pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 3, pp. 271~276 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

알로에 베라(Aloe vera) 겔 중 총 다당체 시험법 개선

이영주 · 김윤제 · 임동길 · 윤태형 · 신지은 · 윤창용 · 김정훈 · 박미선[1] · 강태석 · 정자영[2]*
식품의약품안전평가원 영양기능연구팀, [1]식품의약품안전평가원 위해분석연구과, [2]식품의약품안전평가원 독성연구과

Improvement of Analytical Method for Total Polysaccharides in Aloe vera Gel

Young Joo Lee, Yunje Kim, Donggil Leem, Taehyung Yoon, Jieun Shin, Changyong Yoon, Junghoon Kim, Misun Park[1], Tae Seok Kang, and Jayoung Jeong[2]*
Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
[1]Department of Risk Assessment, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
[2]Department of Toxicological Research, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
(Received February 28, 2012/Revised April 9, 2012/Accepted July 18, 2012)

ABSTRACT - This study intented to standardize the method for total polysaccharide, which is a functional marker for aloe vera gel in Korea. We used four lyophilized raw materials and commercial aloe gel products, certified as Health Functional Food by Korea Food and Drug Administration, including powder, solution, jelly, tablet and capsule, to optimize the analytical condition of dialysis and phenol-sulfuric acid reaction in polysaccharide analysis. The optimal conditions for polysaccharide analysis included 1 L water for dialysis and change 3 times for 24hr against 25 mL prepared sample solution. Validation test showed lower than 5% of coefficient of variation(CV) in intra-, inter-day validation in lyophilized raw materials and 4 types of commercial products. In inter-person and inter-laboratory validation with 4 persons from 4 different laboratories, CV(%) were 5.50 and 6.64 respectively. The linearity of polysaccharide analysis was assessed using 5 serial concentration of lyophilized raw materials(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%(w/v)). The results showed $R^2 \geq 0.995$ of high linearity. In the commercial aloe vera gel products, the results of reproductivity showed lower than 7.08% and revealed that the standardized method from this study ensured high precision for polysaccharide analysis.

Key words: Aloe gel, health functional food, polysaccharides, validation

건강 수명에 대한 관심이 증가함에 따라 국내 건강기능식품의 시장 규모가 확대되고 건강기능식품의 안전성 확보와 품질 향상의 중요성이 부각되고 있다. 또한 건강기능식품의 기준, 규격 확인 시험의 기준이 되는 건강기능식품 공전 시험법의 개선을 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

건강기능식품 중 알로에 겔 제품의 생산 수입실적은 2010년 기준 732억 수준이며 국내 고시형 건강기능식품 제품으로서는 4번째로 큰 시장규모를 확보하고 있다[1]. 알로에는 백합과(*Liliaceae*)의 알로에 속(*Aloineae*)에 속하며, 고대 로마시대 이전부터 치료용으로 사용되어져 온 것으로 추정되며 약 200여종이 존재하는 것으로 알려져 있으나[2], 현재 건강기능식품 공전에서는 Aloe vera, Aloe arborescence, Aloe saponaria 3종에 대하여 원료로 인정하고 있다. 그 중 알로에 겔은 알로에 베라 잎의 외피를 제거한 무색의 겔 부분을 분리한 것이다. 알로에 겔의 조성은 재배 환경 및 수확 시기에 따라 다양하나, 다량의 수분(98.5~99.5%)을 함유하며 나머지의 60%이상이 mannose, glucose가 주성분인 acetylglucomannan, acetylmannan, glucomann 등의 다당체이며, 그 외에 비타민, 미네랄(Ca, Mg, K, Na), 효소, 페놀화합물 및 유기산 등을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다[3-6]. 또한, 알로에 겔은 면역 증진 또는 조절에 의한 상처 치료효과가 알려져 있으며[5] 그 외에 살균작용 및 항염증, 항암, 면역조절 및 소화계 보효 효과 등이 보고되고 있다[6-9]. 알로에 유래 다당체의 분자량은 알로에 품종이나 분획에 따라 2,500~450,000 Da이상까지 다양한 것들이 알려져 있으며[9] 5,000~50,000 Da 범위의 추출 분획에서도 위궤양 억제, 치료의 효과가 있는 것으로 알려졌다[10].

현재 우리나라는 알로에 겔의 기능성분(또는 지표성분)을 총 다당체로 정하고 있으며, 그 함량이 고형분 중에서 30 mg/g이상 함유해야 한다고 규정하고 있다. 알로에 겔

*Correspondence to: Jayoung Jeong, Department of Toxicological Research, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
Tel: 82-43-719-5102, Fax: 82-43-719-5100
E-mail: 0jjy@korea.kr

제품의 규격 항목으로 성상, 총 다당체, 안트라퀴논계화합물(무수바바로인으로서, 0.005%이하), 대장균군을 정하여 관리하고 있으며, 피부건강, 장 건강, 면역력 증진에 도움을 줄 수 있음이라는 기능성을 표기할 수 있도록 설정되어 있다[11].

알로에 겔의 기능성분(지표성분)인 총 다당체의 분석방법은 mannose를 분석 표준물질로 하여 페놀과 황산으로 발색시켜 정량분석하는 비색법을 이용하고 있다[12]. 이 방법은 알로에 겔 고유의 다당체 뿐만 아니라 자연적으로 존재하거나 첨가된 작은 분자량의 다당체들도 반응하게 되므로 투석을 통한 저분자 다당체의 제거 정도에 따라 실험자간 편차가 발생할 수 있다. 알로에 겔 제품의 품질관리를 위하여 현행 건강기능식품공전 총 다당체 시험법의 전처리 및 흡광측정 과정의 요인을 검토하여 최적 시험법을 개발하고 밸리데이션에 의한 시험법 검증을 통해 정밀성을 높이는 한편 국내 유통되고 있는 다양한 제형의 제품에 최적화한 시험법으로 적용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

국내 유통제품에 사용되고 있는 국내생산 원료분말 1종, 수입 원료분말 3종과 식품의약품안전청에 의해 건강기능식품으로 인정받은 제품 11종을 백화점 및 대형마트에서 구입하거나 방문판매용 제품은 전문업체로부터 제공받아 사용하였다. 제품은 분말, 액상, 캡슐, 젤리, 정제를 포함하였으며 제품에 표기된 보관조건에 따라 상온 또는 4ºC에서 냉장 보관하였다.

장비와 시약

흡광도 측정에는 UV spectrophotometer(Varian, Cary 100, USA)와 quartz cell(Hellma, Germany)을 사용하였다. 투석에는 폭 46 mm, 3,500 dalton(Fisher Scientific, USA), 폭 10 mm, 3,500 dalton (Spectrum Labs, USA) 규격의 튜브를 1시간 동안 증류수에 담가 활성화시킨 후 사용하였다. Mannose 표준품과 sulfuric acid는 Sigma(Sigma, USA) 사의 제품을, 그 외 실험에 사용된 시약은 특급시약을 사용하였다. 시험용 물은 18.2 MΩ 수준으로 정제된 증류수(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 사용하였다. 5%(w/v) 페놀용액은 페놀 5 g을 취하여 100 mL이 되도록 용해시켜 상온에 보관하며 사용하였다.

표준용액 조제

Mannose 표준품을 10%(w/v)의 농도가 되도록 증류수에 녹인 것을 표준원액으로 하여 이를 증류수로 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.35, 0.5 mg/mL가 되도록 단계적으로 희석한 것을 표준용액으로 사용하였다.

시료전처리 및 시험용액 제조

건강기능식품공전 시험법 III.3.4.5[13]을 기반으로 전처리 조건에 따른 비교를 위하여 원료분말을 0.1~0.5%(w/v) 수용액이 되도록 취하고 증류수에 1시간 동안 충분히 교반하여 용해시켰다. 이를 50 mL로 정용한 후 원심분리(4000 rpm, 10min)하여 불용성 성분을 제거하였다. 상등액 25 mL를 취하여 활성화 된 10 mm 혹은 46 mm 투석 튜브(3,500 Da)에 옮겨 담고 24~72시간 동안 투석하면서 증류수 교체를 1~3회 실시하였다. 투석 후 투석용액을 50 mL로 정용하거나 정용하지 않은 시료를 그대로 시험관으로 옮겨 시험용액으로 사용하였다. 발색반응 비교에는 mannose, glucose, sucrose, maltodextrin, dextrin을 각각 0.1%(w/v) 수용액이 되도록 제조하여 시험용액으로 사용하였다.

발색 및 흡광도 측정

시험용액과 표준용액 200 μL를 각각 시험관에 취하여 5% 페놀용액 1 mL을 가하고 vortex mixer로 온화하게 혼합한 후 진한 황산 5 mL 가하고 다시 vortex mixer로 혼합하였다. 상온에서 20분간 반응 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 다당체 함량은 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{총 다당체함량}(mg/g) = C \times \frac{(a \times b)}{S} \times \frac{1}{1000}$$

C : 검량선으로부터 얻은 시료의 농도(μg/mL)
a : 시험용액의 전량(mL)
b : 희석배수
S : 시료 채취량(g)
1/1000 : 단위 환산 계수

시험법 검증

원료성 분말 4종의 0.1%(w/v) 수용액을 각 3개씩 준비하여 3일에 걸쳐 분석하여 일내·일간 재현성을 측정하였다. 최적 시험조건에 대한 시험절차서와 맹검시료 1종을 제공하여 1개 실험실에서 4명의 실험자가 5회 분석하여 실험자간 정밀성을 분석하고, 정부기관 1곳, 알로에 업체 3곳의 별도 실험실에서 각5회 분석하여 실험실간 정밀성을 확인하였다. 또한, 직선성 확인을 위해 원료 분말 1종의 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%(w/v) 수용액을 농도별로 3반복 측정하였다.

유통제품 분석

분말 및 액상 시료는 0.1%(w/v)의 수용액을 바로 전처리에 적용하였으며, 정제 환의 경우 분말화하여 0.1%(w.v)가 되도록 시료를 취하였고, 캡슐 제품의 경우 건강기능식품 공전시험법에 따라 핵산을 이용하여 지방을 제거한 후 전처리에 적용하여 사용하였다.

결과 및 고찰

투석의 최적 조건 설정

투석액 교체 및 투석기간 비교

2종의 알로에 겔 원료성 분말을 이용하여 1일과 3일간 투석 시 투석외액의 물교체 횟수를 1, 2, 3회로 각기 달리하여 발생하는 편차를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 투석액 교체횟수나 투석기간에 대하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 투석외액의 온도변화와 미생물 증식이 분석의 편차 발생의 요인이 될 수 있는 것으로 알려져 있어 1일간 투석을 실시하고 편차가 적게 나타난 3회의 투석외액 교체조건을 최적 조건으로 선정하였다.

투석막 규격 비교

2종의 알로에 겔 원료성 분말을 대상으로 46 mm와 10 mm 너비를 갖는 2종의 투석막(3,500 Da)을 사용하여 24시간동안 동일한 조건하에 투석을 실시하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 46 mm와 10 mm의 투석막 모두 총 다당체 함량의 편차는 크게 발생하지는 않았지만, 분말 C의 경우 두 규격간에 유의적 함량 차이가 나타나는 것으로 확인되었다($p = 0.019$). 46 mm 투석막을 사용할 경우 총 다당체 함량이 적게 나타난 것은 투석외액인 증류수가 투석 튜브 내부로 상대적으로 많은 양이 투입되었거나, 작은 입자크기의 당들이 튜브 외부로의 이동이 상대적으로 많은 것으로, 두 규격 중에는 46 mm의 튜브가 물질의 이동이 활발히 이루어지는 것으로 사료되어 46 mm 튜브의 사용을 선정하였다.

투석후 정용 여부의 비교

투석 후 투석액 양의 변동이 총 다당체 함량에 영향을 미치는지 확인하고자 4종의 알로에 겔 원료성 분말에 대해 총 다당체 함량을 비교하였다. 그 결과, 정용한 시료와

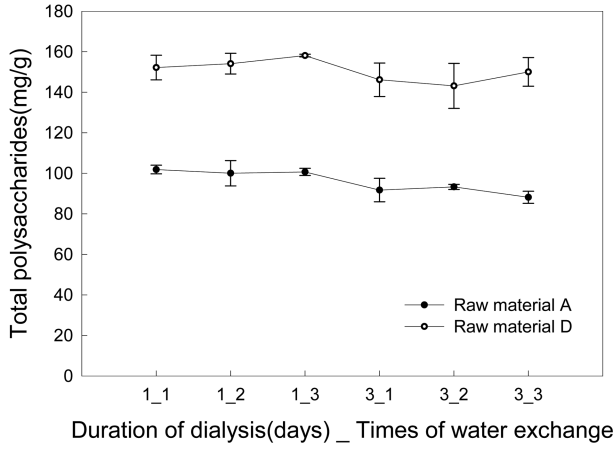

Fig. 1. The effect of dialysis condition on the contents of total polysaccharide.

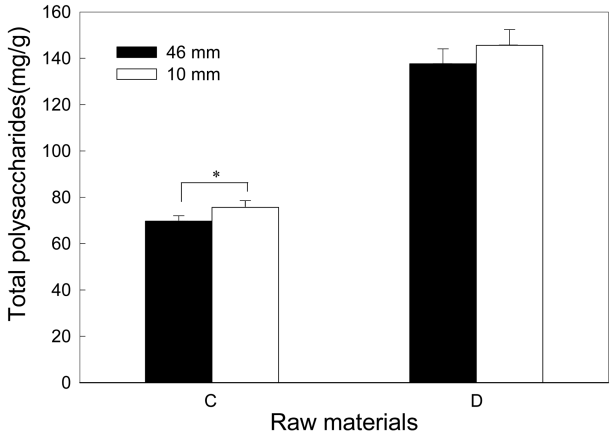

Fig. 2. The effect of the dialysis film width on the contents of total polysaccharide.

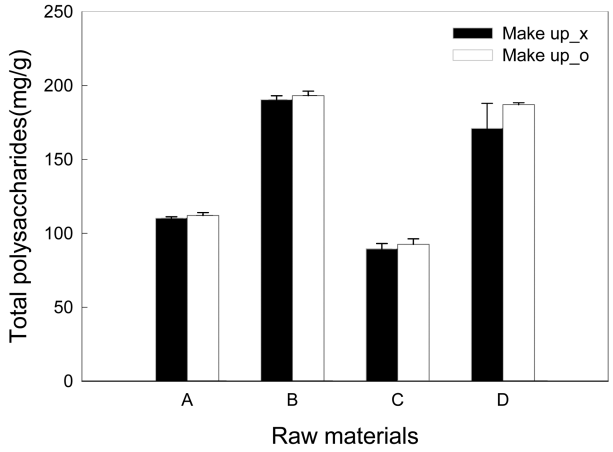

Fig. 3. The effect of making up the final volume on the contents of total polysaccharide.

정용하지 않은 시료간의 함량차이는 유의적으로 발생하지는 않았으나, 정용단계를 거친 시료에서 총 다당체 함량의 편차가 적게 발생하였다(Fig. 3). 또한 투석액의 농도를 달리하였을 때, 투석액의 농도가 높을수록 투석전후의 부피차이가 커지는 현상을 나타내 투석후 정용이 필요함을 확인하였다.

페놀황산 반응 조건에 따른 정밀도

총 다당체 분석에 적합한 페놀황산 반응시간을 확인하기 위하여 mannose, glucose, sucrose, maltodextrin, dextrin을 이용하여 5분 간격으로 반응시간에 따른 흡광변화를 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 흡광 값은 반응 5분부터 35분 사이에서 흡광 차이가 크지 않아 현행 20분 반응을 채택하였다. DuBois 등[12]은 페놀황산법에 의한 다당체 측정시 높은 온도에서 발색시약의 민감도가 높아지기 때문에 높은 온도가 요구되며, 열손실을 최소화 하도록 내부 직경이 16~22 mm 범위의 시험관 사용을 권장하였으며 교

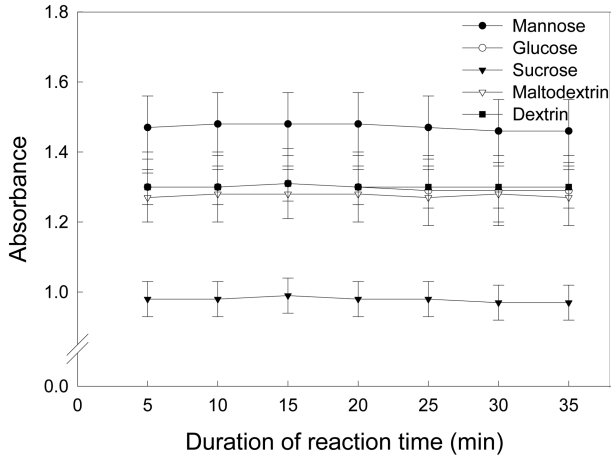

Fig. 4. The effect of reaction times of phenol and sulfuric acid on the absorbances of several saccharides.

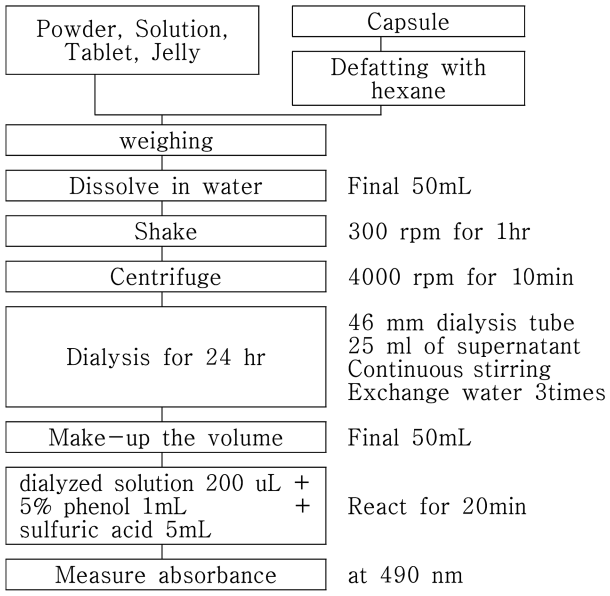

Fig. 5. Flow diagram of optimized method for total polysaccharides analysis in Aloe gels.

반 후 10~20분 간 방치 후 흡광을 측정하고, 흡광이 수 시간 동안 안정하다고 보고하였다.

시험법 표준화에 따른 시험법 검증

전처리 표준화를 위한 시험 결과에서 정밀성이 높은 것으로 나타난 최적 조건을 Fig. 5와 같이 설정하고 최적시험법을 검증하였다.

일내 일간 정밀성 분석

원료성 분말 4종에 대하여 일내·일간 정밀성을 시험한 결과 Table 1과 같이 일내정밀성(intra-day)의 변이계수(coefficient of variation, CV)가 2.56% 이하였으며, 각각 3반복 시료를 포함한 3일에 걸친 일간정밀성(intrer-day)에서도 4.85% 이하로 나타나 분석 batch가 다른 경우에서도 시료간의 높은 정밀성을 확보할 수 있음을 확인하였다. Leyva 등[14]은 *P. pastoris*에서 총 다당체 함량을 측정하기 위해 페놀황산법을 변형한 anthrone-sulfuric acid법을 적용하여 정밀성을 검증한 결과, intra-, inter-assay의 변이계수는 각각 4.79%, 8.94% 이하로 나타났다. 시료와 전처리법에서 차이는 있으나 총 다당체 함량을 측정하기 위한 비색법을 적용했다는 점에서 비교했을 때, 본 연구는 낮은 CV값을 나타내 validation 결과가 비교적 신뢰할 수 있는 수준인 것으로 확인할 수 있었다.

Table 1. Precision of optimized total polysaccharides analysis in 4 raw materials(CV, %)

Raw materials	Intra-day[1)]	Inter-day[2)]	Inter-person[3)]	Inter-laboratory[4)]
A	2.25	4.43	-	-
B	1.50	3.35	-	-
C	2.56	4.85	-	-
D	1.09	2.38	5.50	6.64

[1)]Data from three replicate measurements of each sample
[2)]Data from three day measurements
[3)]Data from five person experimented in a single laboratory
[4)]Data from five laboratories

실험자간 · 실험실간 정밀성 분석

동일 실험실에서 4명의 연구자가 동일 시료에 대하여 각각 5반복 실험을 실시하고 각각의 표준용액을 이용한 분석을 실시한 결과, Table 1과 같이 정밀한 실험값(CV = 5.50%)을 나타내었다. 또한 국내 알로에 겔 제품의 품질관리 실험실을 포함한 4곳에서 동일한 시험법을 적용하여 동일한 시료를 분석한 결과 Table 1과 같이 CV 6.64% 정도로 양호하게 나타났다.

직선성 확인

시료용액의 농도를 달리하여 농도별 총 다당체의 양에 대한 직선성을 확인하고자 알로에 겔 원료성 분말 수용액을 0.1~0.5% 범위에서 총 다당체 양을 측정하였다. 각 농도에서 3 반복 측정한 결과 Fig. 6과 같이 범위 내에서 R^2이 0.9951의 상관계수를 나타나 USP(미국약전)에서 권장하는 $R^2 \geq 0.99$보다 높았으며, 만족할 만한 수준의 직선성이 나타난 것으로 확인하였다.

유통 제품의 제형별 정밀성

정밀성을 확인한 최적시험법을 이용하여 국내 시판되고 있는 제형별(캡슐, 분말, 액상, 젤리, 정제) 제품의 일내 반복시험에 의한 정밀성을 분석하였다(Table 2). 제품의 제형에 따라 물성 및 부형제들이 다양함에도 불구하고 CV(%)가 7.08%이하로 나타나 비교적 높은 일내 정밀성이 확보

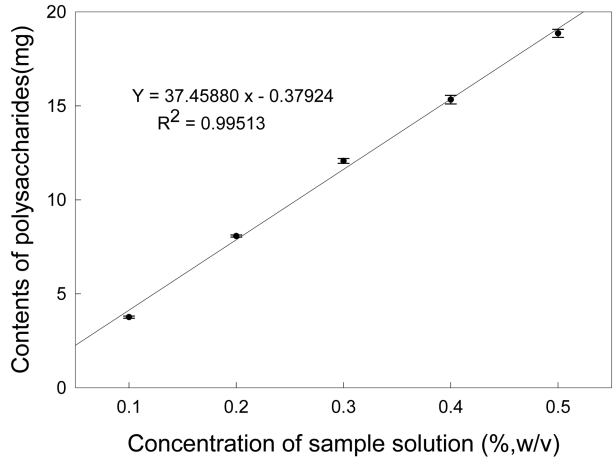

Fig. 6. Linearity of total polysaccharides according to the concentration of sample solution.

Table 2. Contents of total polysaccharide of commercial aloe gel products

Products	Type	Total polysaccharide[1)]	Precision[2)] (CV, %)
A	Capsule	1.59 ± 0.05	3.34
B		37.65 ± 1.46	3.88
C	Powder	116.63 ± 8.25	7.08
D		180.54 ± 11.61	6.43
E	Solution	8.90 ± 0.21	2.37
F		4.61 ± 0.29	6.31
G		2.17 ± 0.04	1.78
H		4.47 ± 0.13	2.90
I		8.62 ± 0.15	1.72
J	Jelly	2.25 ± 0.07	4.29
K	Tablet	217.27 ± 3.47	1.60

[1)]Mean ± standard deviation, mg/g
[2)]Data from three replicate measurements of each sample

됨을 확인하였다. 분말시료와 정제시료의 경우 총 다당체의 함량이 100 mg/g 이상으로 제품 중 총 다당체 함량이 10% 이상인 것으로 확인되었으며, 액상제품은 모두 10 mg/g미만으로 제품 중 함량이 1% 미만인 것으로 나타났다.

알로에겔 중 다당체를 측정하기 위한 시험법으로 Congo-red 발색법등에 대한 연구가 보고된 바 있으나[15)], 알로에겔 제품의 분석에 활용되고 있지는 않고 있다. 페놀황산법은 당 분석을 위한 비색법 중 가장 간편하고 신속한 방법으로써 DuBois 등[12)] 에 의해 고안되어 광범위하게 이용되고 있다[16,17)]. Masuko 등[18)]은 microplate를 이용하여 50 µl의 시험용액에 페놀, 황산용액을 첨가하고 90ºC 수욕조 상에서 가온하여 반응시키는 방법으로 소량의 시험용액을 이용하여 다수의 시료를 일괄 분석해야 하는 시험에 효과적인 방법을 제안하기도 하였다. 본 연구는 식품공전 알로에 겔의 총 다당체 시험법의 반응조건에 따른 편차 발생의 문제점을 개선하기 위하여 현행 시험법의 세부 최적조건을 설정하고 표준화함으로써 분석의 정밀성을 확보할 수 있음을 확인하였다.

요 약

건강기능식품 중 알로에 베라 겔 제품의 기능성분(지표성분)은 총 다당체로 설정되어 있으며 식품공전 시험법은 페놀황산법에 의하여 총 다당체 함량을 측정하도록 되어 있다. 본 연구에서는 페놀황산 반응에 의한 총 다당체 분석의 분석편차 발생의 주요인으로 파악된 투석단계에 대하여 세부 분석조건(투석막의 너비, 투석외액의 부피와 교체시간, 투석 후 정용여부, 페놀황산 반응시간)에 대한 최적 조건을 설정하였고 이를 토대로 표준화된 시험법을 마련하여 실험자, 실험실의 주관적 설정에 의한 편차발생을 최소화하고자 하였다. 표준화 된 시험법의 검증을 위해 알로에 베라 겔 원료성 분말 및 제품에 대하여 일내(2.56% 이하), 일간(4.85% 이하) 정밀성과 실험실간(5.50% 이하), 실험자간(6.64% 이하) 정밀성을 확인한 결과, 비교적 높은 정밀성을 확보할 수 있었다. 알로에 겔 유통제품에 대한 정밀성에서도 비교적 신뢰할 수 있는 수준(7.08% 이하)의 결과를 확인하였다. 최적화한 표준 시험법에 따른 총 다당체 분석은 알로에 겔 제품 검사의 정밀성을 확보할 수 있을 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 식품의약품안전청 연구개발비(11161 식품안015)로 수행되었으며 알로에 업체의 협조에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청: 건강기능식품 유통시장 현황. pp. 19-23 (2011).
2. Morton, J.F.: Folk uses and commercial exploitation of Aloe leaf pulp. *Econ. Bot.*, **15**, 311-319 (1961).
3. McAnalley, B.H.. Process for preparation of Aloe products. European Patent WO 89/06539 (1993).
4. Femenia, A., Sánchez, E.S., Simal, S., Rosselló, C.: Compositional Features of polysaccharides from Aloe vera(Ale barbadensis Miller) plant tissues. *Carbohydr. polym.*, **39**, 109-117 (1999).
5. 서화중: Aloe gel의 생리 효과에 대한 고찰 -Gel의 다당류와 미량 성분을 중심으로-. 한국영양식량학회지, **24(6)**, 1026-1038 (1995).
6. Hamman, J.H.: Composition and Applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules*, **13**, 1599-1616 (2008).
7. 최진호, 김동우, 유제권, 한상섭, 심창섭: 기억·학습장애

동물모델 SAMP8에 미치는 알로에(Aloe vera)의 영향 II. SAMP8의 지질대사에 미치는 알로에의 투여효과. 생명과학회지, **6(3)**, 178-184 (1996).
8. 하배진: 중금속의 생체독성에 대한 알로에의 저감연구. 한국환경과학회지, **7**, 46-51 (1998).
9. Reynolds T. and Dweck A.C.: Aloe vera leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, **68**, 3-37 (1999).
10. Teradaira, R., Shinzato, M., Beppu, H. and Fujita, K.: Antigastric ulcer effects in rats of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger extract. *Phytother. Res.*, **7**, S34-S36 (1993).
11. 식품의약품안전청: 건강기능식품공전. II.2.4.5. 알로에 겔. pp. 99 (2011).
12. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
13. 식품의약품안전청: 건강기능식품공전 시험법. II.3.4.5. 총 다당체. pp. 216-218 (2011).
14. Leyva, A., Quintana, A., Sánchez, M., Rodriguez, E.N., Cremata, J. and Sánchez, J.C.: Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation. *Biologicals*, **36**, 134-141 (2008).
15. Eberendu A.R., Luta G., Edwards J.A., McAnallcy B.H. and Davis B.: Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of *Aloe vera* quality in commercial products. *J. AOAC Int.*, **88(3)**, 684-691 (2005).
16. Chang X.L., Feng Y.M. and Wang W.H.: Comparison of the polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of *Aloe arborescens* tissues. *J. Taiwan Inst. Chem. Engrs*., **42**, 13-19 (2011).
17. Shin S.I., Lee C.J., Kim D.I., Lee H.A., Cheong J.J., Chung G.M., Baik M.Y., Park C.S., Kim C.H. and Moon T.W.: Formation, characterization, and glucose response in mice to rice starch with low digestibility produced by citric acid treatment. *J. Cereal Sci.*, **45**, 24-33 (2007).
18. Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.I. and Lee Y.C.: Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.,* **339**, 69-72 (2005).