백

S U M M A R Y

I. Title

Germinated Safflower Seeds: Production, Analysis of Functional Components, and Development of Functional Foods

II. Objective and Needs of Research and Development

Safflower seeds have been used in some Asian countries including Korea to treat or prevent cardiovascular diseases, osteoporosis and rheumatism. Recently, safflower seeds were shown to heal fractured bones in rats, to improve lipid metabolism in high fat and cholesterol fed rats, and to exhibit cytotoxicity against cancer cell lines. The cytotoxicity was due to polyphenols (N-feruloylserotonin, N (p-coumaroyl) serotonin, matairesinol, 8'-hydroxyarctigenin, luteolin, and acacetin) in the seeds. Antioxidant properties of polyphenols in the safflower seeds were also studied. Polyphenols seems to be the major plant materials with antioxidant properties. Polyphenols also exhibit a wide range of biological effects, including anticarcinogenicity, antiallergic, anti inflammatory, antithrombotic, and vasodilatory actions.

Phenols increased in the germinating seeds of fava bean and pigeon pea, while not appreciably of lentil, although important structural changes in procyanidin type compounds were observed. Also increase of vitamin C, an antioxidant, during germination is reported in many plants. Therefore, germination could be used as a tool to enhance the value of safflower seeds.

The objective of this study was 1) to optimize germination of safflower seeds, 2) to analyze functional components of germinated safflower seeds, and 3) to develop functional foods using germinated safflower seeds.

III. Content and Scope of Research and Development

1. Germination

1) Optimization of germination on laboratory scale

2) Assessment of scale-up

2. Analysis of functional components

1) in vitro and in vivo anti-osteoporosis function

2) in vitro and in vivo cholesterol lowering function

3) in vitro and in vivo antithrombotic function

3. Optimization of production of powder and extract

1) drying, grinding and seed coat removal for powder production

2) extracting by dry and wet method

3) Assessment of scale-up

4) storage stability of powder and extract

4. Production of functional foods

1) sensory evaluation

2) storage stability

IV. Results of research and development and suggestions for their utilization

1. Results

1) Germination of safflower seeds was optimal at 20°C in the dark. Antioxidant activity and antiplatelet activity, which were employed as criteria for functionality, continued to increase as germination proceeded.

2) The increased functionalities could not be explained by increased total phenol content (they did not correlated well) or increased vitamin C content (extent of

contribution of vitamin C to the functionalities were minimal) but remarkable increase of isoflavones (from 38.6 mg/100g to 1238.7 mg/100g) could explain the increased functionalities.

3) Pilot scale operation of germination was successful without any complication.

4) Partial removal of seed coat of safflower seeds facilitated germination.

5) Germination increased functionalities such as anti-osteoporosis, cholesterol lowering, and antithrombosis, probably due to increased isoflavone content.

6) Seed coat of safflower seeds could be easily removed after germination.

7) Powder and water extract of germinated safflower were quite stable during storage.

8) Model foods using germinated safflower seeds had good sensory properties.

2. Suggestions for utilization

Remarkably high isoflavone content and high health-related functionality of germinated safflower seeds would significantly add value to safflower seeds. This together with such factors as easy removal of seed coat after germination to eliminate the stomach-irritation problem associated with consumption of safflower seeds, ease of germination by partial removal of seed coat, good storage stability of powder and extract, and good sensory properties of the model foods would make any business proposition relating to germination of safflower seeds profitable.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Satatus of Domestic and Overseas Research Developments	20
Chapter 3. Research Content and Results	22
Section 1. Germination of safflower seeds	22
Section 2. Functionality of germinated safflower seeds	40
Section 3. Production of powder and extract of germinated safflower seeds	69
Section 4. Model foods using germinated safflower seeds	89
Chapter 4. Extent of Achieving Research Objective and Contribution to Related Fields	108
Chapter 5. Utilization Plan for Research Results	109
Chapter 6. Overseas Science and Technology Information Collected during Research and Development	109
Chapter 7. Reference	111

여 백

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 2 장	국내의 기술개발 현황	20
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	22
제 1 절	홍화의 발아	22
1. 서론	22
2. 재료 및 방법	22
3. 최적 발아 조건 설정	26
4. 최적 발아 조건에서 발아일에 따른 각종 지표의 변화	29
5. 홍화 발아의 scale up	35
6. 홍화씨의 도정에 의한 발아 촉진	39
제 2 절	발아홍화의 기능성	40
1. 서론	40
2. 재료 및 방법	40
3. 비타민 C	49
4. isoflavone	50
5. 골다공증 예방 효과	52
6. 콜레스테롤 저하 효과	62
7. 항혈전능	67
제 3 절	발아홍화의 분말화 및 추출	69
1. 서론	69
2. 분말화를 위한 건조 방법 비교	69
3. 초미세분쇄 및 공기분급을 이용한 발아홍화의 분급	70
4. 발아홍화의 습식 추출	81

5. 홍화 분말과 물추출물의 저장성	83
6. 제품의 시장동향 및 가격경쟁력 분석	88
제 4 절 발아홍화를 이용한 모델 식품	89
1. 발아홍화차	89
2. 발아홍화빵	91
3. 발아홍화요구르트	99
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	109
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	109
제 7 장 참고문헌	111

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

○ 홍화가 혈소판 응집억제, 콜레스테롤 저하효과, 항암, 골절치유 등의 여러 기능이 있는 것으로 알려져 있으나 아직까지 이들 물질과 기능의 정확한 규명은 이루어지지 않았다.

○ 홍화는 주로 씨를 말려서 그대로 이용하거나 환 또는 엑기스로 만들어 이용하고 있는데 리놀레산의 산화에 의한 과산화지질의 생성으로 발암가능성과 함께 가공·저장상의 문제가 있어 그 이용에 제한이 있다.

○ 홍화의 줄기나 잎에도 기능성 유효성분(polyacetylene, luteolin-7-glucoside 등)이 다량 함유되어 있음이 확인되고 있으나 현재까지 식용원료로 사용이 허가되어 있지 않은 실정이었다.

○ 그러나 최근 홍화의 어린잎이나 줄기를 식품원료로 사용할 수 있도록 한 식약청 문서번호 식품규격 65421-23 (2003. 1. 7)에 근거로 하여 본 연구에서는 홍화씨의 기능성과 영양성을 극대화하고 과산화지질의 생성은 최소화할 수 있는 발아기술을 이용한 발아홍화를 제조하고자 하였다.

○ 발아과정은 비타민 (B₁, B₂, C 등)과 미네랄(P, Fe)등이 증가되고, 각종 효소활성 증가와 소화율 증진 및 antinutritional factor(phytate 등)의 감소에 의해 bioavailability가 증가되며, 발아시에 형성되는 유효성분들의 추출을 극대화시킬 수 있다.

○ 그러나 발아기술을 이용한 기능성 유효물질의 성분변화 및 기능성의 변화에 대한 연구는 거의 전무한 상태이므로 이에 대한 다각적인 연구가 필요하다.

○ 본 연구진은 두류 및 두류가공품으로부터 항혈전, 혈압강하효과, 콜레스테롤저하효과 등의 기능성펩타이드를 분리하여 이들 펩타이드의 구조를 확인한 바 있어 기능성 평가시스템이 확립되어 있다.

○ 본 연구에서는 발아홍화의 발아에 따른 영양성분과 기능성 성분변화 및 그 기능성(항혈전, 항콜레스테롤, 골밀도개선효과 등)을 규명하고 나아가 발아홍화의 대량생산 및 유효성분의 추출공정을 최적화하여 고기능성식품 개발을 위한 원료개발의 기초를 제공하고자 한다.

2) 경제·산업적 측면

○ WTO 체제출범으로 갈수록 국제경쟁화 시대에 우리나라 농업이 살아남는 길은 우리의 기술로 우리나라에서 나는 작물만이 갖는 차별화된 소재의 개발이 필요하다.

○ 발아홍화로부터 기능성물질을 농축하여 식품소재로 만드는 고부가가치화 창출로

우리 농산물이 국제경쟁력을 갖도록 하여야 한다.

○ 전국적인 재배가 가능한 홍화재배에 활기를 부여하여 자급률을 높이고 산지가공업체의 생산비 절감으로 농외소득 창출이 가능하다.

○ 현재 기능성제품개발의 주종을 이루고 있는 혈압저하, 콜레스테롤저하, 심혈관계질환 개선 등을 위한 새로운 nutraceutical 소재 시장창출이 필요하다.

○ 다양한 기능적 성질 및 약리효과에 대한 과학적이고 객관적인 연구로 홍화소비율 증가시켜 농가소득증대를 유도한다.

3) 사회·문화적 측면

○ 우리나라 심혈관계질환 발생의 3대 위험인자인 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 고혈압과 폐경기 여성의 골다공증으로 발생하는 의료비 부담을 줄일 수 있는 고기능성 식품 개발이 절실하다.

○ 홍화의 우수성은 알려져 있으나 그 기능을 규명할 수 있는 객관적인 연구가 필요하며 더욱이 발아홍화는 그 기능성과 활용성이 크게 증대될 것으로 보이나, 이에 대한 연구가 절실히 필요하다.

○ 개정된 기능성 건강식품법(2003년 8월)에서는 식품의 기능성 규명과 안전성확보가 무엇보다 필요하므로 소비자에게 안전하고 상품성 높은 식품에 대한 객관적인 데이터의 제시가 필요하다.

2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발 목표와 내용

- 발아홍화제조를 위한 발아조건 최적화
- 발아율과 뿌리 및 싹의 길이에 따른 성분변화 분석 및 이화학적 특성 평가
- 실험동물을 이용한 in vitro/in vivo 기능성 평가
(항혈전, 항콜레스테롤, 골밀도개선효과)
- 발아홍화 분말화 최적화
- 발아홍화 추출 최적화
- 발아홍화 분말과 추출물의 생리기능성, 관능, 저장안정성 평가
- 발아홍화 기능성 모델식품의 제조 및 관능평가
- 기능성모델식품의 안정성 및 shelf life 설정
- 시장조사, 경제성 검토

최종 목표 :

홍화의 부가가치를 높이기 위하여, 홍화의 발아, 발아홍화 분말화, 발아홍화 추출조건의 최적화 및 공정개발, 발아홍화 분말과 추출물의 생리기능성, 관능 및 저장안정성 평가, 모델식품 제조와 관능 및 저장안정성 평가를 수행한다.

개발 제품의 specification

제품명	specification
발아홍화 분말	- seed coat가 제거됨 - 총 페놀 함량 : 홍화 대비 50% 이상 증가
발아홍화 추출물	- 총 페놀 함량 : 홍화 대비 50% 이상 증가

나. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003년)	○ 발아공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발아조건별, 발아단계별 <ul style="list-style-type: none"> - 발아율 측정 - 이화학적 특성 조사 - 일반성분 분석 - 총 페놀 함량 분석 - 항산화력 분석 ○ <i>in vitro</i> 생리기능성 평가기준 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 항혈전 - 항콜레스테롤 - 골밀도개선효과 등 ○ 발아공정 scale-up 검토
2차 년도 (2004년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분말화 및 추출공정 최적화 ○ 발아홍화 분말과 추출물의 <i>in vitro</i> 생리기능성 및 품질평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분말화를 위한 건조, 분쇄, seed coat 제거 방법 확립 ○ 최적 추출조건 설정 ○ <i>in vitro</i> 생리기능성, 관능 및 저장안정성 평가 ○ 분말화 및 추출공정 scale-up 검토
3차 년도 (2005년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발아홍화 분말과 추출물의 <i>in vivo</i> 생리기능성 평가 ○ 기능성 모델식품의 제조 및 품질평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발아홍화 분말과 추출물의 <i>in vivo</i> 생리기능성 평가 기준 확립 및 평가 ○ 기능성 모델식품의 제조 ○ 기능성 모델식품의 관능검사 및 저장성 평가 (shelf life설정) ○ 제품의 시장동향 및 가격경쟁력 분석 ○ 관련기술의 특허출원

제 2 장 국 내 외 기 술 개 발 현 황

1. 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

가. 현재까지 연구의 문제점

○ 홍화씨를 이용한 가공식품에 대하여 꾸준한 연구가 이루어지고 있으나 과산화지질 생성 등의 가공적성의 문제로 인하여 다양한 제품개발이 이루어지지 않았다.

○ 발아기술은 기능성 유효물질의 Quantitative physiology(계량생리학)가 가능한 고부가가치 소재시장의 창출이 가능한 기술이나 이에 대한 연구가 거의 없다.

○ 지금까지는 홍화의 줄기나 잎은 식용으로 금지되어왔으나, 최근에 홍화의 어린잎이나 줄기를 식품원료로 사용할 수 있도록(식약청 문서번호 식품규격 65421-23 ; 2003. 1. 7) 하여 발아홍화의 제조가 가능해졌다.

○ 국내외를 통하여 발아홍화와 관련된 식품화 관련 연구가 없으며, 발아홍화의 기능성과 관련된 물질규명과 그 분석기술(HPLC, GC 이용분석기술)이 확립되어 있지 않다.

나. 당해연구기관의 관련기술현황

○ 본 연구팀은 전통 된장에서의 혈압강하 펩타이드를 분리하여 그 구조를 확인하였으며(김승호 등, 1999), 대두단백질 분해물로부터 항혈전 기능이 있는 펩타이드들을 분리하여 그 1차구조를 확인하였다. (Lee & Kim et al., 2005).

○ 아울러 본 연구책임자는 대두 가수분해물로부터 분획한 항혈전성펩타이드를 기능성식품첨가물로서 개발, (주)농심에서 콩 펩타이드 라면의 스프소재로 활용중이다.

2. 앞으로의 전망

- 발아 관련기술이 식품에 적용된다면 앞으로 타 농산물로부터 고부가가치의 식품소재개발에 기폭제가 될 것이다.
- 우리나라 발아홍화를 이용한 nutraceutical 원료개발로 고부가가치의 기능성 건강보조식품 시장이 창출됨으로써 홍화 재배농가의 소득증대와 우리나라 농업기술 발전에 크게 기여할 것으로 보인다.
- 발아홍화를 이용한 기능성 유효성분의 대량생산으로 기능성 식품시장의 확대에 기여하고 나아가 원료의 생산, 가공 및 유통과정에서 부가가치를 증진할 수 있다.
- 발아홍화의 성분 및 기능성 연구로 홍화의 효능을 밝혀 소비자를 보호하고, 새로운 건강기능식품법에 대처한 객관성 있는 자료를 제공할 수 있다.

3. 기술도입의 타당성

- 발아홍화에 대한 국내외의 연구결과가 거의 전무하여 기술도입의 타당성 없음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 홍화의 발아

1. 서론

본 절에서는 실험실 조건에서 빛, 온도 등 발아 최적조건을 설정한 다음 최적 조건에서의 각종 성분의 발아일에 따른 변화를 추적하였으며 특히 항산화력과 항혈전능을 지표로 하여 발아 최적발아기간을 결정하였다. 또한 대형 발아기에서 발아를 성공적으로 수행하였으며, 홍화씨 발아전도정과정을 채택함으로써 발아율을 크게 높일 수 있었다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

홍화씨는 우리홍화인영농조합(경북 의성)에서 2003년산을 구입하였다. Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA)을 이용하여 얻은 HPLC grade 물을 특별히 명기하지 않았으면 전 연구를 통하여 사용하였다. ADP (adenosine-5'-diphosphate)는 Chrono-log 사 제품을 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 analytical grade (Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였다. *in vitro* 항혈전 검정을 위한 Sprague Dawley (SD) male rat 은 삼육 실험동물 연구소에서 구입하여, 한 달 이상 사육하여 무게가 $200\text{ g} \pm 30$ 이상 되는 것을 실험에 사용하였다.

나. 방법

1) 발아

홍화씨를 정선하여 수세한 후 이물질과 먼지 등을 제거시킨 다음, 시료무게의 5배의 증류수에 침지하였다. 이 때 물 위에 뜨는 홍화씨는 제거하였으며(약 20%의 홍화씨에 해당), 불린 홍화씨는 흐르는 물에서 깨끗하게 여러 번 씻은 후 물을 뺀 다음 회전분무식 콩나물재배기에서 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 발아시켰다. 1일 1회 흐르는 물로 깨끗이 홍화씨를 씻어 주면서 발아 일수별로 시료를 채취하여 발아율과 싹의 길이를 측정하였다.

시료의 발아율은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{발아율}(\%) = \frac{\text{싹 또는 뿌리가 나오는 시료의 수}}{\text{시료 100개}} \times 100$$

2) 시료 조제

제조된 발아시료는 흐르는 물로 10회 이상 수세한 후 동결건조하여 10mesh(1.18mm)이하로 분쇄한 다음 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

3) 일반성분 분석

조단백(Kjeldahl 질소 함량 $\times 6.25$), 조지방(diethyl ether 추출), 회분, 조섬유는 AOAC법(1980)에 따라 측정하였고, 탄수화물은 그 차이로 계산하였다.

4) 추출

냉동건조한 시료 500 mg을 screw-capped tube에 넣은

후, 50% methanol/water 20ml을 넣고 1분간 vortex하고, 90 °C에서 3시간동안 30분마다 1분간 vortex하면서 가열하였다. 가열된 시료를 식힌 후, benchtop centrifuge로 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고형물을 제거하였다.

5) 총 페놀 함량 분석

Singleton 과 Rossi의 방법(1965)을 사용하여 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 현상을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 식품시료의 50% methanol 추출물 1ml을 증류수와 섞은 후 Folin-Coialteu reagent (Sigma, St. Louis, MO) 5ml과 탄산나트륨 포화용액 10ml을 차례로 넣고 100ml 용량으로 채우고 10분간 방치시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준물질로 하였으며 분석은 각 시료 당 3반복 실시하였다.

6) 축합된 탄닌 함량 분석

Price 등의 vanillin방법(1978)에 따라 축합형 탄닌의 구성단위와 vanillin이 선택적으로 반응하는 것을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 시료용액 1 ml과 vanilin 시약 5 ml을 30 °C에서 20분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대하여 3반복 실험을 하였으며, catechin을 표준물질로 하였다.

7) 항산화력 분석

DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl)에 대한 free radical 소거능에 의해 항산화력을 측정하였다(Blois, 1958). 100 ml ethanol에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman filter paper No. 2로 여과시켜 DPPH용액을 만들었다. 이 용액 5 ml에 시료용액 1 ml을 혼합하여 10분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시

료 당 3반복 실험을 하였으며, control의 흡광도를 50% 감소시키는 시료의 농도(SC₅₀: median scavenging concentration)를 구하였다.

8) in vitro 항혈전 검정

Aggregometer (Chrono-log, Model No. 490, Havertown, PA, USA)를 사용하여 Shon 등의 방법(1996)에 따라 다음과 같이 측정하였으며, 혈소판 응집을 50% 저해시키는 시료의 농도(IC₅₀: median inhibitory concentration)를 구하였다.

가) 혈소판 분리

Rat을 diethyl ether로 마취하여 개복한 후, 항응고제인 ACD용액 (12.5 g Trisodium citrate dihydrate, 7.5 g Citric acid monohydrate, 10 g Glucose)을 1 : 6 (v/v)으로 미리 넣어놓은 syringe로 채혈하여, 상온에서 1,000 rpm (Vision scientific co. Vs-5000)으로 15 분간 원심분리하고 상층의 PRP (Platelet rich plasma)를 취한 후에 다시 1,800 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 침전된 platelet에 washing buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35 % Bovine Serum Albumin, pH 7.4)를 넣고 1,800 rpm으로 10 분간 원심분리하여 분리된 washed platelet을 suspension buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 16.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.1 mM α-D-Glucose, pH 7.4)에 현탁시켜 hemacytometer (Superior, Germany)로 platelet의 수를 5 × 10⁸/ml 로 조정하였다.

나) 혈소판 응집 실험

Aggregometer 를 이용하여 혈소판 응집 실험을 다음

과 같이 행하였다.

가)의 방법으로 분리한 platelet suspension 470 μ l를 37 $^{\circ}$ C로 맞춘 aggregometer의 hole에 꽂아 1,000 rpm으로 5 분간 preincubation 시킨 후에 CaCl_2 용액 10 μ l (final concentration 1.0 mM)을 첨가하여 2 분간 반응시키고, 시료 또는 물(control)을 10 μ l 첨가하여 2 분 동안 반응을 시킨 다음, 혈소판 응집 유도물질인 ADP (final concentration 10 μ M) 용액을 넣어 5 분간 반응시키면서 transmittance를 측정하였다. 시험물질의 혈소판 응집 억제율 (inhibition of platelet aggregation, %)은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition of platelet aggregation (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: change in transparency of control, %

B: change in transparency of sample, %

9) 통계 처리

모든 실험결과의 통계분석은 statistic analysis system (SAS) 프로그램을 이용하였다. Student t-test를 사용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였으며, One-way ANOVA(analysis of variance)법을 병행하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의수준 5% 수준에서 표시하였다.

3. 최적 발아 조건 설정

가. 종자선별

홍화씨를 정선하여 수세한 후 이물질과 먼지 등을 제거시킨 시료무게의 5배에 상당하는 증류수에 침지하였다(6시

간 ~ 48시간). 이 때 물위에 뜨는 홍화씨는 제거하였으며(약 20%의 홍화씨에 해당), 수침 시간에 따라 종자의 부피 증가율을 측정 한 결과 약 15시간 수침시에 40%로 최대의 부피 증가율을 나타냈으며 24시간 침수 후부터는 오히려 부피가 감소하는 경향을 보이는 것이 확인되었다. 따라서 침지시간을 15시간으로 하여 발아를 수행하였다.

나. 발아조건

1) Light의 영향

상온에서(20℃) 빛의 영향을 조사한 경우, 빛을 차단한 암소에서 발아(76.7%)가 빛을 쬐인 경우(37.5%)보다 약 2배의 발아효과를 나타냈으며 발아시작 시간도 훨씬 빨랐다.

2) 온도의 영향

항온기를 이용하여 15℃, 20℃, 26℃, 30℃에서 발아속도, 부패율 그리고 발아율을 비교하였다(표 1-1, 표 1-2). 온도가 낮은 경우 발아속도가 매우 지연되었으나 부패율이 적었고 반면에 온도가 높아질수록 발아율은 높았으나 26℃ 이상의 온도에서는 부패현상이 빠르게 진행되었다.

이는 발아에 의한 호흡활동이 왕성해지고 급격하게 배축이 신장됨으로써 상당량의 호흡열이 발생되고, 고온 및 가스로 인한 부패균의 급속한 번식이 일정한 영향을 주는 것으로 보인다. 그러므로 재배온도의 조절에 의하여 부패발생을 억제할 필요가 있으므로 20℃±2℃의 재배온도가 가장 적당할 것으로 판단된다.

3) 페놀촉진제의 효과

발아에 의한 페놀화합물의 합성을 촉진하기 위하여, 촉진제인 gellan gum (Shetty, et al., 2001) 0.1% 용액에 세척한 홍화씨를 넣고 24시간 동안 150rpm으로 shaking 한 후

물로 세척하여 똑같은 조건으로 발아시킨 결과, 초기 발아율이 5% 정도 증가하는 경향을 보였으나 부패가 빠르게 진행되는 단점이 있었다.

4) 발아용 홍화씨의 필요성

본 실험에서 사용한 홍화씨가 시중에서 구입한 것을 사용한 점을 감안할 때, 종자 선별과정에서의 손실 (약 20%)을 낮추고 최적 발아 조건에서의 발아율 77%을 높이는 것은 발아용 홍화씨를 특별 관리(수확 후 관리 등)함으로 성취될 수 있다고 예측된다.

Table 1-1. Occurrence of rottenness of safflower sprouts at various germination temperatures

time (d)	germination temperature(°C)			
	15	20	26	30
0	o	o	o	o
2	o	o	o	o
4	o	o	o	⊙
6	o	o	⊙	●
8	o	o	⊙	●
10	o	⊙	●	●

o : None ⊙ : ≤ 10% ● : 10~ 20% ● : 20% <

Table 1-2. Germination rate of safflower seeds germinated for 6 days at various temperatures¹

time (d)	germination temperature(°C)			
	15	20	26	30
6	48.0±1.8 ^a	77.0±0.9 ^b	78.0±1.8 ^b	78.0±1.3 ^b

¹Values are the mean of three determinations ± standard deviation.

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

4. 최적 발아 조건에서 발아일에 따른 각종 지표의 변화

가. seed coat의 분리 및 제거에 관한 예비 실험과 고찰

홍화씨 중에서 seed coat는 31.5%(w/w)를 차지하고 있으나, 가공시에는 제거해야 하는 부분이다. 발아 2일째에 seed coat이 벌어지나 분리되기는 쉽지 않고 4일째에는 약간의 마찰이 가해지면 껍질이 쉽게 분리된다. 가장 자연탈피가 증대되는 시기는 cotyledons(떡잎)이 나오기 시작하는 발아 6일 후이고, 10일 후에는 hypocodyl stem과 root를 포함한 전체적인 length가 5cm에 달하나 부패가 시작되며 이때가 지속적인 성장을 위해서는 지지대가 필요한 시점이므로 이 시점까지 발아를 진행하였다. 분리된 seed coat를 소금물을 이용하여 발아시료로부터 제거할 수 있는 방법을 검토하였다. 소금물을 이용한 비중법으로 seed coat는 가라앉게 하고 발아시료는 위에 뜨도록하여 분리하였다. 소금물 농도 1%에서는 50%정도의 회수율을 나타내었으며 3%소금물에서는 100% 회수가 가능하였다.

나. 순의 길이와 신선 중량(fresh weight)

표 1-3에서와 같이 20℃±2℃의 발아조건에서 재배한 발아된 홍화순의 길이는 발아 4일째에 0.5cm, 6일째에 1.5cm, 8일째에 3.0cm, 10일째에 5cm 정도로 성장하였으며, 신선 중량은 지속적으로 증가하여 발아 10일에는 발아 전에 비해 3.5배로 증가하였다.

Table 1-3. Changes in length of safflower sprouts and fresh weight of safflower seeds (germination temperature: 20±2℃)¹

time (d)	length(cm)	fresh weight (g/100g seed)
0	-	100.0±0.01 ^a
2	-	160.0±1.5 ^b
4	0.5±0.1 ^a	181.3±1.0 ^{bc}
6	1.5±0.1 ^b	240.5±1.0 ^c
8	3.0±0.3 ^c	300.0±3.2 ^d
10	5.0±0.4 ^d	350.0±4.0 ^e

¹Values are the mean of three determinations ± standard deviation.

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

다. 일반성분

발아에 따른 일반성분의 변화는 표 1-4에 표시하였다. 발아가 진행됨에 따라, 조단백은 서서히 증가하며, 조지방

은 급격히 감소하며, 조섬유와 회분은 별 변화가 없었으며, 탄수화물은 서서히 증가하는 경향을 보였다.

조단백의 완만한 증가는 발아중의 효소들의 증가로 일부 설명될 수 있다.

조지방의 급격한 감소와 탄수화물의 완만한 증가는 관련되는 현상으로 생각된다.

조지방의 급격한 감소는 홍화 지방의 대부분을 차지하는 중성지방 함량이 발아 초기 2일 동안은 변화하지 않다가

(Table 1-4. Proximate composition during the germination of safflower seeds (% dry matter)¹)

time (d)	crude protein	crude fat	crude fiber	ash	carbohydrate ²
0	13.5±0.5 ^a	40.0±2.6 ^a	28.2±2.7 ^a	2.8±0.2 ^a	15.5±0.5 ^a
2	13.8±0.4 ^a	38.8±1.2 ^a	28.3±1.3 ^a	3.3±0.4 ^a	15.8±0.1 ^a
4	16.0±1.0 ^b	35.5±4.4 ^{ab}	27.5±0.5 ^a	3.6±0.3 ^a	17.4±0.5 ^b
6	16.8±0.2 ^b	30.2±5.2 ^{bc}	28.1±1.5 ^a	3.2±0.5 ^a	21.7±1.0 ^c
8	16.9±0.3 ^b	27.6±1.8 ^c	28.7±0.6 ^a	3.6±0.2 ^a	23.2±0.9 ^d
10	17.5±0.3 ^b	20.9±1.4 ^d	29.2±1.2 ^a	3.6±0.3 ^a	28.8±0.7 ^e
commercial (roasted and ground)	8.0±1.5	25.6±1.7	28.1±1.2	2.4±0.1	35.9±1.2

¹Values are the mean of three determinations ± standard deviation.

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

²Calculated by difference.

약 13 $\mu\text{mol}/\text{seed}$), 그 후, 급격히 직선적으로 감소하여 발아 6일 후부터는 1 $\mu\text{mol}/\text{seed}$ 또는 그 이하로 된다는 Ichihara 와 Noda (1981)의 보고와 맥을 같이 하는 것이다. 참고로 이들은 galactolipid와 phospholipid가 발아 후 2일과 4일 사이에 빨리 축적되었다고 보고하였다. 상기한 발아에 따른 지방 함량의 감소는 밤 (Offem, et al., 1993; Rabari et al., 1961; Singh and Singh, 1974; Wankhede et al., 1977), castor bean 씨 (Varner, 1965)에서도 보고된 바 있다.

유량 종자에서의 환원당, 서당과 녹말의 증가와 지방 함량의 감소는 (Kornberg and Beevers, 1957; Canvin and Beevers, 1961; Beevers, 1975, 1978) glyoxylate cycle를 통한 지방산의 탄수화물로 변환에 의함이 밝혀졌다. 따라서, 본 연구에서 나타난 홍화 씨 발아중의 지방 함량 감소 현상도 glyoxylate cycle이 작용했을 가능성이 매우 높다.

참고로 홍화씨를 볶은 다음 분쇄하여 시판하는 제품의 일반 성분을 분석한 결과, 본 실험에서의 발아하지 않은 시료에 비해 특히 조지방 함량이 낮고 탄수화물함량은 높았으며, 이는 시료의 차이와 환으로 만들기 위해 binder로서 탄수화물을 첨가했을 가능성을 시사한다. 또한, 탄수화물 첨가는 분쇄과정에서 했을 가능성도 크다고 볼 수 있는데, 이는 분쇄할 때 지방이 많을 경우 분쇄가 어렵기 때문이다.

발아에 따른 지방의 감소는 본 연구의 최종 제품 (발아 홍화씨의 분쇄제품과 추출제품)의 생산과 품질에 중요한 이점들을 부여할 것으로 사료된다. 즉, 분쇄제품에서는 분쇄의 용이성, binder 사용량의 감소, 지방 산패의 감소에 의한 제품의 저장안정성 향상을 예상할 수 있으며, 추출제품에서는 지방의 감소에 따른 추출에서의 이점을 생각할 수 있겠다.

라. 총페놀과 축합된 탄닌

발아가 진행됨에 따라, 총페놀량이 서서히 증가하다 발

아 후 10일에 급격히 증가하였으며, 이는 주로 축합된 탄닌의 증가로 인한 것이었다 (표 1-5).

발아에 따른 총페놀의 증가는 fava bean에서 보고된 바 있으며 (Shetty et al., 2001), 발아 10일에서의 축합된 탄닌의 증가는 식물의 구조적 발달을 위한 lignin과 lignan 같은 물질의 증가때문인 것으로 사료된다.

참고로 분석한 시판품은 총페놀량은 정상적으로 보였으며, 총페놀의 대부분이 축합된 탄닌이었으나 품종간의 차이로 설명하기는 어려웠다.

Table 1-5. Total phenol content and condensed tannin content during the germination of safflower seeds (% dry matter)¹

Time (d)	total phenols	condensed tannins
0	2.20±0.10 ^a	0.71±0.10 ^a
2	2.33±0.11 ^a	0.71±0.11 ^a
4	2.40±0.12 ^a	0.73±0.10 ^a
6	2.51±0.14 ^a	0.75±0.11 ^a
8	2.54±0.10 ^a	0.76±0.11 ^a
10	3.57±0.38 ^b	1.52±0.15 ^b
commercial (roasted and ground)	2.87±0.11	1.98±0.15

¹Values are the mean of three determinations ± standard deviation.

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

²Total phenols minus condensed tannins

마. 항산화력과 항혈전능

발아가 진행됨에 따라 원료 홍화씨에 비해, 항산화력은 서서히 증가하여 발아 10일에는 2배 이상 증가하였으며, 항혈전능은 급격히 증가하여 400배 이상 증가하였다 (표 1-6).

항산화력과 항혈전능의 증가는 특히 항혈전능의 엄청난 증가는 일부 페놀량의 증가 (표 1-5)에 기인된다 할 수 있겠으나 그 외의 원인을 찾아야 할 것으로 생각된다. 가능한 원인을 생각해 보면, 발아에 의한 비타민 C의 증가, 페놀류의 질적인 변화 (새로운 페놀의 생성, conjugation, polymerization) 등을 생각할 수 있겠으며 다른 원인일 수도 있겠다. 한편, 더 이상하다고 생각되어지는 것은 항혈전능이 증가했다는 것보다 발아전의 홍화씨에서는 항혈전능이 거의 없었다는 점이다. 원인에 대해 다음 절 (제2절 발아홍화의 기능성)에서 고찰하였다.

참고로 분석한 시판품의 항산화력과 항혈전능은 원료 홍화씨의 경우에서와 거의 같았다.

Table 1-6. Antioxidant quality (SC₅₀) and antiplatelet aggregation quality (IC₅₀) during the germination of safflower seeds

Time (d)	SC ₅₀ (mg/100 ml)	IC ₅₀ (mg/100 ml)
0	20.0	> 2,000
2	11.0	360.0
4	10.6	160.4
6	10.4	101.0
8	10.0	65.0
10	8.0	50.0
commercial (roasted and ground)	20.4	> 2,000

5. 홍화 발아의 scale up

가. 서론

홍화 발아의 scale up을 위하여 대형 항온항습기와 pilot scale의 발아기를 사용하였으며 실험했다.

나. 항온항습기를 이용한 발아

홍화의 발아용 알루미늄 용기(Tray, 30×23×5cm)에 물에 적신 거즈를 4겹으로 깔아 지나친 수분의 증발을 방지하고 바닥 면과의 밀착을 방지하기 위한 그물 망(sieve) 위에 홍화 약 200g을 고르게 펴서 분산시켰다. 사용한 홍화는 15시간의 수침과정을 통하여 40% 수준으로 중량이 증가한 홍화를 사용하였다.

본 실험에 사용한 pilot용 항온항습기(주문제작, 코리아 엔지니어링, 한국)는 수도전과 연결된 직접적인 수분공급이 불가능한 구조인 관계로 1일 1회 발아용 홍화에 가수하였으며, 충분한 양의 물이 그물망 아래에 잔류하도록 함으로써 간접적인 수분공급이 이루어질 수 있도록 하였다. 가수량은 홍화중량의 100배 이상이 되도록 하였으며 홍화를 세척하는 형태로 가수하였다.

항온항습기의 내부는 70×80×80 cm 이며 온도조절을 위한 Fan이 부착되어 있어 강제공기순환이 이루어지는 구조를 갖고 있으며, tray를 놓을 수 있는 위치 가변식 선반이 부착되어 있다. 설정온도와 실제 내부온도의 차이를 측정하기 위하여 내부에 온도측정용 센서를 부착하여 발아과정중의 실제 온도변화를 관찰하였다.

항온항습기의 설정온도는 예비실험을 통하여 15~30℃ 구간을 분석한 결과 25℃가 가장 바람직한 온도구간으로 판단되었으며 기기의 운영에도 무리가 없을 것으로 예상되었다. 따라서, 최종적으로 항온항습기는 85%의 습도와 25℃의

온도를 유지할 수 있도록 설정하였다. 항온항습기의 외부 및 내부는 그림 1-1과 같다.

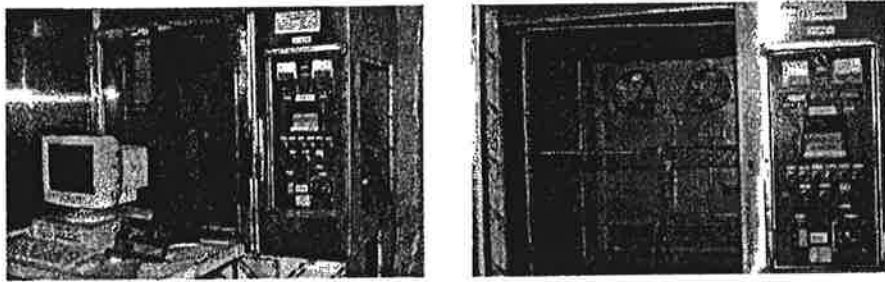


Figure 1-1. 항온항습조 (Constant Temp & Humidity Chamber)의 외부 및 내부

홍화의 발아공정을 대규모로 자동화하면서 최대의 발아율을 확보하기 위한 조건을 최적화하기 위한 방안으로서 pilot 규모의 발아실험을 수행하였다.

홍화의 경우 빛을 차단한 암소에서의 발아율은 76.7% 수준이었으며, 빛이 있는 조건에서의 37.5%보다 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 따라서 발아조건에 적합한 환경부여를 위하여 알루미늄호일(aluminium foil)을 이용하여 외부로부터의 빛을 완벽하게 차단시킨 상태에서 발아를 진행하였다.

항온항습기의 설정온도에 따른 홍화의 발아율은 온도가 높을수록 증가하여 6일 경과 후 75 ~ 80% 수준의 발아율을 보였다(Table 1-7). 수치상으로는 온도가 가장 높은 30℃에서의 발아율이 가장 높은 것으로 나타났으나 호흡량의 증가로 인한 온도의 상승과 tray 하부에 고여있는 물에 홍화에 존재하는 유기물이 반응함으로써 부패현상을 촉진시킬 가능성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 pilot 실험을 위한 항온

항습기의 온도는 25℃ 내외가 바람직하며 자주 tray의 그물망 위로 가수하면서 tray에 고인 물을 교환해주는 것이 필요한 것으로 판단되었다. 이러한 과정은 현재 확보된 전자동항온항습 및 급수/배수(drain) 장치를 갖춘 항온항습기를 활용함으로써 발아홍화의 대량 제조에 문제가 없게 되었다.

Table 1-7. 항온항습기의 설정온도에 따른 홍화의 발아율 (6일 경과)

설정 온도(℃)	발아율(%)
20 ± 2℃	75 ± 2.1 ^a
26 ± 2℃	77 ± 2.5 ^{ab}
30 ± 2℃	80 ± 3.1 ^b

¹Values are the mean of three determinations ± standard deviation.

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

또한 최종적인 Scale-up에서 고려되어야 할 사항으로서 홍화의 발아 제어를 최적화하기 위하여 주기적으로 자동급수 및 배수(drain)를 제어할 수 있도록 장치를 조정하여야 하며, 그 주기는 예비실험 결과를 참고하여 급수사이클을 통제할 수 있을 것으로 예측된다. 이러한 자동급수/배수의 제어를 통하여 물의 순환주기 단축이 가능하게 되므로 홍화의 발아공정중 발생하는 부패현상을 방지할 수 있고 발아용 설정온도의 상승에 의한 발아공정의 단축이 상당 수준 가능하게 된다.

다. pilot scale의 발아기를 이용한 발아

항온항습기를 이용한 발아조건에서 낮은 발아율의 원인을 분석한 결과, 발아기간 동안에 발생되는 열을 방출시킬 수 없어 품온이 상승하게 되므로 10일이 지나면 부패가 일어나기 시작하였다. 그러므로 pilot scale의 발아기(그림 1-2)에 4시간마다 10℃의 냉각수가 노즐을 통해 비순환식으로 살수될 수 있도록 제작하여 발생된 열을 식혀주는 동시에 자동세척까지 겸할 수 있도록 하였다. 홍화씨를 정선하여 수세한 후 이물질과 먼지 등을 제거시킨 다음, 시료무게의 5배의 증류수에 침지하고, 이 때 물 위에 뜨는 홍화씨는 제거하고(약 20%의 홍화씨에 해당), 불린 홍화씨는 10cm의 두께로 재배통에 담아 20℃±2℃의 온도로 발아시킨 결과 90%의 발아율을 나타냈으며 발아홍화의 사진은 그림1-3에 표시했다.



Figure 1-2. Pilot Scale 발아기



Figure 1-3. 발아홍화

6. 홍화씨의 도정에 의한 발아 촉진

보리도정기(DK108, 대동농기계(주), 한국)에 의한 도정으로 31.5% 정도를 차지하던 seed coat이 15%가량 제거되어, seed coat의 제거가 수월해졌으며 같은 발아조건하에서 발아율도 98%까지 증가하였으며, 발아완료 시간도(5.0cm) 7일 이내로 단축되었다.

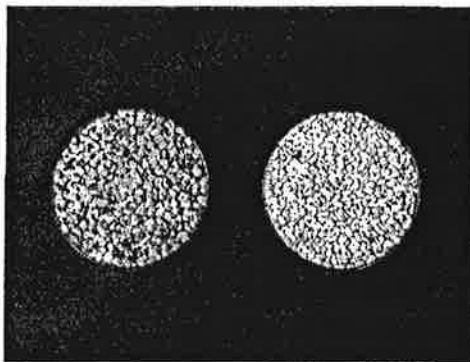


Figure 1-4. Appearance of the safflower seed of before polishing and after polishing.

제 2 절 발아홍화의 기능성

1. 서론

지난 절에서 발아에 따른 항산화력과 항혈전능의 증가를 페놀량의 증가로만 설명하기 어려웠으므로 이의 원인을 알아내고자 비타민 C와 isoflavone의 함량 변화를 조사하였고 또한 골다공증 예방효과, 콜레스테롤 저하효과와 항혈전능을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

발아홍화는 앞의 절에서 제조한 것을 사용하였다. Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA)을 이용하여 얻은 HPLC grade 물을 특별히 명기하지 않았으면 전 연구를 통하여 사용하였다. ADP (adenosine-5'-diphosphate)는 Chrono-log사 제품을 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 analytical grade (Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였다. *in vitro* 항혈전 검정을 위한 Sprague Dawley (SD) male rat 은 삼육 실험동물 연구소에서 구입하여, 한 달 이상 사육하여 무게가 $200\text{ g} \pm 30$ 이상 되는 것을 실험에 사용하였다.

나. 방법

1) 시료 조제

제조된 발아시료는 흐르는 물로 10회 이상 수세한 후

동결건조하여 10mesh(1.18mm)이하로 분쇄한 다음 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

2) 비타민 C 분석

발아 중 비타민 C의 함량 변화는 KFDA(2002)의 방법에 의해 HPLC를 이용하여 분석하였다.

3) isoflavone 분석

isoflavone의 추출은 Kim et al. (2003)의 방법에 따라 하였다. 즉 분쇄한 각 시료 0.1g을 0.1% acetic acid를 포함한 70% ethanol 0.5mL을 넣어 교반하면서 실온에서 24시간 방치하여 추출하였다. 이것을 10,000 x g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.45- μ m membrane(PVDF syringe filter, Whatman, Germany)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. 이때 표준품으로 사용한 isoflavone은 aglycon인 daidzein, glycitein, genistein과 그들의 포도당 배당체인 daidzin, glycitin, genistin과, malonyl-daidzin, malonyl-glycitin, malonyl-genistin, acetyl-daidzin, acetyl-glycitin, acetyl-genistin의 12가지였으며, ODS column(A303, 4.6x250mm, YMC, U.S.A)을 이용하여 HPLC(JASCO, Japan)로 UV detector 254nm에서 측정하였다. 이 때 flow rate는 1.0 mL/min이었으며, 사용된 solvent 조건은 다음과 같다(Table 2-1).

Table 2-1. The mobile phase and the elution program for the HPLC analysis

Time(min)	Solvent composition(%)	
	Solvent A	Solvent B
0	15	85
50	35	65
55	35	65
60	100	0
75	15	85

Solvent A : 0.1% acetic acid in acetonitrile.
 Solvent B : 0.1% acetic acid in water

4) 골다공증 예방 효과

가) 조골세포의 세포증식 실험

(1) 조골세포의 선별 및 세포배양

인체 조골 유사 세포인 MG-63 cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 본 실험에 사용하였다. MG-63 cell 세포를 96 well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 키운 다음 새로운 배지로 갈아주고, 배지는 적정 약물을 처리한 배지로 2일마다 신선하게 갈아주었다.

(2) 골세포의 생존능 측정

실험에 이용된 MG-63 cell의 viability를 측정하기 위해서 Trypan blue exclusion으로 living cell 수를 측정하였다. MG-63 cell은 세포를 6 well plate에 각각 5×10^5 개 씩 키운 다음 새로운 배지로 갈아준 후 멸균수에 녹인 발아홍화 추출액을 최종농도가 0.3g/ml이 되도록 배지에 처리하여 배양하였다. Trypsin처리로 세포를 떼어내어 200×g에서 5분 동안 세포를 원심분리 한 후 HBSS와 trypan blue시약이 1:1이

되는 양으로 현탁시켰다. 5분간 방치한 후 15분 내에 hemocytometer로 세포 수를 counting하였다.

나) 난소절제 쥐 모델을 이용한 골다공증 예방 효과

(1) 동물실험 및 실험식이

체중이 약 250g인 Sprague-Dawley 8주령 암컷쥐를 체중에 따라 난괴법(Randomized complete block design)에 의해 4군으로 나누어 ketamin HCl (유한양행)으로 마취(75mg/kg B.W) (유한양행)으로 마취(75mg/kg BW) 한 후 3군은 양쪽 난소를 절제하는 수술(Ovariectomized group : OVX군)을 실시하고 그 중 한 군을 OVX-Cont군으로 분류하였고 나머지 두 실험군은 각각 홍화씨와 발아홍화를 먹인 OVX-SF와 OVX-GSF로 분류하였다. 난소를 절제하지 않고 개복수술(Sham-operated group : SHAM군)만 한 군을 정상대조군으로 하였다. 실험동물들은 stainless steel wire cage에 분리 사육하였으며, 펠렛형 고형사료로 7일간 적응시켰다. 환경이 조절된 실험동물 사육실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $65\pm 5\%$ 의 전후로 유지시켰고 조명은 06:00~18:00으로 조절하였다.

모든 실험식기와 물은 자유섭취 방법으로 급여하였으며, 홍화씨와 발아홍화의 물추출물을 조제하여 5주간 경구투여(forced feeding)(30mg/kg B.W/day)하였다. 대조군은 0.9% 생리식염수를 매일 5주간 동량씩 경구 투여하였다.

(2) 사료수집 및 분석방법

① 사료의 수집

② 사료섭취량, 체중증가량 및 사료효율

사료섭취량은 일주일에 한 번 사료에 남은 양을 뺀 값을

계산하였고, 체중증가량을 각 군별로 측정하였다. 사료효율은 일주일간의 체중 증가량을 일주일간의 사료 섭취량으로 나누는 값으로 계산하였다.

㉔ 혈액

식이섭취 조건을 일정하게 하기 위하여 도살하기 전 하룻밤 절식시킨 후 안구에서 혈액을 채취한 뒤 경추탈골로 도살하였다. 채취한 혈액은 냉장고(4℃)에서 4시간동안 방치한 후, 5,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액인 혈청을 얻었으며 분석 전까지 냉동보관 하였다.

㉕ 간, 신장, 비장 및 대퇴골

혈액 채취 후 도살한 동물에서 즉시 간, 신장, 신장에 부착되어 있던 지방, 비장 및 대퇴골(Femur)을 각각 적출하였다. 간과 신장에 부착되어 있는 지방의 중량은 생리식염수(0.9% NaCl용액)로 세척하고 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 부위별 무게를 측정하였다.

② 시료분석

㉖ 혈액중의 Ca과 Alkaline phosphatase 활성 측정

뼈 형성(Bone formation)과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 Alkaline phosphatase (Alpase)활성은 IFCC(AMP buffer 이용)법으로 Alkaline phosphate reagents(Bayer, USA) kit를 사용하였고 혈장의 칼슘함량은 Colorimetry법으로 Calcium reagents(Bayer, USA) kit를 사용하여 Chemistry autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 분석하였다. 또한 혈장 osteocalcin 농도는 Osteocalcin kit(Nichols Institute Diagnostics and Immunotopics, Inc. USA)가 사용하였다.

㉔ 대퇴골의 무게, 길이 및 두께

대퇴골의 무게를 측정하고 길이와 길이의 중간부분의 직경은 캘리퍼스를 이용하여 측정하였다. 두께는 대퇴골 길이의 중간부분을 일정하게 측정하였다.

㉕ 대퇴골의 파괴강도(Breaking strength)

왼쪽 대퇴골의 파괴강도와 탄성도 등, 뼈의 물리적 특성을 측정하기 위하여 Texture Analyzer(TA-TX2, Stable micro systems Ltd., England)를 사용하여 뼈길이의 중심부위에서 뼈가 파괴되기까지의 힘의 변화를 일정하게 측정하였다. 분석항목으로는 파괴강도(Force), 면적(Area), 기울기(Gradient), 거리(Distance) 등을 측정하였다.

㉖ 골밀도 (Bone Mineral Density; BMD) 측정

골밀도는 Dual energy X-ray absorptionmetry 측정을 바탕으로 PIXI (GE Medical System, Lunar)를 이용하여 대퇴골(Femur)의 골밀도를 측정하였다.

5) 콜레스테롤 저하 효과

가) HMG-CoA reductase inhibition

(1) 효소원의 조제

Kleinsek 등의 방법(1981)에 따라 효소원을 조제하였다. 실험동물은 4주령의 SD계 수컷 흰쥐를 일주일간 예비사육하여 사육실 환경에 적응시킨 후에 AIN-76 diet를 주어 7일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤 11시에 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간은 ice cold buffer A(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with sucrose 0.2M, dithiothreitol 2 mM)에 g당 2 mL을 첨가한 후 Potter Elvehjem type glass homogenizer로 15초간 full

speed로 균질화 한 다음 15,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 다시 100,000 g에서 75분간 초원심분리하여 상등액을 버리고 흰색의 지방층을 제거하였다. 얻어진 microsome pellet은 buffer A(w/ 50 mM EDTA)를 간 g당 1 mL씩 첨가하여 세척하고 100,000 g에서 60분간 원심분리한 다음 상등액은 버리고 -20℃에서 보관하였다.

-20℃에서 최소 2시간에서 수주간 보관되었던 microsome pellet을 실온에서 해동시킨 후에 buffer B(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with sucrose 0.1M, dithiothreitol 2 mM, KCl 50 mM, EDTA 30 mM)을 3 mL을 가하여 균질화 하였다. 다시 같은 buffer를 7 mL 첨가한 후에 상온에서 15~30분을 방치한 다음 100,000 g, 20℃에서 60분간 초원심분리하여 상등액을 효소원으로 하였고 사용할 때 까지 -70℃에서 보관하였다.

(2) HMG-CoA reductase inhibitory activity 측정

1 mL cuvette에 시료 20μL(control은 DMSO 20μL), 0.5 μM phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM DTT 100μL, 3 mM NADPH 100 μL, 효소원 100μL를 넣었다. 반응액의 온도는 37℃로 일정하게 유지하여 약 10분간 preincubation 한 후에 HMG-CoA(3 mM)을 100 μL 가하여 효소반응을 시작하였다. 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하고 HMG-CoA 대신에 D.W를 가하여 Blank의 흡광도 변화를 기록하였다. 효소의 억제활성은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{억제활성(\%)} = 1 - \frac{(\Delta \text{control} - \Delta \text{control blank})}{(\Delta \text{sample} - \Delta \text{sample blank})} \times 100$$

나) *in vivo* 콜레스테롤 저하효과

(1) 식이조제

식은 AIN-76(American Institute of Nutrition)에 기준하여 표 2-2와 같이 ND의 식이를 제조하였고 (385kcal/100g) 실험군은 비만을 유도하기 위하여 지방을 20%(w/w) 첨가한 고지방식을 실시하였다. 본 연구에 사용한 비만식은 정상식보다 총 에너지 수준이 20% 높고, 지방은 식이 에너지의 40%를 차지하게 제조하였다. 발아홍화시료는 체중 kg 당 100mg과 30mg이 되도록 조제하여 하루에 한 번씩 5주간 경구투여(forced feeding) 하였다.

(2) 시료수집 및 분석방법

(가) 사료섭취량, 체중증가량 및 사료효율

사료섭취량은 일주일에 한 번 사료에 남은 양을 뺀 값을 계산하였고, 체중증가량을 각 군별로 측정하였다. 사료효율(feed efficiency ratio)은 총 실험기간의 체중 증가량을 총 실험기간의 식이 섭취량(g)으로 나누어 계산하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \frac{\text{총 실험기간의 체중 증가량(g)}}{\text{총 실험기간의 식이 섭취량(g)}}$$

(나) 혈액생화학 검사

식이섭취 조건을 일정하게 하기 위하여 도살하기 전 하룻밤 절식시킨 후 안구에서 혈액을 채취한 뒤 경추탈골로 도살하였다. 채취한 혈액은 냉장고(4℃)에서 4시간동안 방치한 후, 5,000rpm에서 20분간 원심분리 하여 상정액인 혈청을 얻었으며 분석 전까지 냉동보관 하였다. 혈중 지질 검사를 위하여 Cholestech LDX 기기 (cholesteck Co., USA)를 이용하여 공복시의 혈당, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중성지방 등을 측정하였다. 간기능 검사를 위하여 혈청 glutamyl pyruvate transaminase(GPT) 활성을 Reflotron plus(Roche, Swiss)기기를 이용하여 측정하였다.

(다) 간, 신장, 비장 및 교환 무게

혈액 채취 후 도살한 동물에서 즉시 간, 신장, 신장에 부착되어 있던 지방, 비장 등을 각각 적출 하였다. 간과 신장에 부착되어 있는 지방의 중량은 생리식염수(0.9% NaCl용액)로 세척하고 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 닦고 부위별 무게를 측정하였다.

Table 2-2. Composition of experimental diets

(Unit : %)

Ingredients	ND	HFD
Casein	20	20
Sucrose	40	40
Corn starch	25	10
Corn oil	5	5
Lard	-	15
Cellulose	5	5
DL-methionine	0.2	0.2
AIN-mineral mixture	3.5	3.5
AIN-vitamin mixture	1.0	1.0
Cholin bitrate	0.3	0.3
Total	100	100

ND: normal diet, HFD: high fat diet.

AIN-76 diet: American Institute of Nutrition. Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. J. Nutr. 107:1340-1348, 1977

6) 항혈전능

가) *in vitro* 항혈전 검정

전 장의 방법에서 기술하였음

나) 마우스 혈전모델에서의 *in vivo* 항혈전 검정

미리 절식시킨 mouse에 시료용액을 경구투여하고, 대조

군에는 식염구를 경구투여한 후 1시간이 지난 후에 collagen 과 epinephrine 혼합액을 꼬리정맥에 주사하여 폐경색을 유발하였다. 주사 후 약 15분간 마비의 지속, 사망 또는 회복 여부를 판정하여 비교하였다(Dimino and Silver, 1983). 저해율은 사망률 감소의 대조구 사망률에 대한 백분율로 하였다.

3. 비타민 C

비타민 C는 토코페롤 등과 함께 강력한 천연의 항산화제로 알려져 있으며 항혈전효과도 있는 것으로 보고되고 있다(Block 등, 1994). 홍화씨의 발아에 따라 비타민 C의 함량이 점차 증가되었으며 발아 10일에는 약 30mg%의 비타민 C가 생성되었으나(그림 2-1), 이 정도 레벨의 함량은 항산화능과 혈소판응집저해능에 기여하는 바는 미미하였다(자료 보고하지 않음).

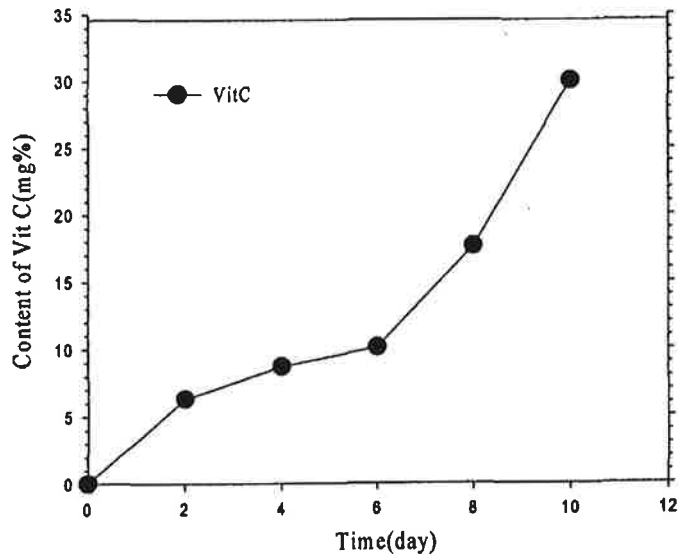


Figure 2-1. Changes in ascorbic acid during germination of safflower seed.

4. isoflavone

표준품을 이용한 HPLC 결과는 그림 2-2과 같다. 발아일에 따른 isoflavone 함량의 변화는 표 2-3와 같다. 발아 10일의 씨의 isoflavone은 aglycone(daidzein과 genistein), glycoside (daidzin과 genistin), malonyl glycoside (m-daidzin과 m-genistin) and acetyl glycoside (a-daidzin, a-glycitin과 a-genistin)으로 구성되어 있었다. 총 isoflavone 함량은 38.6 mg/100g (미발아 홍화씨)에서 873.4 mg/100g과 1238.7 mg/100g (각각 발아 4일과 10일의 홍화씨)로 급격히 증가하였다. Acetyl genistin이 모든 경우 절대적 우위를 나타내는 isoflavone이었다(미발아 씨, 26.6 mg/100g; 4일 발아 씨, 833.0 mg/100g; 10일 발아 씨, 1172.7 mg/100g).

한편 대표적인 isoflavone 함유 식물인 콩의 isoflavone 함량은 발아에 의해 다소 증가하는 경향이 보고되고 있으나 (116.3, 119.4mg/100g에서 153.2, 150.0mg/100g으로 증가, Zhu et al., 2005; 100.0, 108.5, 161.2mg/100g에서 112.5, 116.2, 182.4mg/100g으로 증가, Kim et al., 2005), 본 실험에서의 발아홍화씨의 isoflavone 함량에 비하면 훨씬 작은 양으로 발아홍화씨가 훨씬 좋은 isoflavone 원임을 보여 준다.

상기한 높은 isoflavone 함량이 발아홍화씨의 높은 기능성을 설명하는 것으로 보며 이는 상업적으로도 높은 가치가 있을 것으로 기대된다. 상기한 결과는 HPLC의 retention time에 의한 것으로 추후 LC-mass 등에 의해 확실한 동정이 필요하다.

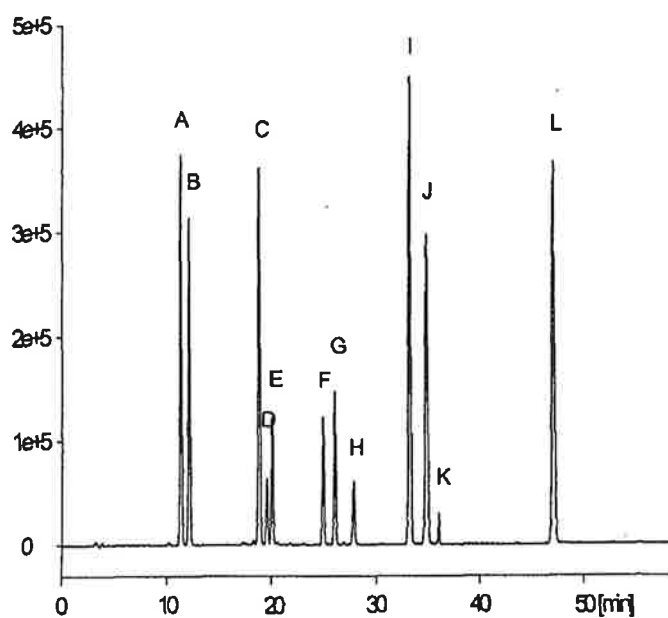


Figure 2-2. HPLC chromatogram of isoflavone standards.
 (A : Daidzin, B : Glycintin, C : Genistin, D : Malonyl-daidzin,
 E : Malonyl-glycitin, F : Acetyl-Daidzin, G : Acetyl-glycitin,
 H : Malonyl-genistin, I : Daidzein, J : Glycitein, K : Acetyl-genistin,
 L : Genistein)

Table 2-3. Effect of germination on isoflavones (mg/100 g) in safflower seeds

isoflavone	Germination time (day)		
	0	4	10
Daidzein	0.5	0.5	0.9
Glycitein	nd	nd	nd
Genistein	2.1	5.3	0.8
Daidzin	nd	nd	1.1
Glycitin	nd	nd	nd
Genistin	0.5	2.0	5.8
Malonyl-daidzin	7.0	25.3	38.1
Malonyl-glycitin	nd	nd	nd
Malonyl-genistin	1.4	6.0	11.5
Acetyl-daidzin	nd	1.0	2.5
Acetyl-glycitin	0.6	0.3	5.6
Acetyl-genistin	26.6	833.0	1172.7
Total	38.6	873.4	1238.7

nd: not detected

5. 골다공증 예방 효과

가. 세포배양에 의한 골밀도 개선효과

신체의 노화와 세포 스트레스는 조골 및 파골세포의 균형 이상을 초래하여 골생성과 골흡수의 길항작용에 영향을 미쳐 골다공증과 뼈의 유연성을 급격히 저하시킨다. 즉 부갑상선 호르몬(PTH)에 대한 감수성을 증가시켜 부신피질계 호르몬이 조골세포의 기능을 억제하며 조골세포에 의해 생성되는 type 1 collagen 합성유전자 억제 및 collagenase 유전자 발현을 통해 골 기질 물질을 파괴한다. 또한 PTH는 세포성장과 관련이 있는 growth factor들인 IGF1, IGFBP-5의 발현을 억제하여 TGF- β 수용체에 대한 신호전달을 억

제함으로써 조골세포에서의 collagen 생합성을 억제하고 alkaline phosphatase의 활성 억제, protein kinase A의 활성 억제 등에 영향을 미쳐 조골세포의 분열과 증식을 억제한다. 따라서 조골세포의 생존능력 실험을 통하여 골밀도 개선효과를 시험하였다. 그림 2-3에 나타난 바와 같이 인간 유사 조골세포주인 MG-63 cell에 대한 시료의 조골세포 증식능을 검색한 결과, 발아홍화시료를 첨가한 경우 증식효과가 유의성있게 증가하였으며, 특히 발아 10일째의 시료첨가구는 세포배양 48시간 후에 대조구의 120%의 조골세포 생존능을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러나 발아시키지 않은 홍화씨를 첨가한 실험구에서는 세포증식이 없는 것으로 확인되었으며, 또한 발아홍화를 첨가한 모든 처리구에서는 대조구에 비하여 세포 증식능이 양호하였으므로 독성은 없는 것으로 판단되었다.

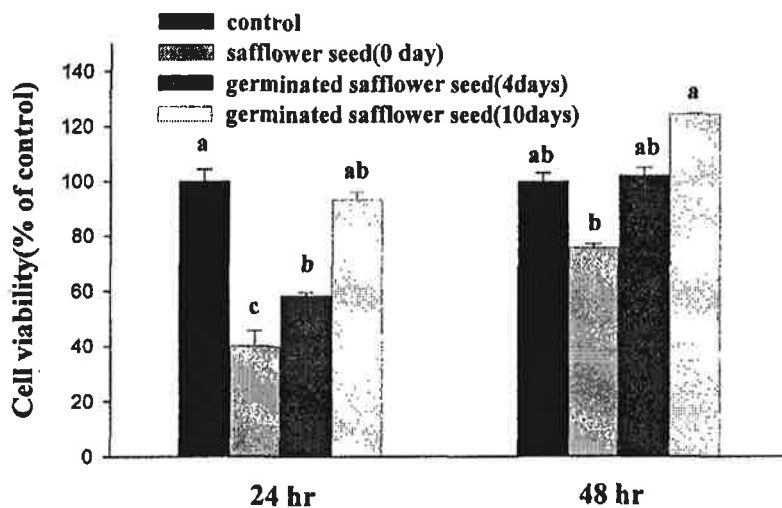


Figure 2-3. Cell proliferation effect of SF and GSF on MF-63, human osteoblast cells.

나. 난소절제 쥐 모델을 이용한 골다공증 예방 효과

1) 식이 및 중체량 분석

실험식이를 5주간 섭취한 흰쥐의 체중변화, 식이섭취량, 사료효율은 표 2-4와 같다.

실험에 들어가기 전에 난과법에 따라서 분류해놓은 군들의 초기 무게는 어떤 유의적인 차이도 보이지 않았으나 사료섭취 5 주 후에는 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$). 대조군 중 난소를 절제하지 않았으나 개복만 하여 스트레스를 준 군과 정상군은 체중이 증가하지 않은 반면에 수술 후 난소를 절제한 OVX-Cont에서는 체중증가량이 90.5g이나, 유의적으로 매우 높은 증가율을 나타냈다. 이는 난소절제에 따른 난소호르몬의 분비감소로 인하여 식이 섭취량이 증가되고 체지방이 축적되어 비만이 초래된다는 보고(Wronski 등, 1988)와 같은 결과였다. 5주 동안 SF(OVX-SF)와 GSF(OVX-GSF)를 섭취시킨 경우에는 OVX-Cont보다 약 반 정도의 체중증가를 보였으며, Sham보다도 ($64.4 \pm 8.6/5$ weeks) 훨씬 적은 체중증가율을 보여 체중증가와 관련된 비만억제효과도 검토할 필요가 있다고 사료된다.

5주간의 총 사료 섭취량을 체중증가량으로 나누어 판단하는 실험동물의 사료효율(FER, Feed efficiency ratio)은 난소를 절제한 대조군이 0.13 ± 0.01 이었고 난소절제하지 않고 개복만 실시한 대조군은 0.09 ± 0.01 이였으며 SF(OVX-SF)와 GSF(OVX-GSF)의 FER은 0.07로 나타나 홍화시료를 섭취시킨 경우에는 사료효율이 낮은 것으로 나타났다.

Table 2-4. Initial and final body weights, body weight gain, feed intake, and feed efficiency ratio of rats fed the experimental diets for 5 weeks

Samples	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Body weight gain (g/5 weeks)	Feed efficiency ratio
OVX-Cont	273.8±15.3 ^{NS}	364.3±22.1 ^a	90.5±16.2 ^a	0.13±0.01 ^a
Sham	270.9±15.2	335.3±16.0 ^{ab}	64.4±8.6 ^b	0.09±0.01 ^b
OVX-GSF	270.9±16.2	314.4±32.2 ^b	43.5±24.6 ^c	0.07±0.06 ^c
OVX-SF	273.8±15.3	316.8±24.2 ^b	43.0±14.5 ^c	0.07±0.01 ^c

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean ± Standard deviation

NS: not significant

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

체중증가는 난소 호르몬의 분비감소로 인해 체지방이 축적되어 비만을 초래하는 난소절제동물의 특성을 나타낸 것으로 해석할 수 있다. 식이효율은 대조구에 비하여 실험구가 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 경향을 나타냈다. 사료섭취량은 유의적인 차이는 없었다. (Kim, 2004)

2) 장기의 무게변화

실험동물들로부터 적출된 장기의 체중 100g당 무게는 표 2-5와 같다. 간의 무게는 OVX-Cont 군이 $2.83 \pm 0.24g$ 으로 유의적으로 가장 높았고, OVX-SF군이 2.20 ± 0.12 으로 가장 낮았다. 신장과 비장의 경우에도 체중 100g당 무게가 OVX-Cont 보다 OVX-SF군과 OVX-GSF군에서 낮은 것으

로 나타났다. 신장에 붙어있는 신장지방을 분리하여 체중당 지방무게를 측정한 결과, OVX-Cont은 $4.79 \pm 0.07g$ 을 나타낸 반면, Sham군은 $2.51 \pm 0.14g$ 으로 가장 적었으며 OVX-GSF가 OVX-SF보다 더 지방함량이 적은 것으로 확인되었다.

Table 2-5. Comparison of weight of liver, kidney, spleen and fat of kidney by diet groups

Samples	Liver(g)/100g	Spleen(g)/100	Kidney(g)/100g	Fat of
	B.W	g B.W	B.W	kidney(g)/100g B.W
OVX-Cont	2.83 ± 0.24^a	2.58 ± 0.05^a	0.82 ± 0.04^a	4.79 ± 0.07^a
Sham	2.43 ± 0.20^b	2.39 ± 0.03^{ab}	0.66 ± 0.03^{ab}	2.51 ± 0.14^c
OVX-GSF	2.29 ± 0.20^{bc}	1.87 ± 0.02^c	0.58 ± 0.04^b	3.66 ± 0.07^b
OVX-SF	2.20 ± 0.12^c	2.07 ± 0.01^b	0.57 ± 0.04^b	3.08 ± 0.07^{bc}

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean \pm Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

3) 골격대사와의 관련인자 (혈청 칼슘 및 Alkaline phosphatase, ALP)

혈청의 칼슘 및 ALP함량은 표 2-6과 같다. 혈청 alkaline phosphatase(ALP)는 골형성지표로서 대사성 골질환 등 골대사회전이 활발할 때 즉, 골의 재형성시 조골세포의 활동이 증가되어 골교체율이 빠를 때 혈청내 농도가 증가되는 것으로 가장 흔하게 이용되는 골형성 지표로 50%정도가 뼈로부터 유리되어 나오고, 간질환이나 단순한 골화이상에 의해서도 증가될 수 있다. 이와 같은 결과로 볼 때 난소를 절제하지 않은 군보다 난소를 절제한 군에서 골교체율이 빠르고

골손실이 많다고 볼 수 있다. 주(1989)의 연구에서 혈청 AlPase 활성은 연령이 많아짐에 따라 활성이 증가하여 폐경 전 40대 여성에 비해 폐경 후 50대, 60대 여성에게서 직선적인 증가를 보였고 특히 60대는 40대에 비해 유의한 증가를 보인다고 하였다. Aloia 등(1985)의 연구에서도 AlPase의 활성과 골질량은 음의 상관관계를 나타내었다고 보고하였다. 난소절제에 의한 ALP의 활성증가는 Arjmandi 등(1996)과 Raisz(1988)에 의해서도 보고되었다. 홍화시료를 투여한 군에서의 ALP의 활성은 난소를 절제하지 않은 Sham군에서와 비슷한 수준을 나타냈으며, OVX-Cont군은 $62.5 \pm 3.62 \text{ U/L}$ 로 유의적으로 가장 낮은 수준이었다. 난소를 절제하여 골다공증을 유발시킨 쥐에게 발아홍화시료를 급여하였을 때 ALP 활성이 감소되는 것으로 보아 이는 골교체율을 감소시켜 골손실을 지연시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

혈청중의 칼슘함량은 모든 군에서 유의적인 차이는 없었다. 이는 혈청 중 칼슘 농도의 항상성 유지작용에 의한 것으로 보여진다. 폐경 후에는 에스트로겐의 분비가 감소하고 부갑상선 호르몬에 대한 골격의 반응도가 증가하여 골의 재흡수가 일어나며 칼슘의 흡수율은 감소하고 배설량은 증가하게 된다. Donahue 등(1988)이 난소를 절제한 개에게 난소절제 후 0.02%, 1.0%의 칼슘을 8주 동안 공급했을 때 혈청 칼슘 농도에 차이가 없었으며, Hietala(1993)도 3개월된 Wistar rats에게 난소절제 후 칼슘 수준이 정상인 식이를 10주 동안 공급하였을 때 난소절제 유무에 따른 혈청 칼슘 농도는 차이가 없었다고 보고하였다. 따라서, 혈중 칼슘농도는 끊임없는 내·외적 변화에 대응하여 작은 범위에서 항상성을 유지하기 때문에 실험요인을 변화시켜도 칼슘농도는 보통 정상범위 내에 있다고 할 수 있다.(Mona Shiess, 1993), Bess, 1987).

혈장 Osteocalcin의 함량도 골형성지표로서 유아는 성인보다

낮고 폐경기 이후에는 증가되며, 갑상선호르몬이나 성장호르몬, Vit D, 부갑상선호르몬 등 분비 증가시에도 수준이 증가되는 것으로 알려져 있다.

Table 2-6. Calcium and alkaline phosphatase(ALP) activity in serum of experimental rats

Samples	Ca(mg/dL)	P(mg/dL)	Ca/P raio	ALP (U/L)	Osteocalcin (ng/mL)
OVX-Cont	11.15±0.97 ^a	6.83±0.69 ^b	1.64±0.21 ^{ab}	84.14±15.22 ^a	6.70±1.01 ^a
Sham	12.92±0.73 ^a	6.68±0.56 ^b	1.94±0.13 ^a	73.57±8.78 ^{ab}	6.00±0.61 ^{ab}
OVX-GSF	11.63±0.29 ^a	7.15±0.70 ^{ab}	1.64±0.17 ^{ab}	62.5±3.62 ^b	5.61±0.70 ^b
OVX-SF	12.25±1.89 ^a	8.47±0.96 ^a	1.46±0.14 ^b	72.33±5.81 ^{ab}	5.90±0.70 ^{ab}

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

4) 대퇴골의 중량과 길이 및 두께

대퇴골(Femur)의 중량, 길이, 중간부위의 직경 등을 측정 한 후 통계 처리한 결과는 표 2-7와 같다. 대퇴골의 중량 및 대퇴골의 두께에서 난소 절제한 군과 절제하지 않은 모든 군에서 유의적인 차이는 두드러지게 나타나지 않았다. 뼈의 길이는 OVX-Cont군에 비하여 홍화시료의 경우 약간 상승하였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 100g 체중당 대퇴골의 중량을 비교한 수치에서도, 홍화시료를 섭취한 군과 OVX-Cont군간에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 2-7. Wet weight, length and thickness of femur

Samples	Wet wt. (g)	Length (mm)	Thickness (mm)	Wet wt. femur(g)/100g B.W
OVX-Cont	0.792±0.07 ^{NS}	34.61±0.46 ^{NS}	3.04±0.14 ^{NS}	2.51±0.02 ^b
Sham	0.858±0.07	35.28±1.07	3.14±0.17	3.01±0.01 ^a
OVX-GSF	0.826±0.06	35.61±1.24	3.02±0.23	2.64±0.01 ^b
OVX-SF	0.807±0.03	35.60±0.66	3.01±0.08	2.61±0.01 ^b

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean ± Standard deviation

NS: not significant

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

5) 대퇴골의 파괴강도 (Fracturability)

홍화시료를 투여한 쥐의 대퇴골에서 일어난 변화를 물리적 방법에 의하여 측정하는 파괴실험은 대퇴골의 파괴에 필요한 최고점을 나타내는 force(g), 파괴될 때까지의 시간과 힘을 적분한 면적을 나타내는 area(g·s), 파괴에 이르는 최고점에 이르기까지의 기울기를 나타내는 gradient(g/s), 그리고 파괴에 이르기까지 칼날형 probe가 진행한 거리를 나타내는 distance(mm)를 분석하였다(표 2-8).

난소를 절제한 후 홍화시료를 투여한 OVX-SF와 OVX-GSF군들과 대조군의 대퇴골의 파괴강도를 살펴보면 난소를 절제한 대조군의 경우 9466.32±1598.78g의 힘에 의하여 대퇴골이 절단되었으며 OVX-SF와 OVX-GSF에서는 각각 11276.76±1670.70과 11311.83± 1210.10g의 힘에 의하여 대퇴골이 절단되어 이들 간에 유의적인 차이가 나타났다. 또

한 발아홍화를 섭취한 경우에는 난소를 제거하지 않은 Sham군 보다도 골강도가 약간 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 파괴가 이루어진 최대치(peak or rupture strength)보다는 파괴가 이루어진 최대점까지의 적분값인 area($g \cdot s$)로 실제적인 강도를 나타내는 경우가 많은데(Bourne, 2002), 이 경우에도 홍화시료를 투여한 군이 OVX-Cont보다 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 또한 대퇴골을 파괴하는 파괴점까지의 거리(distance)에 있어서도 대조군에 비해서 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이는 대퇴골이 파괴되기까지 더 많은 변형력을 요구한다는 것을 의미하며 뼈의 탄성(springiness)이 증가된 것이라고 판단할 수 있다. 뼈의 조직은 외부의 힘에 의하여 변형되나 외부의 힘을 제거하면 원래의 상태로 복귀하려는 내부의 힘(내부응력)에 의하여 일정한 한계변형 이하에서는 조직이 원상태로 복귀하는 탄성변형(elastic deformation)을 일으키지만, 이러한 탄성한계(elastic stress limit)를 넘으면 원래상태로 복귀할 수 없게 되는 것이다. 그러나 한계변형 이하에서는 조직이 원상태로 복귀할 수 있는 탄성변형(elastic deformation)이 가능하다. 따라서 동일한 외부의 압력이 뼈의 외부에서 주어졌을 때, 탄성한계치가 높아 부러지거나 파열되는 확률을 낮출 수 있다는 의미로 해석될 수 있다.

결론적으로, 난소 절제 후 일정 수준이상의 칼슘제재를 급여한 실험군은 대퇴골의 파괴에 대응하는 탄성도가 증가되었으며 뼈의 파괴강도 및 기울기와의 관련요소에서도 동일한 효과를 얻을 수 있는 것으로 판단된다.

Table 2-8. Determination of breaking strength of the femur

Samples	Force(g)	Area(g · s)	Grad.(g/s)	Dist.(mm)
OVX-Cont	9466±1598 ^b	6733±1183 ^b	7245±966 ^{NS}	1.28±0.15 ^b
Sham	11157±2035 ^{ab}	8719±1902 ^a	7545±978	1.47±0.10 ^a
OVX-GSF	11311±1210 ^a	8859±1864 ^a	7667±740	1.50±0.16 ^a
OVX-SF	11276±1670 ^{ab}	8594±3355 ^a	7614±1053	1.48±0.25 ^a

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean ± Standard deviation

NS: not significant

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

6) 대퇴골의 골 무기질 밀도(BMD) 측정

대퇴골의 BMD와 BMC는 표 2-9과 같이 발아홍화시료를 투여한 경우에 $0.201 \pm 0.003 (\text{g}/\text{cm}^2)$ 로 나타나 난소를 절제한 OVX-Cont보다 유의적으로 골밀도가 증가된 것으로 확인되었으며, 이 경우 BMC는 난소를 절제하지 않은 Sham 군보다도 유의적으로 높았다.

Table 2-9. Bone mineral density(BMD) and bone mineral content(BMC) of femur

Samples	BMD(g/cm ²)	BMC(g/cm ²)
OVX-Cont	0.193±0.003 ^b	0.407±0.01 ^b
Sham	0.201±0.005 ^a	0.416±0.01 ^b
OVX-GSF	0.201±0.003 ^a	0.435±0.01 ^a
OVX-SF	0.193±0.002 ^b	0.418±0.01 ^b

*Sham : Sham operation, OVX : ovariectomy

Values are mean ± Standard deviation

BMD, bone mineral density; BMC, bone mineral content

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

6. 콜레스테롤 저하 효과

가. HMG-CoA reductase inhibition

혈중 cholesterol 함량을 낮출 수 있는 방법은 간에서 cholesterol 합성에 관여하는 효소중 HMG-CoA reductase의 activity를 inhibition 하는 것으로서, HMG-CoA reductase는 스테롤이나 이소프레노이드계 화합물의 생합성 경로의 중간 단계인 mevalonic acid 합성을 매개하므로, 이 효소의 활성을 억제하면 콜레스테롤 생합성 속도를 늦추게 되고, 따라서 콜레스테롤 과잉혈증의 치료에 효과적으로 이용할 수 있는 것으로 알려져 있다.

즉 콜레스테롤 생합성과정의 속도조절 효소인 HMG-CoA reductase는 기질인 HMG-CoA를 mevalonate와 CoA-SH로 전환시킨다. 이 효소의 활성저하는 간의 LDL-receptor의

활성을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 보고되어 있다. 이와 동시에 고지혈증개선제로서 콜레스테롤 합성저해제에 관한 연구가 다각적으로 이루어지고 있다 (Quershi, 1986).

식생활의 영향으로 증가되고 있는 고콜레스테롤혈증의 치료제들은 체내 콜레스테롤 합성 저해제들로 대부분 미생물에 의해 합성되거나 유기합성에 의한 것으로 장기적으로 사용시에는 부작용이 있는 것으로 확인되었다 (Illingworth, 1988). 그러므로 최근 생약이나 식용식물로부터 지질강하효능을 갖는 물질을 찾아내는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Huang, 1993).

곡류 및 그 부산물이 체내 콜레스테롤 함량을 저하시키는 작용은 주로 식이섬유의 작용에 기인한다고 산발적으로 보고되고 있으며 (Quershi, 1980), 밀, 보리, 옥수수 외피, oat bran, 메밀, 울무 등도 생체내 콜레스테롤 저하작용이 있는 것으로 보고하고 있다. 또한 이러한 활성은 식품중의 식이섬유인 β -D-glucan과 phenolic acids, flavonoids, tannins 등을 비롯한 phenolic compounds 그리고 tannin등이 다량 함유되어 있는 것에 기인되고 있다고 보고하고 있다 (Choi, 1994).

탈지한 홍화씨 및 발아시료에 10배의 물을 가하여 80℃에서 16시간 shaking 한 다음 여과하여 감압건조시킨 물 추출물을 200 μ g/assay되게 첨가하여 HMG-CoA reductase 억제활성을 검색한 결과 Table 1과 같은 결과가 나타났다. 발아하지 않은 홍화씨는 (200 μ g/ml)의 농도에서 13.9%의 낮은 저해활성을 보였으나 발아가 진행되면서 저해활성이 급격하게 증가되는 경향을 보였다. 발아 4일째에는 42%의 저해활성을 나타냈으며, 발아 10일째에는 58.4%의 높은 저해활성을 보였다. 따라서 발아홍화시료는 *in vitro* test상에서 동물의 콜레스테롤 생합성 과정의 속도조절 효소인

HMG-CoA reductase 활성을 억제함으로써 혈중콜레스테롤을 저하시키는데 효과적일 수 있을 것으로 생각되어 atherogenic risk factor에도 영향을 줄 것으로 보여 *in vivo* test를 실시할 예정이다. 또한 효소활성물질의 확인을 위해 앞으로 저해물질의 분리와 정제 그리고 구조를 확인하기 위한 연구도 필요할 것으로 판단된다.

Table 2-10. The inhibitory effect of water extracts of germinated safflower seeds on the microsomal HMG-CoA reductase activity

Germination time(days)	Inhibition rate(%)
0	13.9±2.17 ^c
4	42.4±3.37 ^b
8	41.3±2.68 ^b
10	58.4±2.11 ^a

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

나. *in vivo* 콜레스테롤 저하 효과

1) 식이 및 증체량 분석

고지방 실험식을 5주간 섭취한 흰쥐의 체중변화, 사료효율은 Table 2-11과 같다.

5주 동안 GSF(germinated safflower seed)를 섭취시킨 경우, 대조군만큼 체중증가를 보였으나, 5주간의 체중증가량을 총사료 섭취량으로 나누어 판단하는 실험동물의 사료효율(FER, Feed efficiency ratio)은 고지방식이군 (0.21 ± 0.03)보다

훨씬 낮은 것으로 나타났으며, 또한 경구투여한 GSF의 농도증가에 따라 사료효율이 낮아지는 것으로 나타나 체중증가 억제효과가 있을 것으로 생각된다.

Table 2-11. Initial and final body weight, body weight gain and feed efficiency ratio of rats fed the experimental diets for 5 weeks

Dietary group	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Body weight gain(g/5weeks)	Feed efficiency ratio
control	215.0±6.9 ^a	325.6±17.5 ^c	110.6±13.2 ^b	0.11±0.02 ^c
HF	215.7±7.0 ^a	397.9±19.5 ^a	182.2±16.3 ^a	0.21±0.03 ^a
HFGSF1 ¹⁾	215.2±4.2 ^a	395.5±23.7 ^a	180.3±15.5 ^a	0.15±0.02 ^b
HFGSF2 ²⁾	215.0±4.4 ^a	396.2±24.2 ^a	181.6±15.1 ^a	0.16±0.02 ^b

Food efficiency ratio (FER) : weight gain (g/5weeks) / food intakes (g/5weeks)

Values are mean ± Standard deviation (n=8)

¹⁾HFGSF1: HFD + feed of germinated safflower seed (100mg/kg body weight)

²⁾HFGSF2: HFD + feed of germinated safflower seed (30mg/kg body weight)

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

2) 장기의 무게 변화

실험동물들로부터 적출된 장기의 체중 100g당 무게는 Table 2-12와 같다. 간과 신장 그리고 비장의 무게는 실험구간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 신장에 붙어있는 신장지방을 분리하여 체중당 지방무게를 측정한 결과, 고지방식이 대조구(HF)에 비하여 GSF 실험구가 다소 낮은 경향을 나타냈다.

Table 2-12. Weight of major organs of rats fed high fat diet for 5 weeks

Dietary group	Liver	Kidney	Spleen	Testis	Fat in kidney	Fat in testis
	(g/100g body weight)					
control	3.92±0.22 ^a	0.62±0.02 ^a	0.18±0.03 ^a	0.73±0.02 ^a	1.20±0.03 ^c	0.95±0.01 ^b
HF	4.07±0.28 ^a	0.64±0.01 ^a	0.18±0.02 ^a	0.74±0.02 ^a	1.50±0.03 ^a	1.04±0.01 ^a
HFGSF1 ¹⁾	4.15±0.37 ^a	0.66±0.02 ^a	0.18±0.03 ^a	0.76±0.03 ^a	1.43±0.02 ^b	1.08±0.01 ^a
HFGSF2 ²⁾	4.34±0.34 ^a	0.63±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a	0.84±0.04 ^a	1.46±0.02 ^b	1.18±0.01 ^a

Values are mean ± Standard deviation (n=8)

¹⁾HFGSF1: HFD + feed of germinated safflower seed (100mg/kg body weight)

²⁾HFGSF2: HFD + feed of germinated safflower seed (30mg/kg body weight)

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

3) 혈청지질 검사

혈장 중 중성지방은 LDL-C입자크기를 변화시켜 동맥경화증을 촉진하며, 총 콜레스테롤, LDL-C와 중성지방의 혈장농도는 HDL-C 수준과 역의 관계를 가지는데 동물실험 결과 HDL-C은 콜레스테롤의 동맥경화 진행과정을 방해하거나, 동맥경화 병변의 콜레스테롤을 제거하는 항동맥경화인자로 알려져 있다. 발아홍화시료를 섭취한 실험동물의 혈청 중 총지질함량(TG, total glyceride) 및 총콜레스테롤(Total cholesterol)은 Table 2-13과 같다. 혈청 TG와 TC는 고지방식이 대조군보다 낮은 경향을 보였으며, 특히 HDL 콜레스테롤은 대조구보다 GSF1(100mg/kg body weight)의 경우에 대조구보다 높은 것으로 나타났다. 그러나 LDL 콜레스테롤은 대조구(HF)와 실험구가 비슷한 것으로 나타났다. 혈중 총콜레스테롤과 중성지질함량은 발아홍화군(HFGSF1,

HFGSF2)이 대조군(HF)에 비해 높게 나타나 발아홍화군이 동맥경화에 대한 보호효과가 있음을 확인하였다. 따라서 발아홍화의 보충식은 고지방콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 혈장 중성지방과 콜레스테롤 농도저하를 유도하였으며, 혈장 HDL-C농도 수준을 높여 주는 효과를 나타냈다.

Table 2-13. Effects of germinated safflower seed on plasma lipids concentration of rats fed high fat diet for 5 weeks

Dietary group	TG (mg/dL)	Total chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
control	174.19±11.2 ^d	123.0±1.8 ^c	50.6±2.1 ^a	17.64±1.8 ^b
HF	207.4±10.5 ^a	159.4±1.2 ^a	40.8±2.0 ^c	21.3±2.1 ^a
HFGSF1 ¹⁾	183.0±9.2 ^c	142.2±1.4 ^b	44.4±1.5 ^b	19.8±1.2 ^a
HFGSF2 ²⁾	194.0±10.1 ^b	153.4±1.2 ^{ab}	41.4±1.2 ^{bc}	21.0±2.5 ^a

Values are mean ± Standard deviation (n=8)

¹⁾HFGSF1: HFD + feed of germinated safflower seed (100mg/kg body weight)

²⁾HFGSF2: HFD + feed of germinated safflower seed (30mg/kg body weight)

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

7. 항혈전능

가. *in vitro* 항혈전 검정

전 장에서 기술하였음

나) *in vivo* 항혈전 검정

시료를 다양한 양으로 경구투여하고 항혈전 작용을 검색한 결과는 Table 2-14와 같다. 각 물질의 투여량에 따른

작용강도가 dose-dependent로 차이를 보였으며 250mg/Kg 투여구는 15분 이내 회복율이 25%였으며 5분 이내 사망률은 10%였다. 500mg/Kg에서는 15분 이내에 회복율이 50%, 5분 이내 사망률이 15%로 나타나 아스피린 투여군보다는 약하나 증상개선 효과가 있는 것으로 나타났으며 또한 농도의존적으로 강도의 차이를 나타냈다. 또한 양성대조군인 aspirin도 농도에 따라 작용강도의 차이를 나타내는 것이 관찰되었다. 따라서 본 시료가 아스피린과 같은 약물이 아니고 또한 이스피린이 갖는 사용상의 제한인 소화성 궤양이나 신장장애 환자들은 사용할 수 없는 점 등을 고려하면 본 시료가 새로운 항혈소판제로서의 개발 가능성이 있을 것으로 보인다.

Table 2-14. Inhibitory effect of various samples on collagen/epinephrine thrombotic death

Samples	Dosage (mg/kg)	Treated group died/total	% inhibition
Control (saline)	0	9/11	-
	500	3/8	54.2
GSF	250	4/8	38.9
	100	6/8	8.3
	50	0/8	100
Aspirin	50	0/8	100
	25	1/8	84.7

*Each sample or aspirin was administered orally one hour prior to the thrombotic challenge.

제 3 절 발아 홍화의 분말화 및 추출

1. 서론

발아가 종료된 홍화의 소재화를 위해서는 다양한 형태의 제품형태에 적합하도록 건조과정을 거쳐 분말형태를 취하는 것이 바람직하며 가공공정의 비용적 측면에서도 상대적으로 유리하다. 또한 이러한 건조 및 분쇄과정은 필수적으로 유용성분의 소실과 감량이 발생하기 때문에 이러한 손실을 최소화할 수 있는 공정의 선택이 중요하다. 분말형태 외에도 습식 추출도 검토하였다.

2. 분말화를 위한 건조 방법 비교

동결건조는 냉풍건조에 비해 설비비나 운전비가 비싸게 들어간다는 단점이 있으므로 본 연구에서는 자연냉풍에 의하여 발아시료를 건조한 후, 식품학적 품질 특성을 냉동건조법으로 처리한 시료와 비교 평가하였다. 각 방법에 의해 건조된 시료를 10mesh로 분쇄한 후 Color and Color difference meter(Chroma Meters CR-300, Minolta Camera Co., Japan)로 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)값을 측정하였다. 이 때 사용한 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 97.76, -0.51, +1.88이었다.

냉풍건조된 분말은 동결건조된 분말의 색도에 비하여 명도가 약간 낮았으며, 비교적 적색도 값이 높게 증가되고 황색도는 낮은 것으로 나타났다(표 3-1). 위의 결과로 볼 때 동결건조된 시료보다 냉풍건조된 시료의 경우 맛과 향, 색에 있어서 약간 떨어지는 것으로 나타났으나 Total phenol 함량은 건조방법에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 3-1. Changes of surface color for germinated safflower powder by drying conditions

Condition	Color Value*			Total phenol (%)
	L	a	b	
Freeze drying	75.31±1.24	-0.07±0.01	+24.75±0.11	3.42±0.25 ^a
Cool-air drying	70.31±0.84	+1.14±0.01	+20.19±0.13	3.34±0.30 ^a

* L : Lightness

a : A plus value indicates redness, and a minus value greeness

b : A plus value indicates yellowness, and a minus value blueness

Mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

3. 초미세분쇄 및 공기분급을 이용한 발아홍화의 분급

가. 재료 및 방법

1) 발아홍화의 조분쇄

건조된 발아홍화를 초미세분쇄를 하기 위한 입자크기의 분말로 만들기 위해 Hammer mill(경창기계, 한국)을 사용하여 100 μ m 정도로 조분쇄 하였다. 초미세분쇄의 효율은 원료 입자의 입도에 따른 영향을 받기 때문에 예비실험을 통하여 적정입도를 설정하였다.

2) 초미세분쇄 및 공기분급

평균입도 100 μ m 정도로 조분쇄한 발아홍화 분말은 Impact mill(Model 100 ZPS, Alpine Aktiengesellschaft Augsburg, Germany)을 이용하여 Cut off wheel speed(COWS)를 12,000 rpm으로 초미분쇄한 뒤 Air classification system

(Turboplex Classifier, model 50 ATP, Germany)을 부착하여 그림 3-1과 같이 분급하였다. 분급과정을 통하여 회수된 미세분말을 "F" (미분획: Fine fraction)로 표시하였고, 입자가 훨씬 큰 조분말을 "C" (조분획: Coarse fraction)로 표시하였다. 예를 들어 2,000 rpm에서 미분으로 회수된 분획을 2,000F, 조분으로 회수된 분말을 2,000C로 표시하였다.

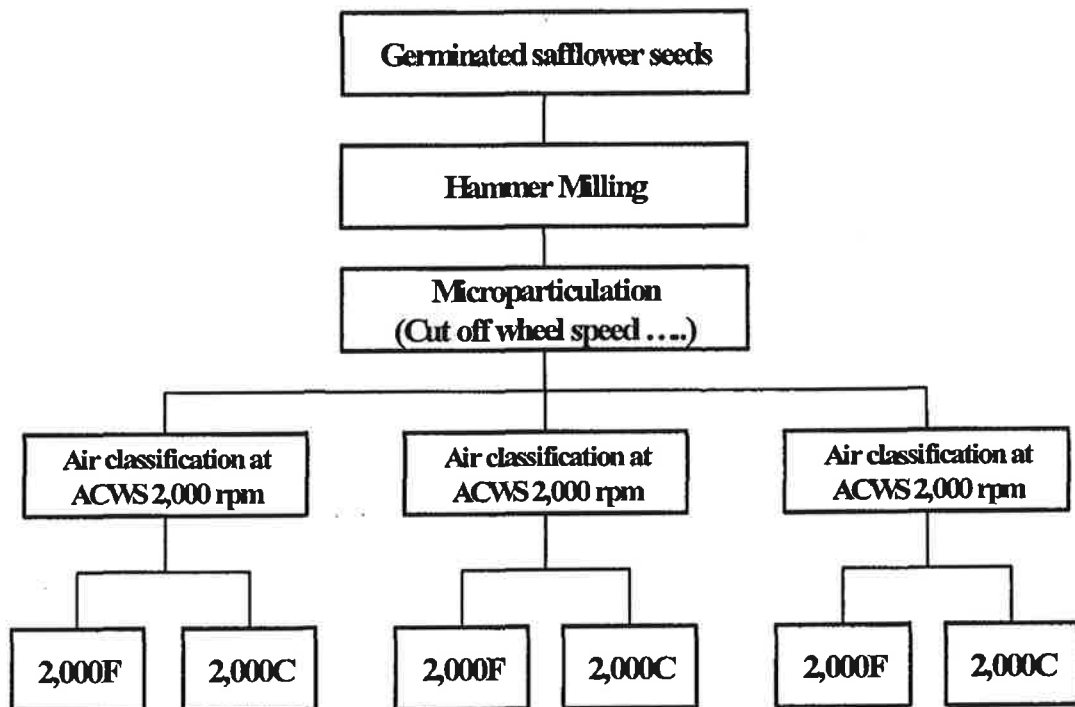


Figure 3-1. Microparticulation and air-classification scheme of germinated safflower seeds.

3) 발아홍화분말의 입도분석

발아홍화분말의 입자크기 분석은 Particle size analyzer(Compagnie Industrielle Des Lasers, CILAS 1064, France)을 이용하여 측정하였다. 분체의 수분흡수에 의한 입도의 증가방지를 위하여 분산매로는 95% 에탄올을 이용하였다.

4) 분체의 표면분석(SEM)

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체 표면의 특성을 관찰하였다. 준비된 시료는 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시킨 후 15 kV에서 관찰하였으며 대표적인 화상을 즉석필름(FP-3000B⁴⁵, 9×12 cm, Fuji, Japan)으로 출력하여 표면의 형태를 비교분석하였다.

5) 발아홍화의 색도분석

발아홍화의 분쇄 및 분급에 의하여 회수한 분획에 대한 색도분석은 색차계(Chroma meter, Minolta, Japan)를 이용하여 백색도(L, lightness), 적색도(a, redness) 및 황색도(b, yellowness) 값을 측정하였다.

나. 결과

1) 발아홍화분말의 입도 분석 및 회수량

겉질과 함께 8,000rpm에서 분쇄한 발아홍화의 평균입도(Mean)는 38 μ m 수준이었으며 ACWS 6,000rpm 및 8,000rpm에서 분급하여 각각 조분획(Coarse fraction)과 미분획(Fine fraction)으로 분획하였다(그림 3-2).

공기분급에 의하여 6,000rpm에서의 미분획 평균입도는 15.47 μ m로서 8,000rpm에서의 14.85 μ m보다 큰 것으로 나타났

으나 조분획의 경우 오히려 8,000rpm의 조분획에서의 평균 입도가 약간 큰 것으로 나타났다(표 3-2).

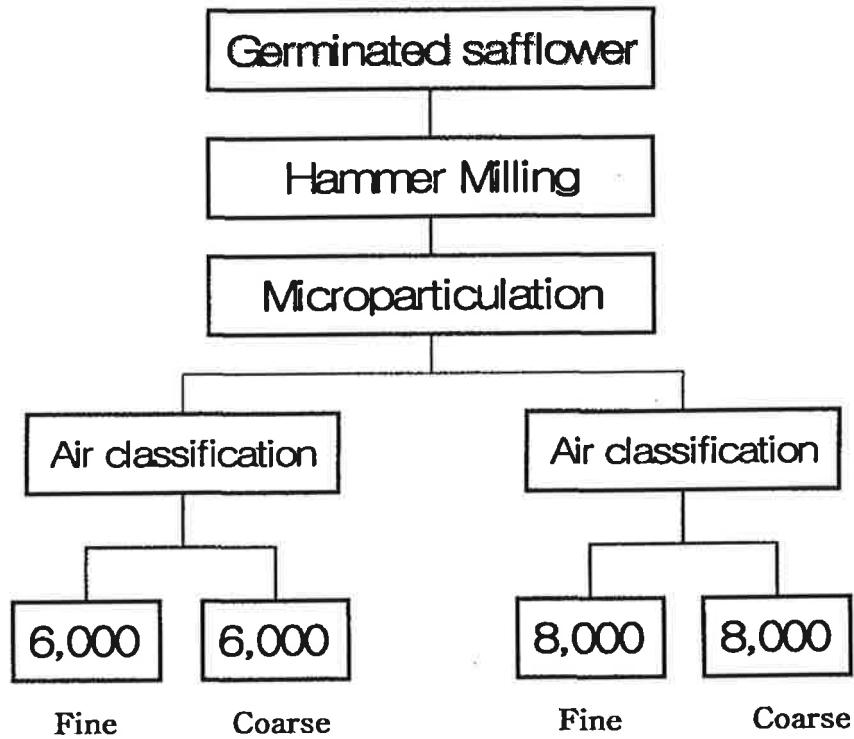


Figure 3-2. Air-classification scheme of germinated safflower seeds.

Table 3-2. 분급조건에 따른 껍질함유 발아홍화분말의 입도 분포 및 회수량

Mode	rpm	Fraction	회수율 (%)	Particle size (μm)			
				D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Mean Diameter
CWS ¹⁾	8,000	-	-	5.26	28.04	90.41	38.31
ACWS ²⁾	6,000	Fine	60	3.44	13.65	29.54	15.47
		Coarse	40	4.83	25.45	88.49	36.51
	8,000	Fine	36.4	3.12	13.14	28.06	14.85
		Coarse	63.6	4.93	25.79	87.18	36.35

¹⁾Cut-off wheel speed

²⁾Air classifying wheel speed

껍질을 거의 제거한 발아홍화를 Impact mill을 이용하여 10,000rpm에서 미분쇄하였을 때의 평균입도는 $12.85\mu\text{m}$ 이었으며 이러한 시료에 대하여 각각 8,000rpm과 10,000rpm에서 공기분급을 실시하여 그 수율을 조사하였다. 분급조건을 8,000rpm으로 하였을 경우 미분획에서 80%의 수율로 $11.04\mu\text{m}$ 의 입도를 갖는 발아홍화 분말을 회수할 수 있었으며 10,000rpm에서는 $10.30\mu\text{m}$ 의 입도를 갖는 58%의 수율을 미분획으로 회수할 수 있었다(표 3-3).

Table 3-3. 분급조건에 따른 곽질제거 발아홍화분말의 입도 분포 및 회수량

Mode	rpm	Fraction	회수율 (%)	Particle size (μm)			
				D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Mean Diameter
CWS ¹⁾	10,000	-	-	3.21	11.51	24.48	12.85
ACWS ²⁾	8,000	Fine	84	2.94	9.95	20.74	11.04
		Coarse	16	2.98	11.50	24.28	12.75
	10,000	Fine	58	2.66	9.16	19.57	10.30
		Coarse	42	3.42	12.88	28.51	15.15

¹⁾Cut-off wheel speed

²⁾Air classifying wheel speed

2) 발아홍화분말의 색도 분석

Impact mill에 의한 발아홍화분말의 백색도(L)는 78.81, 적색도(a)는 0.26, 황색도(b)는 21.44로 나타났으며 6,000rpm 및 8,000rpm에서 분급한 결과 미분획에서는 백색도와 황색도가 증가하고 적색도는 감소하는 것으로 나타났다(표 3-5). 이러한 현상은 입자크기의 감소와 입자수의 증가에 따라 나타나는 전형적인 결과로 볼 수 있다.

Table 3-4. Hammer milling 한 홍화분말의 분급조건에 따른 색도 변화

Mode	rpm	Fraction	Hunter color parameters ¹⁾		
			L	a	b
ACWS ²⁾	1,000	Fine	69.31	1.28	20.38
		Coarse	64.86	1.80	18.01
	1,500	Fine	71.65	1.14	21.19
		Coarse	63.94	1.95	18.28
	2,500	Fine	72.31	1.08	22.72
		Coarse	64.98	1.70	17.45

¹⁾L: degree of whiteness(white +100 ↔ 0 black)
a: degree of redness(red +100 ↔ 0 ↔ -80 green)
b: degree of yellowness(yellow +70 ↔ 0 ↔ -80 blue)

²⁾Air classifying wheel speed, rpm

Table 3-5. Impact-milling에 의한 홍화분말의 분급조건에 따른 색도 변화

Mode	rpm	Fraction	Hunter color parameters ¹⁾		
			L	a	b
CWS ²⁾	8,000		78.71	0.26	21.44
ACWS ³⁾	6,000	Fine	78.92	-0.3	23.19
		Coarse	77.73	0.26	22.67
	8,000	Fine	80.40	-0.26	21.70
		Coarse	76.36	0.49	22.51

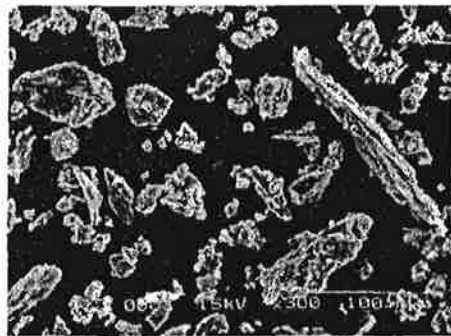
¹⁾L: degree of whiteness(white +100 ↔ 0 black)
a: degree of redness(red +100 ↔ 0 ↔ -80 green)
b: degree of yellowness(yellow +70 ↔ 0 ↔ -80 blue)

²⁾Cut-off wheel speed

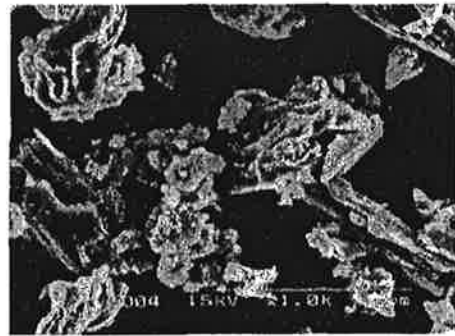
³⁾Air classifying wheel speed

3) 발아홍화분말의 표면 분석

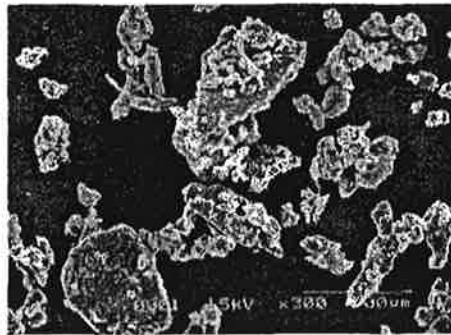
분쇄한 발아홍화의 외형은 부정형으로서 길게 형성된 식물체 조직의 형태를 보여주고 있으며 분쇄강도가 증가할수록 이러한 특성은 감소하게 된다(그림 3-3). 발아홍화의 껍질부분은 두터운 씨앗이 갖는 외벽의 형태를 그대로 나타내고 있으며 적절한 입도로의 분쇄에 의하여 홍화의 발아된 부위와 외벽 부분을 형성하는 입자의 분리가 가능할 것으로 판단된다.



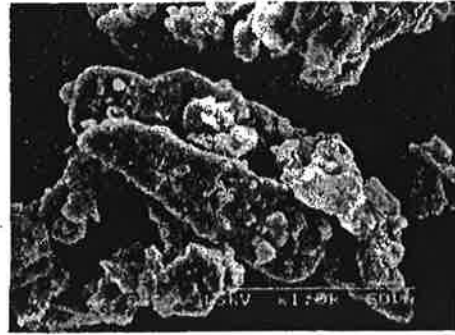
A



B



C



D

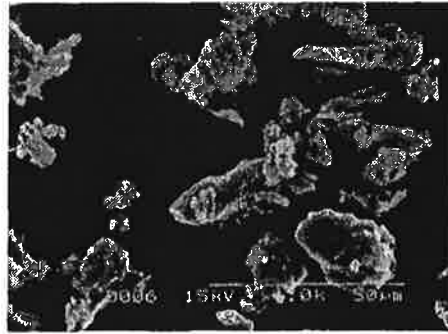
Figure 3-3. Scanning Electron Micrograph of germinated safflower seeds

A : 발아홍화 (300배), B : 발아홍화 (1,000배)

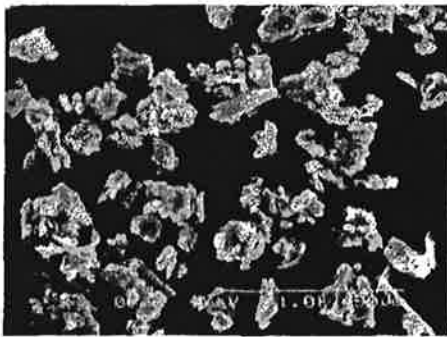
C : 발아홍화 껍질 (300배), D : 발아홍화 껍질 (1,000배)

껍질을 대부분 제거한 발아홍화를 Impact mill을 이용하여 10,000rpm에서 분쇄하였을 때의 평균입도(median)는 12.85 μ m 수준이었다. 이 분말을 8,000rpm 및 10,000rpm에서 미분획으로 회수하였을 때의 형태는 위 사진의 B 및 D와 같다(그림 3-4). 각각의 조분획인 C, E에 비하여 분쇄물의 입도가 일정한 형태를 보이고 있으며 조분획의 경우 상대적으로 큰 입자들이 섞여있는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 각 분획은 모두 10.30 - 15.15 μ m 범위의 입자들로서 큰 차이를 보이지는 않았다. 최종적인 입도의 설정은 향후의 실험을 통하여 과립(granule)이나 차(tea)의 형태로 제품화할 때의 식감 등을 고려하여 결정하여야 할 것으로 판단된다.

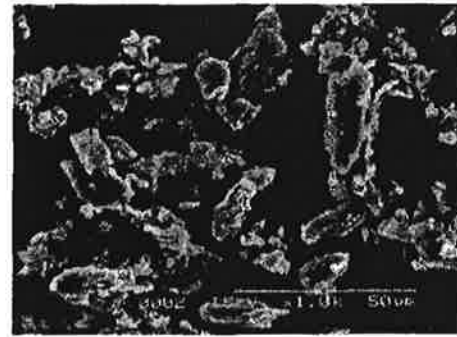
발아가 종료된 홍화의 경우 껍질의 제거를 통하여 유효 성분 함량의 증가와 제품화를 위한 원재료로서의 품질유지가 용이해지는 측면이 있다. 따라서 껍질이 포함된 발아홍화의 미분쇄와 공기분급을 통하여 껍질부분의 분리를 시도하였다. 분쇄된 홍화분말을 각각 6,000rpm 및 8,000rpm에서 미분획으로 회수한 B, D분획의 경우 균일한 입도의 부정형 분말형태를 보이고 있으나 조분획인 C, E의 경우 거친 입자가 혼재하는 가운데 일부 미분획에서 나타나는 입자의 형태를 가진 것도 있어서 성공적인 분리를 확신하기 어려웠다(그림 3-5).



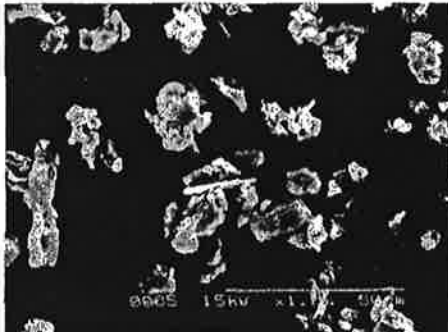
A



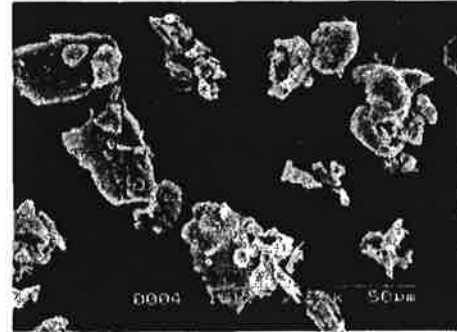
B



C



D

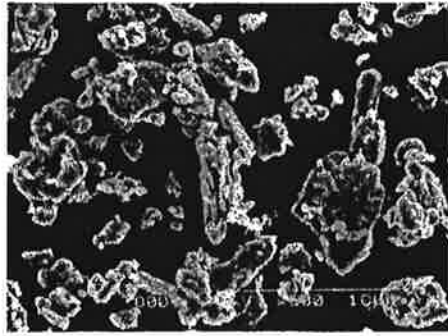


E

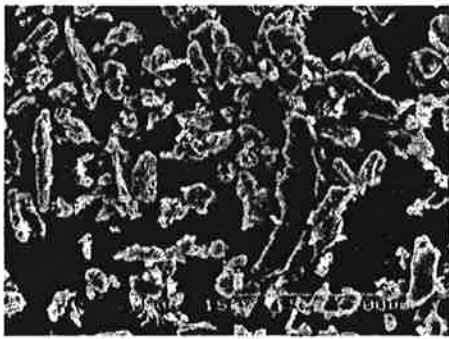
Figure 3-4. Scanning electron micrograph of dehulled germinated safflower seeds, milled

A : 겹질 제거 발아 홍화분말 (ZPS - 8,000/10,000 rpm)

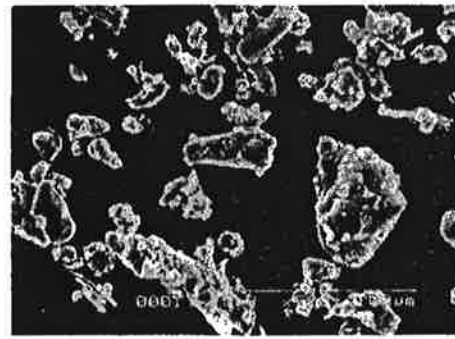
B : 8,000F, C : 8,000C , D : 10,000F , E : 10,000 C



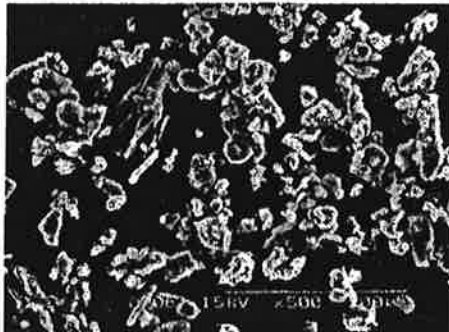
A



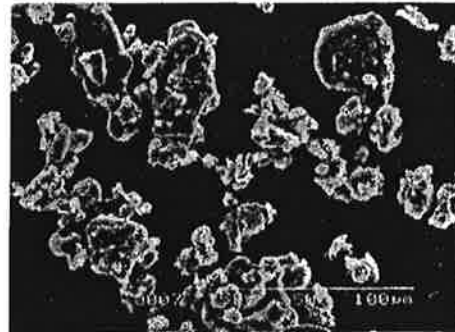
B



C



D



E

Figure 3-5. Scanning electron micrograph of germinated safflower seeds, milled

A : 씨껍질이 많은 홍화분말 (ZPS - 5,000/8,000 rpm)

B : 6,000F, C : 6,000C, D : 8,000F, E : 8,000C

4. 발아홍화의 습식 추출

가. 발아홍화의 물추출

건조된 발아홍화시료를 분쇄한 후 80℃에서 열수추출을 하면서 추출시간 1, 2, 4시간에 각각 시료를 채취하여 가용성 고형분 함량과 총페놀함량 그리고 항산화활성을 비교하여 추출시간의 효율성을 검토하였다. 가용성 고형분의 함량은 105℃ 건조법에 의해 함량이 되었을 때 측정된 무게를 건조시료 100g에 대한 가용성 함량으로 나타내었다.

표 3-6에서와 같이 가용성 고형분 함량은 추출시간에 따라 증가되는 경향이 있었다. 그러나 추출시간에 따라 총페놀함량과 전자공여작용은 큰 영향이 없는 것으로 보였다. 이상과 같이 추출시간 1시간에서 2시간 사이에 고형분 함량, 총폴리페놀 함량, 전자공여 작용의 변화는 추출 평형에 도달하는 것으로 나타났다.

Table 3-6. Total polyphenol content and antioxidant activity for extraction time of the germinated safflower powder in hot water

extraction time(hr)	Soluble solid content (%) [*]	Total phenol (%) [*]	Antioxidant activity (%)
1	27.4±1.24 ^b	2.82±0.13 ^b	82.3±2.60 ^b
2	32.3±1.43 ^a	3.42±0.15 ^a	92.0±2.31 ^a
4	34.1±1.56 ^a	3.47±0.25 ^a	91.2±2.54 ^a

* : % of total content in 100g dry matter

^{a)} : Mean±standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

나. 발아홍화의 물과 에탄올 혼합액에 의한 추출

물과 에탄올의 혼합액에 의한 추출적성을 알아보기 위하여 혼합비율을 달리하여 추출을 한 결과 추출 수율과 총페놀함량 및 항산화활성을 비교한 결과는 표 3-7과 같다. 이 때의 추출은 용매(에탄올)의 증발을 막기 위하여 환류냉각관을 이용하여 추출하였다. 추출수율은 에탄올 혼합액보다 물추출인 경우 47.1%로 가장 높았으며 에탄올의 함유비가 높을수록 추출수율은 낮아지는 것으로 나타났다. 또한 추출방법에 있어서도 열수추출보다는 환류냉각추출인 경우 좀더 추출수율이 높은 것으로 확인되었다. 항산화활성과 총페놀함량도 물추출물에서 훨씬 높아 각각 IC₅₀이 6.7mg/100mL, 4.15%인 것으로 확인되었다. 발아홍화의 물추출물의 일반성분 조성은 조단백질 함량 2.6%, 조지방은 0.26%였으며 무기질은 0.53%이었으며, 대부분이 조섬유와 탄수화물인 것으로 나타나 원료의 일반성분과는 함량차이가 많았다.

Table 3-7. Mass Yield, total phenol yield and antioxidant activity yield for extraction of germinated safflower powder in various ratio of water and ethanol

Water : Ethanol(%)	Mass Yield(%)	Total Phenol Yield(%)	Antioxidant Activity Yield(%)
30 : 70	37.8 ± 2.4	24.5 ± 1.3	27.2 ± 2.4
50 : 50	38.7 ± 2.6	37.3 ± 2.1	34.8 ± 2.1
80 : 20	43.7 ± 2.2	56.8 ± 2.7	46.6 ± 2.3
100 : 0	47.1 ± 2.1	65.9 ± 3.1	56.2 ± 2.7

Values are mean ± Standard deviation

5. 홍화 분말과 물추출물의 저장성

20°C에서 10일간 발아시킨 홍화분말과 그 물추출액(80°C)을 15°C 상온과 37°C에 저장하면서 색도와 total phenol, 항산화 활성(antioxidant activity using free radical, DPPH), 산가(acid value) 및 과산화물가(peroxide value)의 변화를 측정하였다.

홍화 분말과 추출물의 산패도 측정은 AOAC Official Method에 따라 과산화물가(AOAC, 1984)와 산가(AOAC, 1984)를 측정하였다.

저장기간의 경과에 따라 Total phenol의 함량은 저장 6개월까지도 저장초기(3.6%)와 크게 차이가 나지 않았으며, 저장에 따른 색도의 변화는 표 3-8에 나타난 바와 같다. 초기 색도(분말; 97.75/-0.49/1.96, 추출액; 99.46/-0.25/0.67, L,a,b)의 변화가 크지는 않았으나 저장기간이 경과할수록 L값은 감소하였으며, a값(적색도)과 b값(황색도)은 대체로 증가하였다. 색도의 변화도 저장 형태에 따라서 크게 영향을 받지 않았다.

DPPH에 의한 항산화 활성도 상온저장의 경우 6개월까지는 감소하지 않았으나 37°C에 저장한 추출액 시료에서는 저장 6개월에 50% 정도 활성이 감소되었다(그림 3-6).

저장기간별 산가(acid value)는 처음에 산가가 3.37mg KOH/100 g로 분말시료에서는 변화가 거의 없었으나 37°C에서 저장한 경우 시간이 경과함에 따라 계속해서 증가하여 추출액의 경우에 발아홍화분말보다 2배 정도의 산가가 증가되는 것으로 나타났다(그림 3-7).

저장 중 과산화물가(peroxide value)의 변화를 측정한 결과, 15°C에서는 분말시료와 추출액 시료 모두 변화가 없었으며, 37°C에서 저장한 추출액의 경우에만 증가와 감소를 반복하면서 계속 증가되는 것으로 나타났다(그림 3-8). 따라서 발아홍화의 저장에는 추출물 형태보다 분말형태가 더 산화에 안정한 것으로 생각되며 15°C에서 1년간 저장할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3-8. Changes in Hunters color value of germinated safflower seed powder and extract during storage period

Sample temperature (°C)	Storage	Color value	Storage time(month)									
			0	3	6	8	10	12				
Powder	R.T (15°C)	L	97.75±0.11	87.88±0.15	82.78±0.15	82.04±0.18	83.04±0.21	84.15±0.25				
		a	-0.49±0.14	-0.48±0.11	0.04±0.09	0.25±0.11	0.17±0.15	0.16±0.09				
		b	1.96±0.10	2.11±0.09	4.71±0.12	5.58±0.12	5.35±0.09	5.48±0.11				
	37°C	L	97.75±0.11	88.21±0.13	86.45±0.15	85.58±0.15	84.36±0.21	86.79±0.21				
		a	-0.49±0.14	-0.61±0.11	0.14±0.08	0.45±0.14	0.45±0.15	0.45±0.09				
		b	1.96±0.10	1.63±0.15	3.34±0.12	3.57±0.08	4.05±0.12	4.05±0.11				
Water extract	R.T (15°C)	L	99.45±0.18	106.94±0.12	92.27±0.20	93.68±0.18	81.98±0.2	82.77±0.22				
		a	-0.25±0.12	-0.30±0.08	0.44±0.11	0.43±0.11	4.34±0.15	4.25±0.15				
		b	0.67±0.20	6.09±0.12	8.59±0.11	7.59±0.11	5.20±0.18	4.70±0.11				
	37°C	L	99.45±0.18	97.75±0.22	98.40±0.18	101.47±0.13	98.47±0.15	94.20±0.21				
		a	-0.25±0.12	-0.49±0.12	-0.44±0.11	-0.54±0.10	-0.31±0.11	0.04±0.15				
		b	0.67±0.20	1.96±0.15	3.06±0.09	3.47±0.09	5.54±0.15	5.25±0.10				

Values are means of triplicate determination.

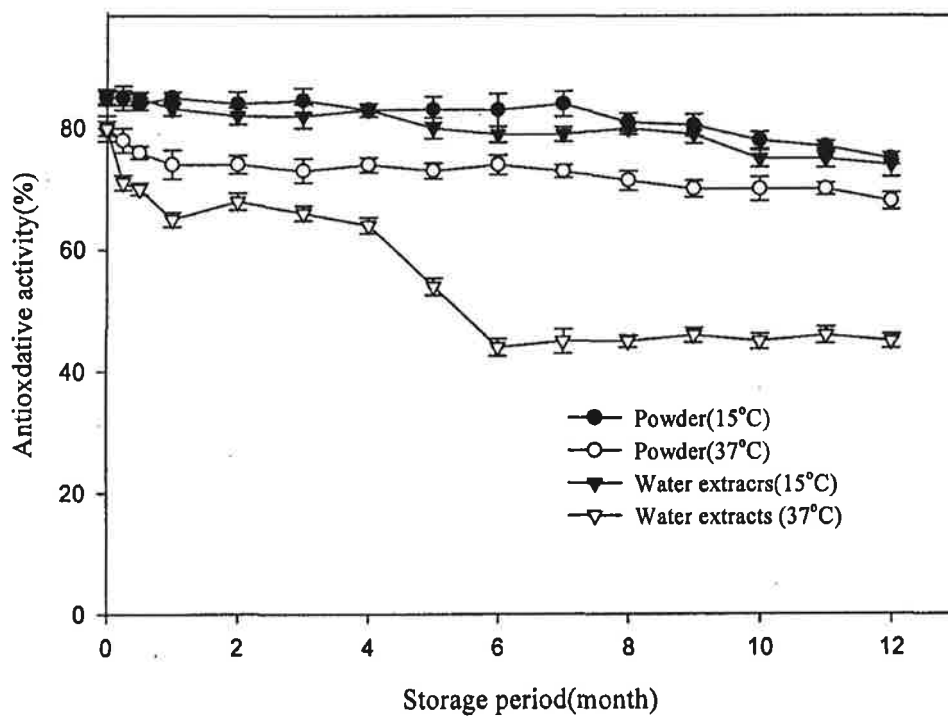


Figure 3-6. Changes in antioxidative activity of germinated safflower seed powder and extract during storage period

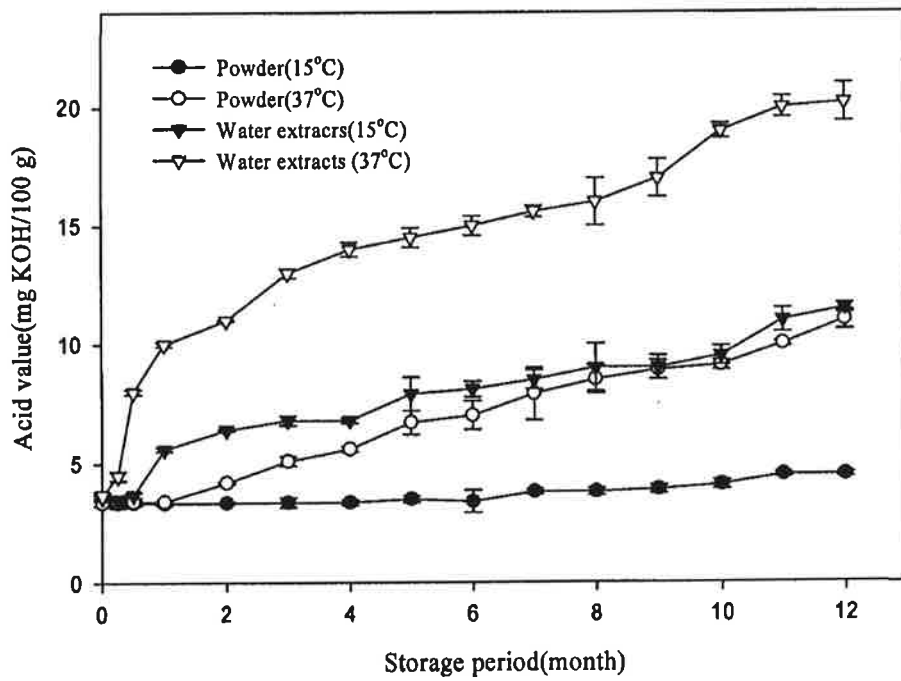


Figure 3-7. Changes in acid value of germinated safflower seed powder and extract during storage period

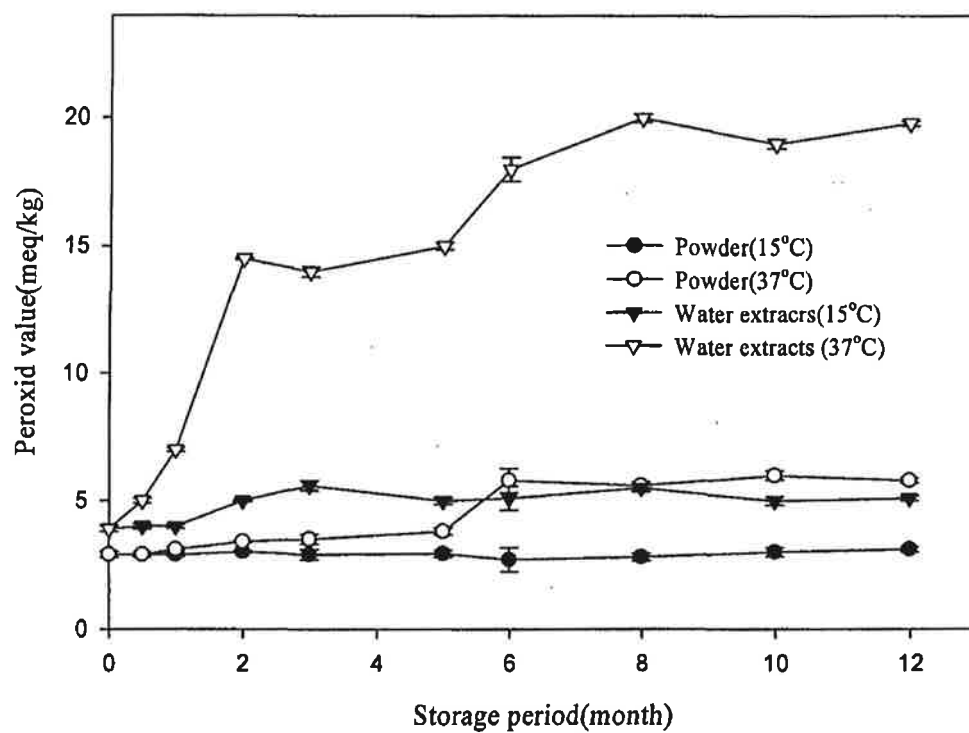


Figure 3-8. Changes in hydroperoxide value of germinated safflower seed powder and extract during storage period

6. 제품의 시장동향 및 가격경쟁력 분석

홍화를 이용한 일반적인 제품군을 다음 표에 나타내었다 (표 3-9). 원료 홍화의 가격은 25,000원/Kg 수준이었으며 ‘환’ 또는 ‘정’의 형태로 단순가공하여 소비하기에 편의성을 부여한 제품이 시판되고 있다.

Table 3-9. 시판중인 단순가공 홍화제품 (의성 우리홍화 등)

제품명	중량(g)	가격(원)	형태	주요 조성분
홍화씨	1,000	25,000	씨	홍화 100%
홍화분말	500	60,000	분말	홍화 100%
홍화정	500	80,000	환	홍화 85%, 죽염, 마늘, 찹쌀 등
홍화골드	690	120,000	정	홍화 85%, 죽염, 마늘, 찹쌀, 대추, 생강, 당귀

그러나 이러한 제품들의 경우 홍화의 생리적 기능성 성분들을 함유하고 있다가 가공과정 및 유통중에 많은 부분을 소실하게 됨으로써 섭취량과 체내 유효성에는 상당한 차이가 있을 수밖에 없다. 또한 발아시키지 않은 상태의 홍화의 경우 이소플라본을 포함한 대부분의 유용성분이 건조 홍화씨의 수준보다도 낮은데다, 시간이 갈수록 감소하는 것이 사실이다. 따라서 홍화가공제품의 경제성 비교를 위해서는 유효성분의 함량에 따른 효용을 전제로 하는 것이 필요하며 소비자 입장에서도 기대할 수 있는 기능성을 확보할 수 있으므로 단순히 중량에 따른 가격비교는 무의미한 것으로 판단된다.

발아홍화의 경우 이소플라본을 포함한 기능성성분들이 단순히 분쇄가공 및 ‘환’형태의 가공과정을 거친 제품과 비교하는 것이 무리라고 판단되나, 본 연구를 통하여 개발된 액상추출기법과 분말화 공정을 채택할 경우 기존의 홍화가공제품과 비교해도 경제성은 충분한 것으로 평가된다. 발아과정에서

발생하는 추가비용은 기능성 성분의 증가로 상쇄되고도 남음이 있으며 본 연구와 관련하여 특허출원된 홍화가공방법을 적용할 경우, 소비자의 신뢰도 제고가 가능할 것으로 판단된다.

제 4 절 발아홍화를 이용한 모델 식품

1. 발아홍화차

껍질제거 후 건조시킨 발아홍화분말을 그림 4-1와 같이 차봉지 형태로 1%, 3%, 5%, 10%의 농도가 되게 뜨거운 물에 풀어서 10명의 패널에 의해 9점 항목척도방법을 이용하여 관능검사를 실시하였다(그림 4-2). 맛과 향을 비교 평가한 결과는 표 4-1과 같으며 대체로 3%의 농도에서 Color와 taste가 좋은 것으로 나타났으며, 우려했던 쓴맛보다는 구수한 맛과 단맛이 느껴지는 것으로 평가되었다.

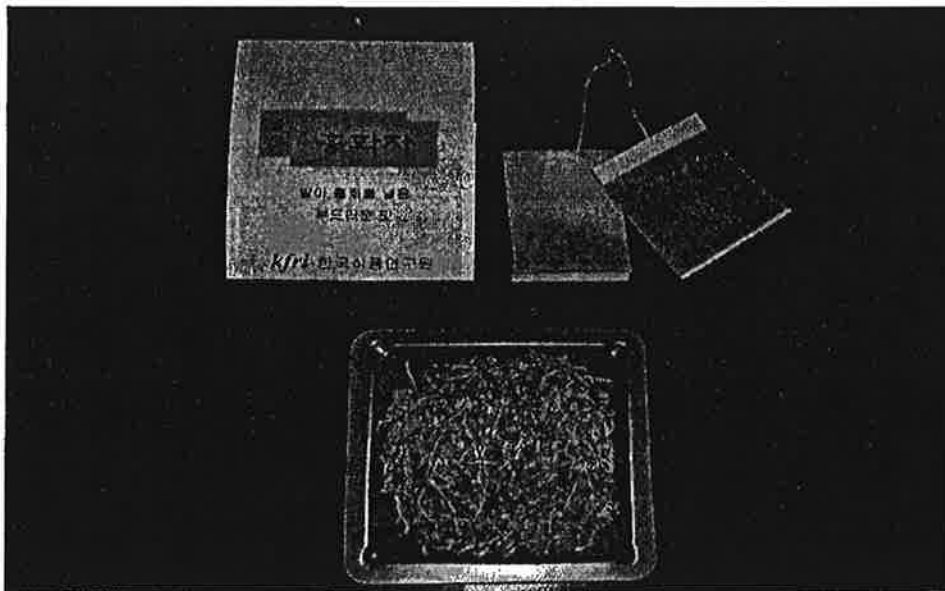


Figure 4-1. 관능검사에 쓴 차 봉지와 껍질 제거된 발아홍화

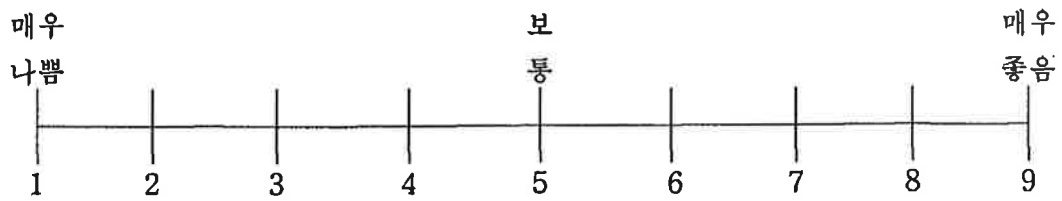
이름:

나이:

성별

발아홍화가 담겨져 있는 홍화차 티백입니다.

다음의 시료들을 맛보시고 기호도에 따른 점수를 기입하여 주십시오.



목 시료	향	color	flavor	taste
1%				
3%				
5%				
10%				

기타 소견:

대단히 감사합니다!!!

Figure 4-2. Questionnaire for sensory evaluation

Table 4-1. Sensory evaluation for color, odor and taste of germinated safflower powder tea.

시료	항목	color	flavor	taste
1%		5.0±1.2 ^b	6.5±1.1 ^b	3.0±0.9 ^c
3%		6.5±1.1 ^a	5.5±0.8 ^a	6.5±1.3 ^a
5%		6.0±0.9 ^a	5.5±1.4 ^a	4.5±1.5 ^b
10%		3.5±1.5 ^c	2.5±1.3 ^c	3.0±1.1 ^c

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

2. 발아홍화빵

가. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용한 밀가루는 강력분 1등급(대한제분, 조단백 13.61%, 조회분 0.38%, 수분 11.59%, 글루텐 함량 34.4% (습부량))을 사용하였으며 그 외 정제염과 정제설탕, 효모(오뚜기사, 인스턴트 드라이 이스트)를 시중에서 구입하여 사용하였다. 발아홍화 분말은 의성영농조합에서 구입한 홍화씨를 발아시켜 껍질을 제거한 후 건조시켜 분말로 만들어 사용하였다.

2) 식빵의 제조

식빵은 강력분(대한제분) 밀가루를 사용하여 직접반죽법에 의하여 제조하였으며, 발아홍화분말은 베이커 퍼센트(baker's percentage)로 밀가루 100g 기준에 대해 0%, 1%, 3% 및 5%로 각각 달리하여 첨가하였다. 빵 제조에 사용한 반죽의 배합비는 표 4-2과 같다.

Table 4-2. Proximate composition of white bread formula

Ingredients	Content(%)
Strong flour	100
Onion powder	0-8.0
Compressed yeast	3.0
Yeast food	0.1
Sugar	5.0
Salt	2.0
Non-fat dry milk	3.0
Shortening	4.0
Water	Variable

3) 식빵의 색도 및 texture 측정

식빵의 crust와 crumb의 color는 CR-200 Chroma meter(Minolta Inc., Japan)를 사용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며 3회 측정값의 평균값으로 나타내었다.

식빵의 Crumb texture는 제빵 24시간 후에 texture analyzer(TA-XT2, texture analyzer, U.K.)를 사용하여 3회 반복하여 측정하였다. 시료는 20x20x20 mm로 하여 시료를 압착했을 때 얻어지는 force distance curve로부터 시료의 TPA(texture profile analysis)를 분석하여 경도(hardness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 점성(gumminess), 씹힘성(chewiness)을 구하였다. 이 때 사용한 탐침은 직경 35mm의 압착탐침이었으며 탐침속도는 2.0mm/sec이었다.

4) 식빵의 특성

빵의 외관은 디지털 카메라(Fuji, japan)로 외관의 특성을 촬영하여 관찰하였다. Loaf의 무게와 부피는 baking 한 loaf를 1시간 동안 실온에 방치한 후에 측정하였으며, 부피는 종자치환법으로 측정하였다 (Pyle, 1979). 빵의 무게는 빵을 구운 후 실온에서 1시간 방냉한 다음 측정하였으며, 식빵의

비용적(specific volume)은 빵 1g이 차지하는 부피(mL)로 나타내었다.

5) 식빵의 관능검사

식빵의 관능검사는 한국식품연구원에 근무하는 15명의 연구원을 선별하여 실시하였다. 즉, 밀가루에 발아홍화분말을 3,6,9%되게 첨가하여 만든 식빵을 9점 채점법의 기호도 검사를 사용하여 비교 채점하였다. 평가는 외관, 맛, 향미, 조직감, 색상, 전반적인 기호도에 대하여 2(대단히 나쁘다)에서 9(대단히 좋다)까지의 점수를 사용하여 평가하였다. 구운 빵은 30분 정도 방냉한 후, 전동칼을 이용하여 균일하게 자르고 관능검사용 그릇에 담아 관능검사원에게 평가하도록 제시하였다.

6) 식빵의 저장 중 특성 변화

빵은 구운 후 실온에서 2시간 방치 후 폴리에틸렌 백에 넣고 4일간 보관하면서 빵의 물성을 측정하였다 (texture와 관능 평가).

나. 결과 및 고찰

1) 발아홍화 분말 첨가 빵의 특성 및 비용적

발아홍화 분말을 첨가한 식빵의 외관 및 단면도를 그림 4-3에 나타내었다. 1%의 첨가시에는 색도에 있어서 대조구와 별 차이가 없었으나 3% 이상의 첨가시에는 색상의 차이가 큰 것으로 확인되었다. 또한 발아홍화 분말을 첨가하여 제조한 빵의 비용적은 표 4-3와 같다.

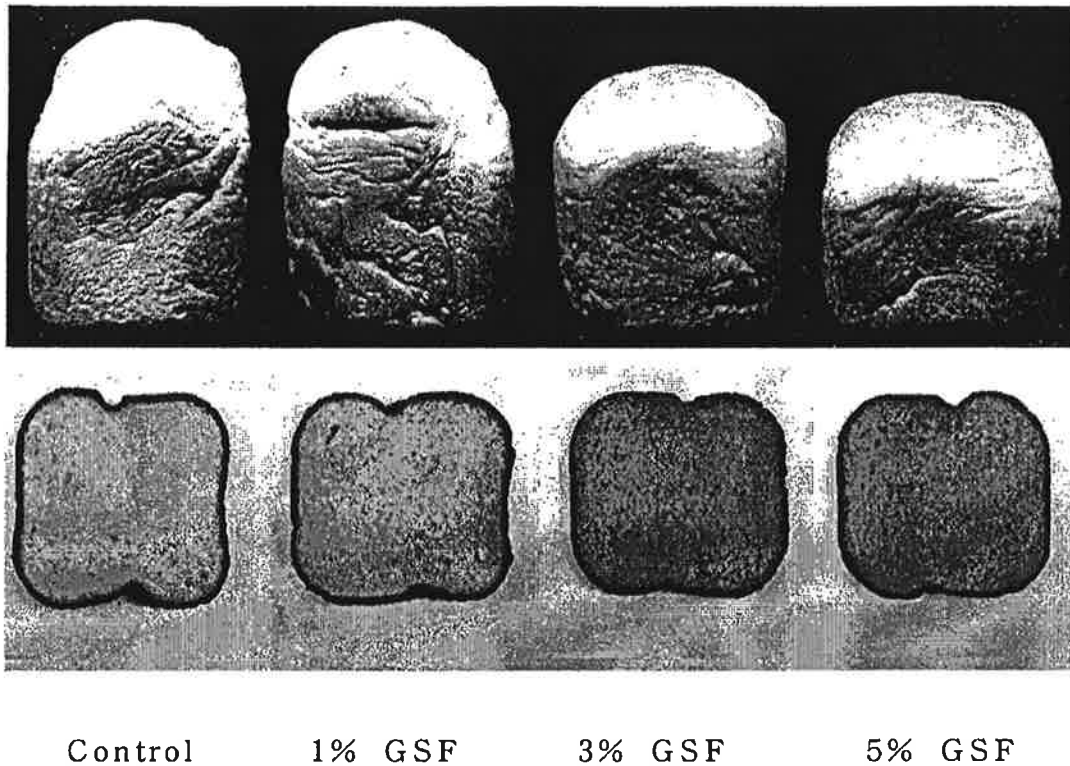


Figure 4-3. Cut loaves and appearance of the white breads containing germinated safflower seed powder. GSF ; germinated safflower seed powder

빵의 비용적은 홍화분말 1%첨가한 경우 대조구와 비슷하였으나 첨가량이 증가할수록 비용적은 감소하여 5% 첨가구에서는 (2.25cm³/g으로) 대조구에 비해 44.8%의 감소율을 나타내었다. 복합분으로 제조된 보리, 옥수수, 감자, 고구마, lupin, fababean, pintobean, legume 빵은 밀가루로 만든 빵보다 품질이 떨어지고 빵의 용적이 감소하는 것이 문제인데, 아마란스 분말을 빵에 첨가할 경우, 빵의 용적증가를 위해 CSL(corn steep liquor)과 hemicellulase의 첨가가 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Morita 등, D'Appolonia 등). 따라서 홍화분말 1.0%의 첨가가 식빵의 용적증대에 기여할 수 있을 것으로 보인다.

Table 4-3. External appearance and specific volume¹⁾ of bread containing germinated safflower seed powder

samples	Loaf wt (g)	Loaf vol. (cm ³)	Specific vol. (cm ³ /g)
Control	553.0 ± 11.5	2257.5 ± 112.4	4.08
1%	555.5 ± 12.1	2245.4 ± 134.1	4.04
3%	564.4 ± 11.5	1775.0 ± 132.2	3.14
5%	581.5 ± 12.5	1309.5 ± 126.5	2.25

Values are mean ± Standard deviation

¹⁾ Values are means of triplicate determination.

발아홍화분말을 첨가하여 제조한 빵의 crust 색도와 crumb 색도를 측정한 결과는 표 4-4와 같다. Crumb의 경우 a와 b 값은 홍화분말 첨가구에서 대조구보다 높게 나타났으며 L값은 첨가량이 증가할수록 감소하는 경향이었고, crust에서는 1% 첨가구는 L, a, b값이 대조구와 전반적으로 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 3% 이상에서는 L, a, b 값이 모두 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 홍화분말의 첨가는 제품의 색에 영향을 미치는 것으로 여겨져 부드럽고 흰 빵을 선호하는 소비자들에게는 3% 이하로 첨가해야 호감을 줄 것으로 생각된다.

Table 4-4. Hunter's color values¹⁾ for crumb and crust of bread containing germinated safflower seed powder

samples	Color of Crust			Color of Crumb		
	L	a	b	L	a	b
Control	40.14±1.86	13.57±0.85	20.47±2.13	74.23±2.34	-5.74±0.17	25.34±2.32
1%	39.32±1.93	13.25±0.56	20.91±1.30	68.30±1.33	-4.54±0.14	28.23±1.48
3%	34.14±1.65	12.11±0.17	17.91±1.32	63.22±2.93	-3.01±0.11	26.63±0.98
5%	33.33±1.31	10.01±0.44	11.47±1.56	57.50±2.34	-1.19±0.21	28.95±0.31

¹⁾ Values are means of triplicate determination.

2) 발아홍화 분말 첨가 빵의 texture

발아홍화분말을 첨가하여 제조한 빵의 texture를 측정한 결과는 표 4-5와 같다. Hardness, gumminess와 chewiness는 1% 첨가구에서 가장 낮았으며, 5.0% 첨가구에서 gumminess와 chewiness가 가장 높게 나타났다. 그러나 springiness는 모든 첨가구에서 차이가 없는 것으로 나타났다. Texture 특성은 첨가소재에 따라서 달라지는 경향이 있는데, 발아홍화 분말의 첨가는 texture에 뚜렷한 영향을 미치지 않는 않지만 cohesiveness와 chewiness 그리고 gumminess 등의 texture값이 대조구보다 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 4-5. Textural properties¹⁾ of breads containing germinated safflower seed powder

samples	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
Control	499.4±171.8 ^b	0.95±0.01 ^a	0.64±0.04 ^b	313.7±82.9 ^b	299.6±79.4 ^{bc}
1%	404.5±183.5 ^c	0.95±0.01 ^a	0.69±0.05 ^a	278.6±129.6 ^c	265.3±120.3 ^c
3%	489.8±131.0 ^b	0.95±0.01 ^a	0.71±0.04 ^a	345.0±80.6 ^b	327.3±75.0 ^b
5%	860.1±219.3 ^a	0.94±0.01 ^a	0.66±0.02 ^b	563.1±125.7 ^a	530.2±118.1 ^a

¹⁾ Texture was measured for samples of 20.0 mm height with stainless steel probe(35mm, dia.) by a two bite test and instrumental conditions: test speed 2.0 mm/s, distance 60%, trigger force 5 g, load cell 25 kg.

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

3) 발아홍화 분말 첨가 빵의 관능검사

빵의 특성은 세 가지 범주로 분류하여 평가하는데 제품의 겉모양과 껍질을 묘사하는 외부적 특성(external

characteristics)과 또 하나는 제품의 속살과 내부조직을 묘사하는 내부적 특성(internal characteristics)으로 나누어진다. 그리고 세 번째의 특성은 제품을 먹을 때 느끼는 식감(eating qualities)이다. 실제적으로 식감은 냄새, 맛과 입안에서의 감촉이 혼합되어 나타나며 이 특성들은 향미 또는 풍미로 일컬어지고 flavor라는 한 단어로 나타낼 수 있다.

발아홍화 분말을 첨가하여 제조한 빵의 전반적인 기호도, 외관특성으로서 부피, 겉 색상, 내부적인 특성으로 텍스처, 속살색상, 기공의 결 및 그의 향미, 촉촉함, 쓴맛에 대하여 그림 4-4의 검사표를 이용하여 관능검사를 실시하여 그 결과를 표 4-6에 나타내었다. 전반적인 기호도는 control구가 가장 높고 발아홍화 분말의 첨가량이 증가함에 따라 기호도가 낮아져 5.0% 첨가구에서 기호도가 가장 낮았다. 향미는 대조구와 1.0% 첨가구에서 좋게 나타났으며 5.0%에서 가장 낮게 나타났다. 맛의 기호도는 control과 1.0% 첨가구에서 높은 것으로 나타났다. 관능검사에서 대조구가 대체로 좋게 나타나며 발아홍화 분말 첨가시에는 1.0% 첨가구가 다른 처리구에 비해 기호도가 높게 나타났다.

Table 4-6. Sensory evaluation score for bread containing germinated safflower seed powder

samples	Appearance	Flavor	Taste	Texture	Overall Acceptability
Control	6.5±1.3 ^a	6.8±1.5 ^a	6.0±2.1 ^a	6.4±1.8 ^a	6.8±1.8 ^a
1%	5.5±1.2 ^b	5.8±2.0 ^b	5.4±1.6 ^a	6.3±1.6 ^a	5.7±1.4 ^b
3%	4.8±1.1 ^c	4.5±1.5 ^c	4.4±1.7 ^b	5.8±1.7 ^b	4.6±1.4 ^c
5%	4.4±1.2 ^c	4.0±1.0 ^c	3.5±1.7 ^b	4.4±1.5 ^c	3.8±2.1 ^d

Values are mean ± Standard deviation

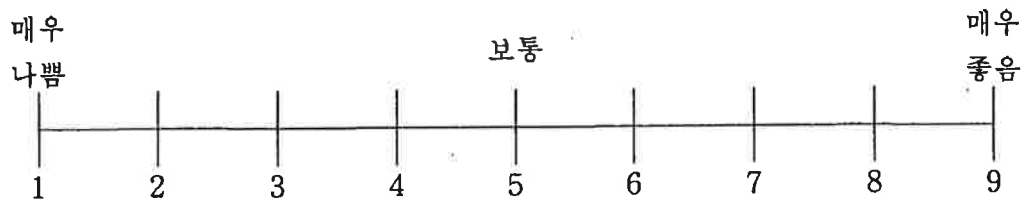
The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

성별:

나이:

홍화를 첨가하여 제조한 식빵입니다.

다음의 시료들을 보시고 향, 맛, 조직감 및 종합 기호도에 따른 점수를 기입하여 주십시오.



시 료	외관	향	맛	조직감	종합기호도
175					
234					
318					
456					

기타 소견 :

대단히 감사합니다!!!

Figure 4-4. Questionnaire for sensory evaluation

4) 발아홍화 분말 첨가 빵의 저장성 시험

발아홍화 분말을 첨가한 식빵의 저장성을 보기 위하여 빵을 구운 후 실온에서 2시간 방치 후 폴리에틸렌 백에 넣고 5일간 보관하면서 빵의 texture를 측정하였다. 표 4-7에 나타난 바와 같이 gumness, chewiness는 약간 증가하였고 Springiness와 cohesiveness는 약간 감소하였다. 또한 hardness는 저장기간이 길어지면서 그 증가비율이 매우 높은 것으로 나타났으며, 발아홍화 분말의 첨가량이 많을수록 저장에 따라 hardness가 급격하게 증가하는 것으로 확인되었다. 그러나 상온에서 저장한 5일까지 대조구와 첨가구 모두에서 곰팡이는 생장하지 않았다.

Table 4-7. Textural properties¹⁾ of breads containing germinated safflower seed powder at 5 day storage

samples	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
Control	1264.1±187.1 ^b	0.92±0.01 ^{N.S.}	0.51±0.03 ^b	652.9±120.5 ^c	605.0±107.8 ^c
1%	1081.4±189.1 ^c	0.91±0.02	0.60±0.04 ^a	653.5±109.8 ^c	599.6±109.7 ^c
3%	1581.1±172.8 ^b	0.86±0.01	0.41±0.01 ^c	1007.1±327.8 ^b	831.4±107.2 ^b
5%	3481.6±830.1 ^a	0.93±0.07	0.55±0.01 ^b	1446.2±243.9 ^a	1237.7±247.1 ^a

¹⁾ Texture was measured for samples of 20.0 mm height with stainless steel probe(35mm, dia.) by a two bite test and instrumental conditions: test speed 2.0 mm/s, distance 60%, trigger force 5 g, load cell 25 kg

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$).

3. 발아홍화 요구르트

발효유 시장의 변화는 소비자들의 인식과 선호도에도 영향을 주어 발효유에 있어서도 고기능성을 가진 고급발효유의 필

요성이 증대되고 있다.

소재 특성면에서 볼 때 발효유는 동물성 원료를 이용하여 제조하는 것이 일반적이었으나 웰빙 트렌드가 시대를 대표하게 되면서 대두와 같은 식물성 소재를 이용한 발효유의 개발에 관한 관심이 점점 높아지고 있다. 골다공증의 예방효과가 보고되고 있는 홍화는 위장관에서 소화가 되지 않는 seed coat을 제거한 발아홍화 물추출물을 이용하여 요구르트의 제조를 시도하였다.

가. 재료 및 방법

1). 재료

발아홍화 추출물은 의성영농조합에서 홍화씨를 구입하여 발아시켜 껍질을 제거한 후 열수로 추출하여 제조하였다.

2) 사용 균주

요구르트 제조에는 비피더스 포함 3종의 유산균(YC-280, YC-380, YF-L811) 등이 들어 있는 혼합균주를 Chr. Hansen 으로부터 구입하여 사용하였다. YF-L811은 점성을 증가시키기 위한 균주로 첨가하였다.

혼합균주명	균주	특징
YC-380	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	medium body and medium flavor

3) 요구르트의 제조 공정

탈지분유를 13.5%(w/v)의 비율로 조제한 액에 컷팅분쇄기(Cucina, Philips, 네덜란드)로 1분간 분쇄한 발아홍화의 열수추출물을 0.3%, 0.6%, 1.0%의 비율로 첨가한 후 살균된 용기

에 넣어 밀봉하여 끓는 물(100℃)에서 20분간 살균하였다. 살균이 끝나면 흐르는 물에 42℃ 이하가 될 때까지 냉각을 하고 Water bath에서 배지의 온도를 42℃로 유지시켰다. Clean bench에서 조합한 균주를 정량하여 배지에 넣고 혼합이 잘 이루어지도록 교반하였다. pH측정용 용기와 용도에 맞는 용기에 분주하여 42℃ Incubator에 넣어 발효시켰다. pH meter(Model 530, Corning, USA)를 이용하여 배양시간에 따른 pH를 측정하면서 커드형성을 관찰하면서, 유산균 발효의 적정 pH인 4.6 ~ 4.8이 되면 Incubator에서 꺼내어 4℃에 냉장 보관하였다.

4) 산생성량 및 당도 측정

발효과정 중의 요구르트를 1시간 간격으로 취하여 pH meter pH meter(Model 530, Corning, USA)를 이용하여 pH를 측정하였으며, 또한 산도는 시료 10mL을 취해서 증류수로 2배 희석한 후 지시약으로 phenolphthalein을 중화적정하여 산출하였다. 이 때 소비된 0.1N NaOH로 분홍색이 될 때까지 중화적정하여 산출하였다. 이 때 소비된 0.1N NaOH의 mL수를 다음 식을 이용하여 lactic acid %로 환산하였다(유주현, 1994). 당도는 Brix meter(Atago hand refractometer, N1)로 측정하였다.

$$\text{lactic acid(\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH의 적정 mL수} \times 0.009}{\text{시료의 mL수}} \times 100$$

5) 유산균수의 측정(생균수 측정)

젖산균수는 일정량의 시료를 무균적으로 취하여 멸균 peptone 수에 의한 10배 희석법으로 희석하여 MRS 한천배지에서 37℃, 48시간동안 배양한 후 colony 수가 30-300개가 나타나는 평판을 선택하여 산출하였다. 발효유의 시간경과에 따른 유산균수의 추이는 로그값으로 나타내었다.

6) 관능검사

발효가 완료된 요구르트를 충분히 교반한 후 4℃ 냉장고에서 수 시간 방냉하고, 발효시간에 따른 pH의 변화를 측정하였고 시료에 대한 관능평가를 실시하였다. 15명의 한국식품연구원 내 패널(pannel)을 상대로 향(odor), 맛(taste), 조직감(mouthfeel), 종합기호도(overall acceptability) 등의 항목에 대해서 관능평가를 수행하였다(장건형, 1992).

7) 요구르트의 저장성 시험

발효가 완료된 각각의 curd 상 요구르트를 밀폐시킨 후 4℃ 냉장고에 보관하여 7일간 생균수, 적정산도, pH, 당도 및 총균수(젖산균)를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 요구르트 발효

균을 접종한 후 두 시간까지 모든 시료가 1시간 이후에 빠르게 pH 저하속도를 나타내었다. 요구르트가 되는 최적 pH인 4.8에 도달한 시간은 3시간 정도로 시료들 간에 큰 차이를 보이지 않았다(표 4-8).

Table 4-8. Changes of the pH, acidity and Brix degree in various yoghurt samples during fermentation

Fermentation time (hr)	Germinated safflower seed extract(%)											
	0			0.3			0.6			1.0		
	pH	Acidity	°BRIX	pH	Acidity	°BRI X	pH	Acidity	°BRI X	pH	Acidity	°BRI X
0	6.7	0.09	12.8	6.6	0.09	12.8	6.6	0.09	12.8	6.5	0.09	12.8
1	6.3	0.15	12.8	6.3	0.15	12.8	6.3	0.16	12.8	6.2	0.18	12.5
2	5.6	0.26	12.8	5.4	0.28	12.2	5.5	0.28	12.5	5.4	0.35	12.8
2.5	5.0	0.34	10.5	5.0	0.35	10.5	5.0	0.36	9.5	5.0	0.39	9.5
3	4.8	0.38	8.0	4.8	0.40	8.0	4.8	0.41	8.0	4.8	0.44	8.0

2) 요구르트 저장성

발효가 완료된 curd 상 요구르트를 4℃ 냉장고에 보관하면서 생균수, 적정산도, pH, 당도 및 총균수(젖산균)를 측정 한 결과는 표 4-9과 그림 4-5와 같다. pH는 저장기간 동안 서서히 감소하였고, acidity는 약간 증가하고 있었다. 당도와 젖산균수는 7일 저장기간 동안 거의 변함이 없는 것으로 나타났다.

발효공정이 끝나고 저장을 시작한 날부터 7일까지 총균수를 측정한 결과 처음 요구르트를 제조하였을 때의 총균수 1×10^6 cfu/ml은 저장기간이 늘어나도 균수의 변화는 없이 일정한 값을 나타내었다(그림 4-5).

Table 4-9. Changes of pH, acidity and Brix degree in various yogurt samples during storage at 4℃

Storage (day)	Germinated safflower seed extract(%)											
	0			0.3			0.6			1.0		
	pH	Acidity	°BRIX	pH	Acidity	°BRIX	pH	Acidity	°BRIX	pH	Acidity	°BRIX
0	4.8	0.38	8.0	4.8	0.40	8.0	4.8	0.41	8.0	4.8	0.40	8.0
1	4.8	0.41	8.0	4.7	0.36	8.1	4.7	0.38	8.0	4.6	0.37	8.0
3	4.7	0.45	8.0	4.7	0.45	8.1	4.6	0.44	8.1	4.6	0.48	8.2
5	4.6	0.47	8.0	4.6	0.50	8.1	4.6	0.51	8.1	4.6	0.50	8.3
7	4.5	0.52	8.0	4.5	0.53	8.2	4.5	0.54	8.2	4.6	0.54	8.3

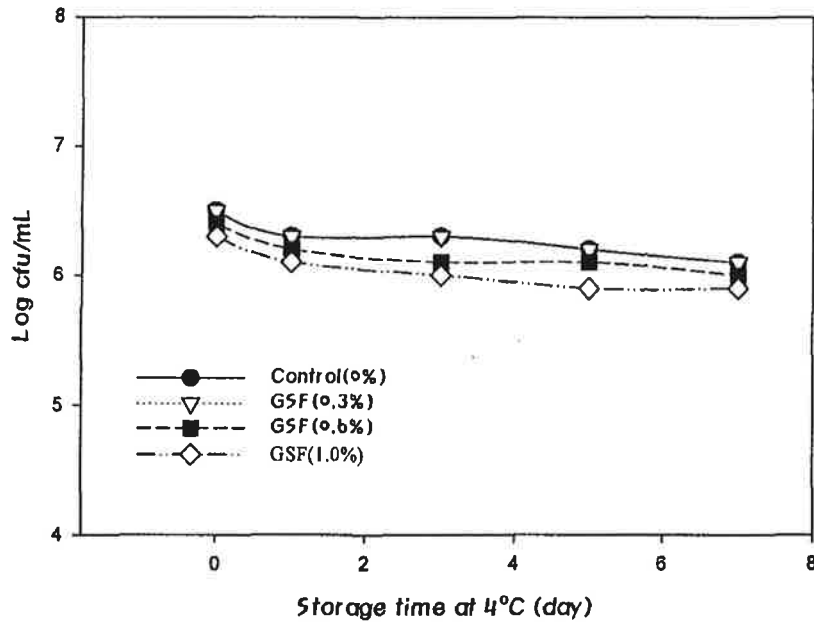


Figure 4-5. Changes in the viable cell counts in various yogurt samples during storage at 4°C.

3) 발아홍화 첨가 요구르트에 대한 관능평가

요구르트의 품질을 결정하는 중요한 요소로는 일반적으로 외관(색상 포함), 향미(맛과 향기), 조직감을 들 수 있으며, 탈지분유에 발아홍화 분말을 각각 0%, 0.3%, 0.6%, 1.0%로 첨가하여 플레인 요구르트를 제조하여 그림 4-6의 검사표를 이용하여 관능평가를 실시한 결과, 각각의 시료들의 관능 평가에 대한 결과는 표 4-10과 같다. 0%에서 0.3%까지 모든 관능항목에서 비슷한 평가를 받았으나 1.0% 첨가시료는 다른 시료들에 비해서 가장 낮은 평가를 받았다. 발아홍화 추출물의 향과 색도가 관능평가에 영향을 준 것으로 판단된다(그림 4-7).

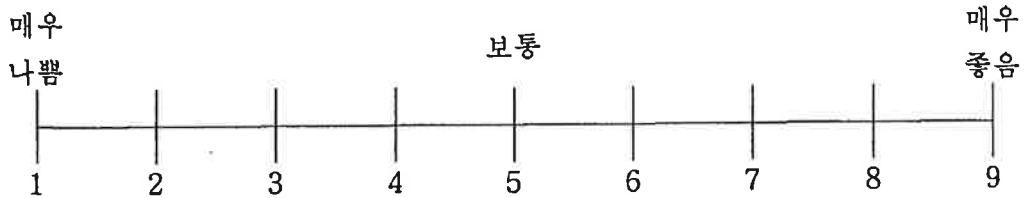
기타 소견으로는 인삼과 같은 진한 향과 쓴맛이 느껴져 쓴맛과 향을 개선하고 단맛을 추가하면 좋을 것이라는 의견 등

성별:

나이:

홍화를 첨가하여 제조한 요구르트입니다.

다음의 시료들을 보시고 향, 맛, 조직감 및 종합 기호도에 따른 점수를 기입하여 주십시오.



시 료	외관	향	맛	조직감	종합기호도
175					
234					
318					
456					

기타 소견 :

대단히 감사합니다!!!

Figure 4-6. Questionnaire for sensory evaluation.

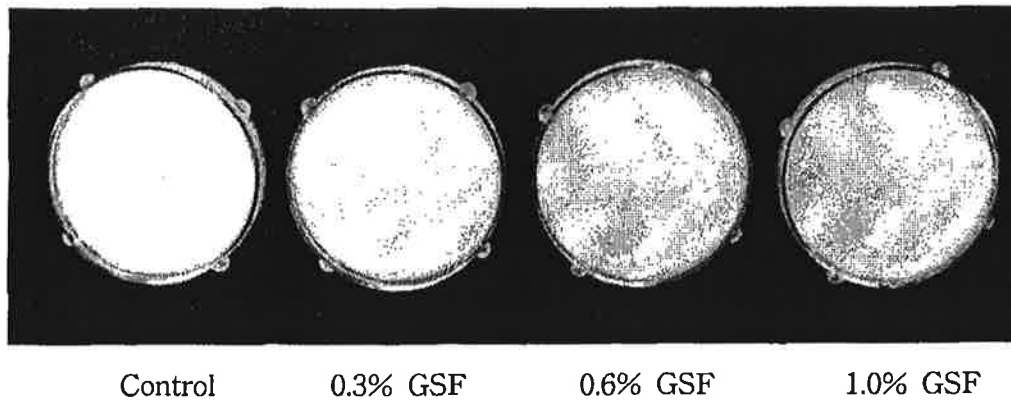


Figure 4-7. Appearance of the yoghurt containing germinated safflower seed extract.

GSF : germinated safflower seed powder

이 있었다. 그러므로 이를 개선하기 위한 제조공법과 첨가제에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

Table 4-10. Sensory evaluation score for yoghurt containing germinated safflower seed extract

samples	Appearance (color)	Flavor	Taste	Texture (mouthfeel)	Overall Acceptability
Control	7.1±1.5 ^a	7.3±1.2 ^a	4.6±1.8 ^a	6.2±2.2 ^a	5.3±1.8 ^a
0.3%	6.1±1.2 ^{ab}	5.8±1.2 ^b	3.0±1.4 ^b	5.4±1.8 ^b	4.0±1.5 ^b
0.6%	5.5±1.5 ^b	4.7±1.5 ^c	2.4±0.8 ^c	4.5±1.8 ^c	3.1±1.4 ^{bc}
1.0%	5.1±1.3 ^b	4.5±1.5 ^c	2.1±1.2 ^c	4.2±1.7 ^c	2.6±1.2 ^c

Values are mean ± Standard deviation

The same *superscript* in the same column indicates no significant differences ($p \leq 0.05$)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

1. 발아의 최적화

실험실 수준의 발아최적화를 성공적으로 수행했으며 또한 대형발아기에서의 발아도 성공적으로 수행했다. 특히 홍화씨의 도정에 의한 발아율의 제고는 특히 주목할 만하다.

2. 홍화발아씨의 기능성

in vitro 및 in vivo 생리기능성(골다공증예방효과, 콜레스테롤저하효과, 항혈전효과) 및 성분분석을 성공적으로 수행했다. 발아에 의해 생리기능성이 훨씬 재고되었으며 특히 발아에 의한 isoflavone함량의 획기적 증가는 주목할하다.

3. 분말 및 추출물 제조 및 품질 평가

성공적으로 발아홍화의 분말 및 추출물 제조를 성공적으로 수행하였으며 이들은 비교적 높은 저장안정성을 보였다. 특히 35%에 달하는 껍질을 용이하게 제거함으로 섭취시 발생하는 위장장애를 없앨 수 있음은 주목할 만하다.

4. 기능성 모델식품의 제조 및 품질 평가

기능성 모델식품의 제조를 성공적으로 수행했으며, 이들은 우수한 관능특성을 가졌다. 상용화가 가능할 것으로 판단된다.

5. 산업재산권 출원 및 학술발표

특허출원 1편을 출원하였으며, 학술발표를 4편하였고, 앞으로 학술발표 1편, 학술지게제 4편을 수행할 예정이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재 수행한 모델식품 외의 다양한 식품에의 응용실험이 이루어져 발아홍화씨의 적용범위를 확대하면 좋겠다.

앞으로 영농조합 등에 기술을 이전할 계획이다. 발아홍화의 우수한 기능성과 겹질제거된 점이 특징인 발아홍화 분말을 직접 식용하거나 식품에 응용하는 점이 상용화를 가능하게 할 것으로 예상된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

관련 없음

여 백

제 7 장 참 고 문 헌

김승호, 이윤진, 권대영 (1999) 전통된장으로부터 angiotention converting enzyme 저해물질 분리 31(3): 848-854

유주현, 식품공학실험서 I, 탐구당, p446 (1994)

장건형: 식품의 기호성과 관능검사. 개문사, p.167(1992)

Aloia, J.F., Cohr, S. H., Vaswani, A., Yeh-J. K., Yuen, K. and Ellis, K. Rich factors for postmenopausal osteoporosis. *Am. J. Med*, 78. 95(1985)

AOAC: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1980)

AOAC: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1984)

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Sapuntzakis MS, Guo P, Kukreja SC. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr* 126: 161-167(1996)

Beevers, H.: Microbodies in plants: biogenesis of glyoxysomes. In *Regulation of Developmental Processes in Plants*, eds Schitte, H.R. & Gross D. Fisher, Jena, Germany, pp 159-172 (1978)

Beevers, H.: Organelles from castor bean seedlings: Biochemical roles in gluconeogenesis and phospholipid synthesis. In *Recent Advances in the Chemistry and Chemistry of Plant Lipids*, eds Gailliard T. & Mercer E.I., Academic Press, New York, USA, pp 287-299 (1975)

Bess D.H. Clantons P.J.: Dietary Ca intake and bone loss from the spine in healthy postmenopausal women.

Am. J. Clin. Nutr. 46, 685-687(1987).

Blanusa M, Matkovic V, Kostial K. Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. *Pflugers Arch.* 375: 239-244(1978)

Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1194-1204 (1958)

Block, G. and Langseth, L. : Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technology*, 48, 80-85(1994)).

Bourne M. Food texture and viscosity. 2nd ed. Academic Press(2002)

Canvin, D.T. and Beevers, H.: Sucrose synthesis from acetate on the germinating castor bean: kinetics and pathway, *J. Biol. Chem.*, 236, 988-998 (1961)

Choi, T.S., Sur,J.H., Kim,C.H., Kim, Y.M., Han, S.S. and Lee,S.Y.: Effect of dietary buckwheat vegetables on lipid metabolism in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 212-218(1994)

Dimino, G., and Silver, M.J.: Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Phamacol. Exp. Ther.*, 225, 571 (1983).

Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM. Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 37: 741-744(1988)

D'Appolonia, B.L. Rheological and baking studies of legume wheat flour blends. *Cereal Chem.* 54(1): 53-63 (1997)

Hietala EL. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner* 20: 57-65(1993)

Huang, K.C.: Antihypercholesterolemic herbs. In "The pharmacology of Chinese herbs" Huang, K.C.(ed). CRC press, Boca Raton. Florida. p. 99-106(1993)

Ichihara, K. and Noda, M.: Lipid synthesis in germinating safflower seeds and protoplasts, *Phytochemistry*, 20, 1023-1030 (1981)

Illingworth, D.R.: An overview of lipid-lowering drugs. *Drugs*. S3.63-71(1988)

KFDA, Korean Food Code. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea (2002)

Kim, K.Y. Kim, S. B. and Kim J.W.: Effects of safflower seed Yoghurt on the Osteoporosis in ovariectomized rat. *J. Animal Sci. & Technol.(Kor.)* 46(1), 69-76(2004)

Kim, K.S., Kim, M.J., Park, J.S., Sohn, H.S., and Kwon, D.Y. Compositions of functional components of traditional Korean soybeans. *Foods Sci. Biotechnol.* 12: 157-160 (2003)

Kim, W.J., Lee, H.Y., Won, M.H., and Yoo, S.H., Germination effect of soybean on its contents of isoflavones and oligosaccharides, *Food Science and Biotechnology*, 14: 498-502 (2005)

Kleinsek, D.A., Dugan, R.E., Baker, T.A. and Porter J.W. : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *Methods in Enzymology*, 71, 462-479 (1981)

Kornberg, H.L. and Beevers, H.: Phosphoric monoester hydrolase in cotyledons of germinating peanut seeds (*Arachis hypogea L*), *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 531-539 (1957)

Lee, K.A. and Kim, S.H. : SSGE and DEE, new

peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation, *Food Chemistry*, 90, 389-393 (2005)

Majeska: Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line : possible mediation by cyclic AMP, *Calcif. Tissue Int.* 34, 59~66 (1982)

Mona Shiess Calvo.: Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J. Nutr.* 23, 1627-1633(1993)

Morita, N., Kang, W.W., Hamauzu, Z. and Sugimoto., Y. Effect of amaranth flour on some properties of wheat dough and bread. *J. Appl. Glycosci.* 46(1):23-30 (1999)

Mosmann, T.: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*(1978)

Offem, J.O., Egbe, E.O., and Onen, A.I.: Changes in lipid content and composition during germination of groundnuts, *J. Sci. Food Agric.*, 62, 147-155 (1993)

Price, M.L. Van Scoyoc, S. and Butler, L.G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.*, 26, 1214 (1978)

Pyler, E.J. Physical and Chemical Test method. Sosland Pub. Co., Merrian, KS, USA(1979)

Quershi, A.A., Burger W. C. Peterson D.M. and Elson, C.E.: The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J. Biol. Chem.*, 261, 10544-10550(1986)

Qureshi, A.A., Burger, W.C., Pretice, N., Bird, H.R. and Sunde, M.L.: Regulation of lipid metabolism in chicken liver by dietary cereals supplemented with culture filtrate

of *Trichoderma Viride*. *J. nutr.*, 110, 288-394(1980)

Rabari, L.F., Patel, R.D., Breuer, J.: Changes in the carbohydrate content of groundnuts (*Arachis hypogea*) during germination, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38, 4-15 (1961)

Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New Eng. J. Med.* 318, 818-828(1988)

Shetty, P., Attallah, M.T., and Shetty, K.: Enhancement of total phenolic, L-DOPA, and proline contents in germinating fava bean (*Vicia fava*) in response to bacterial elicitors, *Food Biotech.*, 15(1), 47-67(2001)

Shon, D.H., Lee, K.A., Kim, S.H., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., and Shin, J.I.: Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(4), 684-689 (1996)

Singh, D.P. and Sinh, R.: Variation of the composition of carbohydrate of groundnuts (*Arachis hypogea*) during germination, *Indian J. Agric. Res.*, 8, 61-69

Singleton, V.L. and Rossi, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. *Am. J. Enol. Vitrc.* 16, 144-158. (1965)

Thomas M1, Hope WG, Ibarra J. The relationship between long bone growth rate and duodenal calcium transport in female rats. *J Bone Miner Res.* 3: 503-508(1988)

Varner, J.E.: Seed development and germination. In *Plant Biochemistry*, eds Bonner, J. & Varner, J.E. Academic Press, New York, USA, pp 783-795 (1965)

Wankhede, D.B., Saroja, R., and Rao, M.R.: Changes in

carbohydrates and the activity of β -galactosidase, pentosanase and lipase during germination of groundnuts (*Arachis hypogea*), *J. Sci. Food Agric.*, 28, 167-172 (1977)

Wronski, T.J., Cintron, M., Doherty, A.L., Dann, L.M. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinol.* 123cf(2): 681-686(1988)

Zhu, D., Hettiarachchy, N.S., Horax, R. and Chen, P Isoflavone contents in germinated soybean seeds, *Plant Foodss for Human Nutrition*, 60: 147-151 (2005)