

전략체계	혁신 - 3 - 1		수행시기	전반기 (완결)	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S02	작목구분코드	FR-03-FR35
과제종류	공동연구		과제번호	RD009307	
과제명	자색옥수수 건강기능성 특성평가 및 우수 육종소재 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	김희연		농업연구사	옥수수연구소	
연구기간	2020 ~ 2023		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 반수체 유기체를 이용한 자색옥수수 계통 대량 육성 및 품종개발			옥수수연구소	김희연	'20~'23
2) 자색옥수수 포엽 활용 식품소재화 및 적성 탐색			농업환경연구과	이기연	'20~'23
3) 자색옥수수 항비만 기능성 성분 및 작용기전 구명			강원대학교	김성문	'20~'23
키워드	자색옥수수, 포엽, 안토시아닌, 식품원료				

## ABSTRACT

Purple corn Saekso 1 or 5 is a variety with a high concentration of anthocyanins in the husks and cobs. Anthocyanin is a natural pigment that is a secondary metabolite of plants, has a strong antioxidant effect, and is known to have various effects such as anti-diabetes, anti-obesity, and improvement of lipid metabolism. The mixed extract powder of purple corn husks and cobs was registered as a temporary food ingredient in 2017, and research has been pursued to utilize it as a general food ingredient and functional ingredient. The efficacy of liver protection and lipid metabolism has been verified through cell and animal experiments, and human application tests for eye health and prostate improvement are in progress through external joint research. In addition to the bract and cob mixed extract, bract extract alone has the advantage of being easy to process and manage into functional materials due to its low nutritional content. However, husks cannot be used for processing as they are not registered as a food material in Korea, and since they are a different raw material from the previously approved mixed extract of husks and cobs, the Ministry of Food and Drug Safety's temporary registration as a food raw material for using purple corn husks as a food raw material is not possible. In this study, a manufacturing process for bract-only extract was established and the indicator components and analysis method validation of the extract were performed. Safety was proven through a toxicity test at

a GLP institution targeting standardized raw materials, and the maximum non-toxic level (NOAEL) of the bract extract was confirmed to be 5,000 mg/kg·bw/day. Based on the results of the toxicity test, the dosage was set for each food type (solid tea, rice cake, other alcoholic beverages, and candy) through intake evaluation, and the application to the Ministry of Food and Drug Safety's "Recognition of Temporary Standards and Specifications for Food Ingredients" system was completed. In addition, through joint research, the mechanism of action of the anti-obesity activity of the bract extract was investigated. In the future, we plan to promote various food-related commercialization targeting approved food groups of bract extract and expand its use as a health functional food ingredient.

## 1 연구목표

자색옥수수 색소 1호 또는 5호는 포엽과 속대에 안토시아닌이 고함유로 집적되는 품종이다. 안토시아닌은 식물체의 2차 대사산물인 천연색소로 강력한 항산화 효과를 가지며 항당뇨, 항비만, 지질대사 개선 등 다양한 효능이 알려져 있다. 자색옥수수 포엽 및 속대 혼합 추출분말은 2017년 한시적 식품원료로 등재되었으며 그동안 일반 식품소재 및 기능성 원료로 활용하기 위한 연구를 추진하였다. 세포 및 동물실험을 통하여 간보호 및 지질대사 효능이 검증되었으며 외부 공동연구를 통하여 눈건강과 전립선 개선 등의 인체적용시험이 진행중이다. 포엽 및 속대 혼합 추출물 이외 포엽 단독 추출물은 영양성분이 적어 기능성 소재로의 가공 및 관리가 용이한 장점이 있다. 하지만 포엽은 국내에서 식품소재로 등록되어 있지 않아 가공용으로 사용할 수 없으며 기존에 승인 받은 포엽 및 속대 혼합 추출물과는 다른 원료이기 때문에 자색옥수수 포엽을 식품원료로 사용하기 위한 식약처의 한시적 식품원료 등록이 필요하다. 본 연구에서 포엽 단독 추출물 제조 공정을 확립하고 추출물의 지표성분 및 분석법 밸리데이션을 수행하였다. 표준화된 원료를 대상으로 GLP기관에서의 독성시험을 거쳐 안정성이 입증되었으며 포엽 추출물의 최대무독성량(NOAEL)은 5,000mg/kg·bw/day인 것으로 확인되었다. 독성시험 수행결과를 바탕으로 섭취량 평가를 통하여 식품유형별(고형차, 떡류, 기타주류, 캔디류) 용량을 설정하고 식약처 "식품원료 한시적 기준 및 규격 인정" 제도에 신청을 완료하였다. 또한, 공동연구를 통하여 포엽 추출물의 항비만 활성에 대한 작용기전을 구명하였다. 향후 포엽 추출물의 허가유형 식품군을 대상으로 다양한 식품관련 사업화를 추진하고 건강기능식품 원료로서의 사용을 확대하고자한다.

## 2 재료 및 방법

〈제2세부과제 : 자색옥수수 포엽 활용 식품소재화 및 적성 탐색〉

(시험 1) 자색옥수수 포엽 수확후 관리

본 시험은 자색옥수수 포엽의 수확 후 적절 건조 온도 설정 및 품질관리를 위하여 수행되었다. 8월 중순에 수확한 포엽을 상온, 냉풍제습(30℃, 50℃) 조건에서 건조한 시료와 냉장(4℃), 냉동(20℃) 저장 후 냉풍제습 건조한 시료의 수분 및 색소함량을 비교하였다. 품종별 건조 포엽의 조단백질, 조지방 등 일반성분에 대한 시료 특성을 분석하고 건조 후 보관 시료의 색소 품질관리를 위하여 안토시아닌 함량을 분석하였다.

### (시험 2) 자색옥수수 포엽의 대량 추출방법 확립

본 시험에서는 포엽의 대량 추출조건을 확립하기 위하여 주정 비율별 추출수율을 측정하고 주정 비율별 추출물의 생리활성을 검정하였다. 생리활성 검정 분석결과는 항비만 활성 물질 분리 및 작용기전 구명을 위한 공동연구의 기초데이터로 공유하였다. 한시적식품원료 신청용 시료 제조를 위하여 분무건조에 첨가되는 부형제의 비율별 추출 수율 및 안토시아닌 함량을 측정하였다. 우수한 생리활성을 나타내는 추출물 제조를 위하여 주정 및 부형제 비율을 달리한 추출물의 리파아제 저해 활성을 비교하였다. 포엽 추출물 대량 추출을 위한 주정비율은 30%이었고, 부형제는 말토덱스트린으로 농축액 고형분의 20%를 첨가하여 분무건조 추출물을 제조하였다. 대량으로 추출된 시료는 한시적식품원료 신청을 위한 특성분석 시료와 독성시험, 분석법 밸리데이션 시료로 사용하였다.

### (시험 3) 자색옥수수 포엽 독성평가

본 시험에서는 자색옥수수 포엽 한시적 식품원료 신청 및 독성평가를 위한 CRO와 GLP기관을 선정하였고 식품의약품안전평가원의 상담을 통하여 신청대상 시료의 형태를 포엽 주정 추출분말로 확정하였다. 포엽 전체 분말시료로 등록 시 독성시험에서 설치류 경구투여가 곤란하기 때문에 정확한 섭취 용량평가가 이루어 질 수 없다는 의견을 반영하였다. 독성시험 수행기관은 (주)켄온과 (주)크로엔이었으며 각각의 기관에서 유전독성시험과 설치류 대상 독성시험을 수행하였다. 포엽 추출물의 안전성 확보를 위한 유전독성시험은 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험, 포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험, 포유류 배양세포(Chinese Hamster Lung cell)를 이용한 체외 염색체 이상 시험이었다. 설치류 대상 독성시험은 설치류 단회(급성경구독성) 및 4주 반복 DRF 용량 결정 시험, 설치류 90일(13주) 반복투여 독성시험 및 28일 회복시험이었다. 조제물 분석을 통하여 LC-MS/MS에서 지표성분 C3G 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험을 수행하였으며 시스템적합성(System suitability), 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 일내재현성(Intra-day)을 확인하였다. QC(Quality Control)를 통하여 표준용액 중 2 µg/mL의 농도를 품질관리 시료(포엽 추출물)로 사용하여 표준용액 내 품질관리시료의 실제 측정값과 공칭농도 값을 비교하여 정밀성과 정확성을 측정하였다.

#### (시험 4) 자색옥수수 포엽의 한시적 식품원재료 신청

본 시험에서는 자색옥수수 포엽 한시적 식품원료 신청을 위한 사용대상식품 유형을 설정하고 독성시험의 NOAEL 값을 기준으로 허가식품유형별 섭취량을 산출하였다. 사용대상식품은 고품차, 캔디류, 기타주류, 캔디류이고 추물물의 사용용도(사용대상식품) 및 사용량 제안, 해당 원료의 연령별 평균 섭취량, 고 소비군의 극단 섭취량 등을 계산하여 사용대상식품 허가용량을 산출하였다. 사용대상식품은 「식품의 기준 및 규격(식약처 고시)」에 명시되어있는 유형을 참고하여 고상품제조 업체 및 농가의 수요를 반영하여 설정하였다.

한시적식품원료 신청 자료 확보를 위한 포엽 추출물의 원료 특성에 관한 분석을 수행하였다. 한국기능식품연구원 등 공인인증 분석기관에서의 한시적 식품원료 신청용 분석 결과 데이터와 3 batch 생산한 포엽 추출물의 시험성적서를 확보하였다. 분석항목은 일반성분, 비타민, 아미노산 등 미량 영양성분, 대장균, 잔류농약 등이었으며 모든 분석은 식품공전법에 준하여 수행되었다(표 1 참조). 또한, 지표성분 C3G에 대한 분석 및 기시법을 확립하였다.

표 1. 공인시험인증기관 성분 분석 목록

	분석목록	성분
1	영양성분	탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 열량, 나트륨
2	구성아미노산	티로신 등 18종 동시분석, 시스테인, 트립토판
3	지방산	로르산(C12:0) 등 10종(불포화 및 포화지방산)
4	비타민	비타민 A 등 9종
5	무기질함량	칼슘, 인, 마그네슘
6	대장균	일반세균, 대장균군(n=5), 대장균
7	중금속	납, 카드뮴, 총비소, 총수은
8	잔류농약	수입식품검사지침 제 8조에 의거, 다이아지논 등 65종
9	곰팡이독소	총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합) 푸모니신, 오크라톡신A, 데옥시니발레놀, 제랄레논

한시적식품원료 신청에 필요한 자료작성을 위하여 제조방법에 관한 자료를 작성하였다. 자색옥수수 재배에 소요되는 복합비료 및 추비(요소) 등에 관한 자료가 포함된 단계별 재배 방법 공정도와 추출물 제조방법의 단계별 공정도를 작성하였다. 원재료가 식물 대상일 경우 알칼로이드 성분 함유 여부에 관한 자료 제출이 필요하다. 대한약전을 참고하여 TLC법 및 침전법을 사용하여 알칼로이드 존재 여부를 확인하였다.

신청자료 작성 완료 후 2022.12.28. 한시적 규격 인정 제도 신청을 완료하였으며 1~4차 보완에 따른 대응 자료 제출을 완료하였다. 신청 대상 포엽 주정 추출분말의 섭취량 평가에 대한 최종 보완 후 2024년 상반기 등재가 될 것으로 예상된다.

### (시험 5) 자색옥수수 포엽의 식품소재화 및 적성탐색

본 연구에서는 포엽 추출물의 식품소재화 적성탐색을 위하여 추출물의 열안정성 및 사용대상 식품 유형별 가공적성 시험을 수행하였다. 포엽 30% 주정 추출물과 블루베리, 흑미 추출물을 대상으로 가열처리 시간에 따른 색도 변화(색차, brown index 측정)를 측정하였다. 사용대상 식품 유형 중 주류에 대하여 주정 도수별 상온 저장기간별, 구연산 첨가 여부에 따른 색도 및 총 안토시아닌 변화를 측정하였다. 또한, 떡류 제조를 위한 찹쌀 및 멥쌀에 추출물 적용에 따른 색소 발현 정도를 비교하였다.

## 3 결과 및 고찰

### <자색옥수수 포엽 활용 식품소재화 및 적성 탐색>

#### (시험 1) 자색옥수수 포엽 수확후 관리

본 연구에서는 2020년 흥천 옥수수연구소에 재배된 색소 1호와 색소 5호 품종을 수확 후 즉시 포엽을 분리하면 생체 이삭에서 색소 손실우려가 있어 수확된 이삭을 바로 냉풍제습기에 넣은 다음 1일 경과 후 포엽을 분리하고 다시 완전 건조하여 품질관리 시료로 사용하였다. 온도별 건조율은 30℃ 21%, 50℃ 22%이었고 건조 4일~5일째 완전 건조되었다. 30℃에서 건조한 시료는 저장 중 곰팡이 발생이 발생되서 시료로 사용할 수 없었으며 상온 건조는 시료 수확 시기 고온다습한 기후 때문에 건조가 되기 전 시료 품질이 저하되어 사용할 수 없었다.

건조 후 분쇄 시료의 수분 측정 및 일반성분 분석을 수행하였다. 건조온도에 따라 분쇄 시료 균질 정도 및 수분함량 상이하였으며 건조 온도에 따른 포엽 일반성분 함량의 큰 차이는 없었다. 시료 균질화를 위하여 온도별 포엽 건조시료를 분쇄(2회) 후 직경 2mm 크기의 체에 걸러 분석시료로 사용하였다.



그림 1. 색소 1호 및 색교 30 품종(수확 후)



그림 2. 30°C 건조 후 저장 중

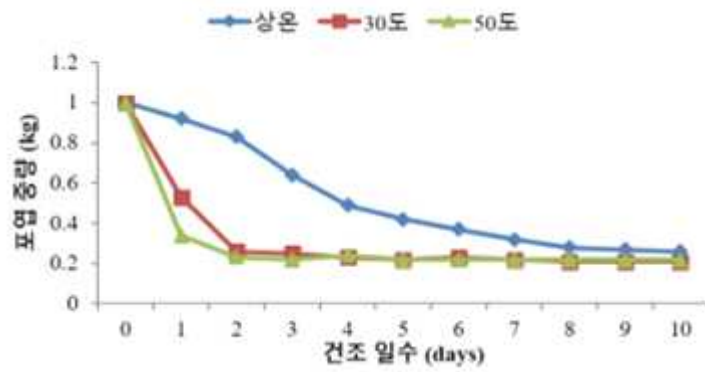


그림 3. 포엽 온도별 건조시간 비교



그림 4. 건조온도별 분쇄 시료 (좌)30°C, (우)50°C

표 1. 건조온도별 포엽 건조 분말 시료의 수분 함량(%)

건조온도	색소 1호		색소 5호	
	%			
30℃	7.16 ± 0.08		7.14 ± 0.07	
50℃	6.44 ± 0.05		6.61 ± 0.12	

표 2. 건조온도별 포엽 건조 시료의 일반성분

품종 및 건조온도	조단백질	조지방	조회분	조섬유	탄수화물
색소 1호 30℃	4.66±0.03	0.25±0.02	4.11±0.03	23.81±0.47	83.84±0.09
1호 50℃	4.82±0.03	0.29±0.03	4.14±0.04	22.38±0.06	84.31±0.04
색소 5호 30℃	4.57±0.07	0.34±0.04	3.85±0.01	23.36±0.06	84.10±0.05
5호 50℃	4.56±0.12	0.32±0.02	3.86±0.02	23.59±0.21	84.64±0.13

건조온도에 따른 포엽 건체의 안토시아닌 함량을 비교하였다. 색소 1호 포엽 30℃ 건조시료의 총안토시아닌 함량이 가장 높았는데 C3G의 함량은 30℃보다 50℃ 건조시료가 더 높게 측정되었다. 동일한 건조 온도 50℃에서 색소 1호와 색소 5호의 총안토시아닌 및 C3G 함량의 큰 차이는 보이지 않았다. 30℃에서 건조한 시료의 실제 수분함량이 더 높았고 저장 안정성도 떨어지므로(그림 2. 참고) 자색옥수수 포엽의 건조온도는 50℃가 적합하다고 판단되며 고온다습 환경조건에서 수확 후 50℃에서 즉시 건조 필요하다.

표 3. 건조온도별 포엽 건조 시료의 총안토시아닌 및 C3G 함량

분석항목	색소1호		색소 5호	
	30℃	50℃	30℃	50℃
총안토시아닌	6.15±0.22	4.39±0.06	5.65±0.17	4.37±0.06
C3G	0.36±0.01	<b>0.44±0.01</b>	0.47±0.02	0.46±0.01

포엽 생체 보관온도에 따른 안토시아닌 함량을 분석하였다. 수확 후 이삭에서 분리된 포엽을 즉시 냉풍제습 건조한 시료와 냉장(4℃), 냉동(-20℃) 보관하여 건조한 시료의 품질을 비교하였다. 수확한 포엽 시료를 냉장과 냉동고에서 4주간 저장, 포엽을 분리하지 않고 냉장 및 냉동 저장하고 냉풍제습 건조 후 분석용 시료로 사용하였다. 수확 후 즉시 건조한 시료보다 냉장 및 냉동 보관 후 건조한 시료의 색소함량이 저하되는 것을 확인하였으며, 냉장 및 냉동 보관에 상관없이 포엽을 분리하지 않고 저장한 시료의 색소 함량이 더 높은 것으로 확인되었다. 수확 후 즉

시 냉풍제습 건조하는 것이 포엽의 안정적인 색소 함량 유지와 원재료의 품질관리에 적합하며 수확한 포엽 시료를 즉시 건조할 수 없는 경우, 냉동보다는 냉장 보관 후에 건조하는 것이 원재료 품질관리면에서 유리하다. 냉장과 냉동 보관 시 안토시아닌 함량이 저하되는 저장 시점과 저장 기간 중 곰팡이 발생 등 품질저하 요인에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

표 4. 자색옥수수(포엽 분리) 저장 온도에 따른 안토시아닌 함량 비교

구분	부위	총안토시아닌	
		%	
냉풍제습	포엽	6.62±0.34	0.48±0.03
냉장(4주)	포엽	3.06±0.05	0.37±0.01
냉동(4주)	포엽	2.44±0.18	0.30±0.01

표 5. 자색옥수수 포엽 분리 여부에 따른 안토시아닌 함량 비교

구분	부위	포엽 분리		포엽 미분리	
		총안토시아닌	C3G	총안토시아닌	C3G
		%		%	
냉장(4주)	포엽	3.06±0.05	0.37±0.01	3.32±0.11	0.41±0.01
냉동(4주)	포엽	2.44±0.18	0.30±0.01	3.01±0.38	0.38±0.02

포엽 완전 건조 후 보관 시료의 안토시아닌 함량을 분석하였다. 생산된 시료는 냉풍제습 건조기를 통하여 완전건조한 후 산업용 대용량 실리카겔(250g~500g)을 동봉한 후 밀봉하여 저장고에 보관하여 관리하였다. 2021년 생산된 포엽 시료의 건조 후 보관기간에 따른 색소함량 변화 측정하였으며 약 1년 동안 4개월에 한 번씩 같은 시료를 대상으로 측정하였을 때, 건조 포엽에서의 색소 함량의 큰 차이는 나타나지 않았다.

표 6. 자색옥수수 포엽 건조시료 저장기간에 따른 안토시아닌 함량

시료 생산	분석일자	총안토시아닌	
		%	
2021년	2021. 11. 17.	5.53±0.01	0.56±0.03
	2022. 03. 19.	5.83±0.16	0.57±0.01
	2022. 07. 15.	5.72±0.18	0.47±0.04
	2022. 11. 18.	4.78±0.65	0.51±0.04

포엽 전체 및 추출물의 안토시아닌 함량을 측정하였다. 분무건조 추출물은 주정 30%, 덱스트린 20% 첨가하여 제조하였으며 전체와 추출물의 안토시아닌 함량 분석으로 원재료의 품질지표

설정하였다. 연도별 분무건조 추출물의 지표성분 C3G 함량은 1.64%~2.07%이었으며 포엽 추출물의 지표성분 C3G 기준값인 1.66%~2.49% 범위 내로 확인되었다.

표 7. 포엽 전체 및 분무건조 추출물의 안토시아닌 비교

구 분		건체		분무건조		추출수율(%)
		총안토시아닌	C3G	총안토시아닌	C3G	
		%		%		
색소 1호	'21 생산	5.53±0.01	0.56±0.03	16.43±0.16	1.64±0.06	26.00
색소 5호		4.90±0.19	0.42±0.01	12.18±0.18	1.94±0.05	24.00
색소 5호	'22 생산	6.14±0.21	0.53±0.02	16.10±0.23	2.07±0.03	24.80

포엽 추출물의 품질관리를 위하여 곰팡이 독소 및 잔류농약, 중금속 등 유해물질 분석을 하였다. 한시적 식품원료 신청 대상 추출물에서 유해물질은 모두 불검출되었다. 분석항목은 곰팡이 독소: 총아플라톡신, 오크라톡신, 제랄레논, 푸모니신, 데옥시니발레놀, 잔류농약: DDT 등 65종, 중금속: 납, 카드뮴, 수은, 비소 등이었고 추출물을 제조한 원시료도 동시 분석하여 유해물질에 대한 품질관리가 필요하다고 판단된다.

표 8. 포엽 추출물의 곰팡이 독소 분석 및 옥수수의 곰팡이 독소 기준 함량 비교

항목		포엽 추출물	식품공전 참고	
			기준 함량	대상식품
총아플라톡신	µg/kg	불검출	15이하	식물성원료
오크라톡신		불검출	5이하	곡류
제랄레논		불검출	100이하	곡류
푸모니신	mg/kg	불검출	4이하	옥수수
데옥시니발레놀		불검출	2이하	옥수수

### (시험 2) 자색옥수수 포엽의 대량 추출방법 확립

색소 1호 포엽의 에탄올 비율별 추출 및 생리활성 검정을 수행하였다. 포엽 건조시료에 에탄올 비율을 달리하여 추출 후 동결건조하였으며, 100% 에탄올로 추출 시 추출효율이 가장 낮았다. 20~60% 에탄올 추출물 사이의 추출 수율에 큰 차이가 없었으므로 주정(에탄올) 비용과 식품활용을 고려하였을 때 대량 추출 시 주정의 비율은 20%~30% 적합하다. 용매별 추출물의 lipase, α-glucosidase 및 α-amylase 저해활성 결과, 주정 비율이 높아질수록 활성이 점차 증가하였으며 100% 물과 에탄올 추출물의 경우 활성이 떨어지는 경향을 보였다.

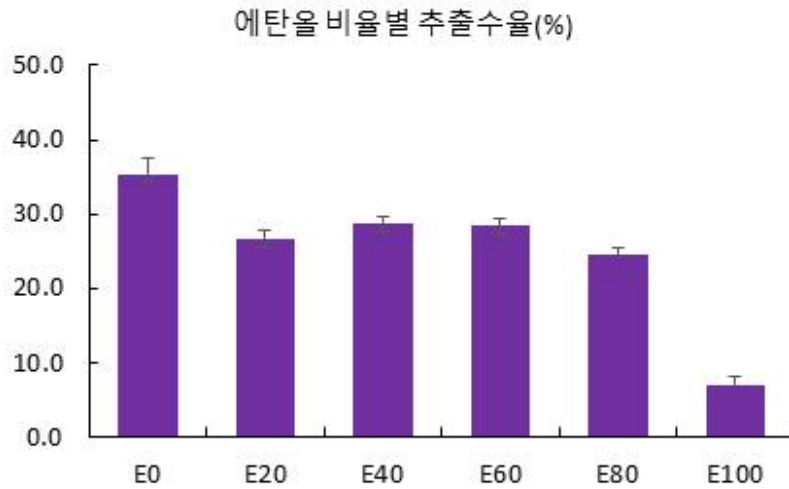
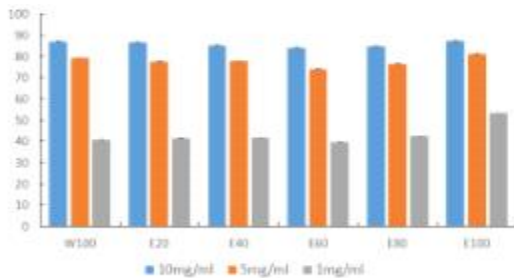


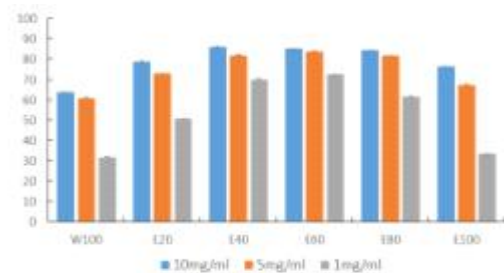
그림 1. 포엽 건체의 에탄올 비율별 추출물의 수율

표 1. 자색옥수수 포엽 에탄올 비율별 추출물 pancreatic lipase 저해활성

Samples (mg/mL)	Pancreatic lipase inhibition (%)			
	1	5	10	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup>
W100	18.59 ± 0.76	36.62 ± 2.89	65.39 ± 2.91	7.2
E20	12.32 ± 2.38	34.91 ± 1.56	67.76 ± 1.76	7.2
E40	15.98 ± 3.32	48.19 ± 1.64	82.13 ± 3.58	5.5
E60	16.67 ± 3.26	48.01 ± 1.13	80.98 ± 1.43	5.5
E80	16.78 ± 1.66	49.68 ± 1.15	80.90 ± 0.27	5.5
E100	2.85 ± 1.54	23.38 ± 1.87	84.38 ± 3.24	6.8



【α-amylase 저해활성(%)】



【α-glucosidase 저해활성(%)】

그림 2. 용매별 추출물의 소화효소 저해 활성 검증

포엽의 최적 추출물 생산을 위한 분무건조 추출물 제조 테스트를 수행하였다. 대량 추출 시 주정과 부형제는 경제성 고려 대상 항목이다. 원재료의 분무건조 추출물 제조 시 고형분 함량과 안토시아닌 함량 측정 후 부형제의 비율에 따라 최종 분무건조 추출물의 지표성분 함량을 조절할 수 있다. 주정 비율 및 부형제 비율을 달리한 추출물의 안토시아닌 함량 및 리파아제 저해활성 검정을 통하여 최종 추출 비율을 선정하였다. 30% 주정-20% 부형제 첨가 추출물이 지표 성분인 C3G의 함량이 2.17%로 가장 높았으며 추출 수율은 24.9%이었다. 항비만 활성 검정용 시료 사용을 위하여 추출물별 리파아제 저해활성 실험 결과, 20% 주정-30% 부형제 추출물의 활성이 가장 낮았으며 30% 주정 추출물에 부형제 20%, 30%를 첨가한 추출물의 리파아제 저해활성은 비슷한 수준이었다. 최종 추출물 제조 조건은 30% 주정 추출 후 부형제 20%~30% 첨가로 설정하였다.

표 2. 분무건조 추출물별 수율 및 안토시아닌 함량






시료 목록	주정	부형제	총안토시아닌		
			C3G	추출수율	%
PCH20-20	20	20	19.88±0.11	2.07±0.04	21.7
PCH20-30		30	6.72±0.21	1.62±0.01	25.6
PCH30-20	30	20	15.75±0.15	2.17±0.05	24.9
PCH30-30		30	20.29±0.27	2.01±0.05	27.4

표 3. 분무건조 추출물별 리파아제 저해활성

시료목록	주정	부형제	리파아제 저해활성
			IC <sub>50</sub>
PCH20-20	20	20	4.30
PCH20-30		30	9.13
PCH30-20	30	20	4.43
PCH30-30		30	4.37

포엽의 대용량 30% 주정 추출물 제조공정을 확립하였다. 대용량 추출조건을 확립하고 공정에 따라 추출물의 제조 후 한시적식품원료 신청을 위한 분석 및 독성시험 수행 시료로 사용하였다. 포엽 건조 시료 200kg에 대한 최종 추출물의 수율은 27.5%이었고 부형제는 고형분 45kg에 대한 20%를 첨가하였다. 생산된 추출물의 C3G 함량은 1.96%이었다.

표 4. 포엽 추출물 대용량 제조 공정도

공정	작업내용 및 조건	수율
원료	 <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 자색옥수수(Zea mays) 건조 포엽</li> <li>- 기원: 국내산</li> <li>- 수분함량: 10% 이하</li> </ul>	원물 건조 수율 - 20~25%
추출 및 여과	 <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 1회 추출</li> <li>- 30% 주정 15~20배, 상온, 12h~16h</li> <li>- 200kg/4,100L</li> <li>◦ 여과(하우징여과기, 10um)</li> </ul>	3,700L
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 2회 추출</li> <li>- 30% 주정(3,700L) 추가, 상온 4h~8h</li> <li>◦ 여과(하우징여과기, 10um)</li> </ul>	3,700L
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 1회+2회 추출액 혼합</li> </ul>	7,400L
농축	 <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 감압농축(상온, -600mmHg, 6시간)</li> <li>- 1회+2회 추출액</li> </ul>	약 300L (약 25배 농축)
배합 및 건조	 <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 부형제 배합</li> <li>- Maltodextrin 및 dextrin, 20~30%</li> <li>- 농축물의 고형분 대비 덱스트린 첨가</li> <li>- 고형분 15%</li> </ul>	300L+13.5kg (농축액+덱스트린)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 분무건조</li> <li>- in 160℃, out 90℃</li> </ul>	추출물 55kg
포장	 <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 폴리에틸렌 비닐 포장</li> <li>◦ 품질검사 후 포장</li> </ul>	27.5%

### (시험 3) 자색옥수수 포엽 독성평가

포엽 추출물의 안전성 평가를 위하여 유전독성시험을 수행하였다. 박테리아를 이용한 복귀돌연 변이시험에서 포엽 추출물에 의한 균주의 생육저해는 확인되지 않았다(대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용). 음성대조군 대비 포엽 추출물 처리군의 복귀돌연변이 콜로니수는 증가 양상을 나타내지 않았으며 시험물질인 포엽 추출물은 본 시험조건에서 변이원성을 보유하지 않은 것으로 판단된다. 포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험에서 추출물 투여군에서 음성 대조군 대비 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가는 확인되지 않았다(음성 판정). 포유류 배양세포 (Chinese Hamster Lung cell)를 이용한 체외 염색체이상 시험에서 염색체이상 계수 결과, 포엽 추출물 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상 세포의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다(음성 판정).

설치류 대상 독성시험에서 설치류 단회 투여(급성경구독성)의 1단계 용량 300 mg/kg, 최고 2,000 mg/kg 시험물질에 관한 독성 정보가 없으므로 1단계 용량은 300 mg/kg으로 설정하였으며 용량별 투여 단계에서 일반 증상 및 체중 변화 관찰되지 않았고 사망 개체 없었다. 개략의 치사농도는 2,000 mg/kg으로 추정되며 건강기능성 식품 계열의 시험물질은 5,000mg/kg을 최대 용량으로 설정 가능하므로 용량결정시험 시 최대 5,000 mg/kg까지 투여하였다. 시험물질에 의한 독성반응 없었으므로 GHS 분류는 'Category 5 or Unclassified'(최고안전 등급)로 분류되었다.

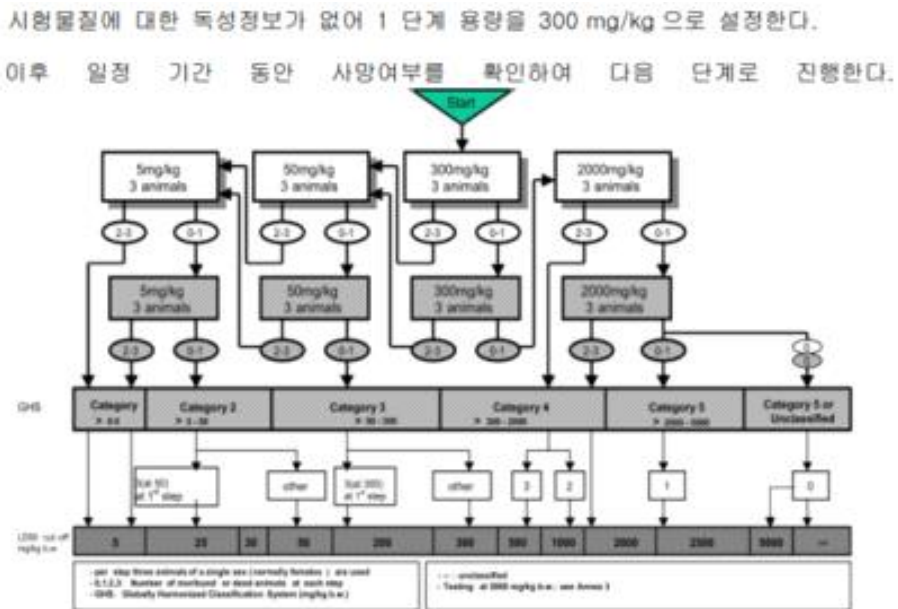


그림 1. 설치류 단회 투여 용량 설정 단계(GLP기준)

설치류 4주 반복 용량 결정(DRF) 시험에서 체중 측정, 사료 및 음수 소비량 측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 부검 시 육안검사 결과, 시험물질에 의한 이상변화는 관찰되지 않았다. 섭취량 설정을 위한 해당 시험 용량에 따라 13주 반복 투여 용량이 결정되고 군 구성은 시험물질 자색옥수수 포엽 추출물을 5,000 mg/kg 투여하는 고용량군, 그 아래로 공비 2를 적용하여 2,500 mg/kg 투여하는 중용량군, 1,250 mg/kg 투여하는 저용량군으로 설정하였으며 시험물질과의 비교를 위해 부형제를 투여하는 대조군을 설정하였다. 투여 기간 중 5,000mg/kg까지 독성으로 인한 사망 개체 없었다. 이 실험 결과를 바탕으로 13주 반복 독성시험에서 시험물질에 의한 독성변화 및 무독성량(NOEL; No Observed Adverse Effect Level)을 확인하기 위해 5,000 mg/kg 이하를 고용량군으로 설정하는 것이 적절하다.

표 1. 용량결정 시험 시험물질 투여량

군	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수(동물번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군 <sup>a)</sup>	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2 저용량군	1,250	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)
G3 중용량군	2,500	10	5(1301~1305)	5(2301~2305)
G4 고용량군	5,000	10	5(1401~1405)	5(2401~2405)

<sup>a)</sup>부형제 투여군

설치류 90일(13주) 반복투여 독성시험 및 28일 회복시험에서 랫드 대상 90일 간 반복 경구 투여 시 시험 물질의 전신 노출에 의한 표적 장기 및 무독성량(NOEL; No Observed Adverse Effect Level) 등의 독성을 조사하고, 28 일간 회복기간을 두어 회복성을 확인하였다. 4주 용량 결정 시험 결과에 따라 시험군은 저용량군 1,250 mg/kg, 중용량군 2,500 mg/kg, 고용량군 5,000 mg/kg, 대조군으로 부형제인 멸균주사용수 투여로 설정하여 시험을 진행하였다. 사용 동물 수는 각 투여군별로 주요군은 암수 각 10마리씩, 회복군은 암수 대조군과 고용량군으로 각 5 마리씩 포엽 추출물에 의한 검사 항목별 독성학적 변화 및 특이사항이 관찰되지 않았다. 무독성량(NOEL, No Observed Adverse Effect Level)은 설치류 암수 모두 고용량군인 5,000mg/kg로 판정되었다.

※ 독성학적 검사 항목: 상서관찰, 체중 측정, 사료 소비량측정, 음수 소비량 측정, 기능검사, 안과학적 검사, 뇨검사, 호르몬 검사, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사 및 정자 검사, 성주기 검사, 장기중량 측정, 부검, 조직병리학적 검사

조제물 분석을 통한 지표성분 밸리데이션에서 시스템적합성(System suitability)은 정밀성 5% 이내로 적합하였다. 분석물질의 retention time과 동일한 위치에서 간섭피크의 유무로 확인되는 특이성(Specificity) 분석 결과, 동일한 retention time 간섭 peak 확인되지 않았다. 지표성분 밸리데이션에 사용된 분석법은 표 2와 같다.

표 2. 지표성분 분석 기기조건

Classification	Conditions
Instrument	Agilent 1290 Infinity II, 6470 Triple Quad LC/MS
Column	Polaris 5 C18-A, 50 × 2.0 mm (Serial No. 608233)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	(A) 0.1 % formic acid in water (B) 0.1 % formic acid in methanol (A) : (B) = 60 : 40(v/v)
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	1 µL
Autosampler temperature	10 °C
Mode	ESI Positive, MRM mode
m/z	449.2 → 287.1
Fragment Voltage/ Collision energy	135 / 25

지표성분인 C3G 표준품의 일내재현성(Intra-day) 분석결과, 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85 ~ 115 % 범위로 확인되어 판정기준에 적합하였다. 정밀성(Precision)은 측정 농도값의 표준편차를 평균값으로 나누어 산출하였고, 정확성(Accuracy)은 실제 분석된 농도측정치를 공칭 농도로 나누어 백분율로 산출하였다. 또한, C3G 표준품 분석 후 정량곡선 작성 결과, R<sup>2</sup>값은 0.9997로 우수한 직선성(Linearity)을 나타내었다.

표 3. 시스템적합성

Batch No.	Classification	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	Mean	Precision (%)
1	Peak area	50082	50052	50110	48521	47187	49190	2.66
	RT (min)	0.938	0.938	0.938	0.935	0.935	0.937	0.21
2	Peak area	45938	45000	45321	44403	44412	45015	1.44
	RT (min)	0.931	0.925	0.925	0.925	0.921	0.925	0.43
3	Peak area	50567	49600	49737	49785	48758	49689	1.30
	RT (min)	0.911	0.911	0.911	0.911	0.911	0.911	0.00

RT : Retention Time

$$\text{Precision}(\%) = \text{Standard Deviation(S.D.)} / \text{Mean} \times 100$$

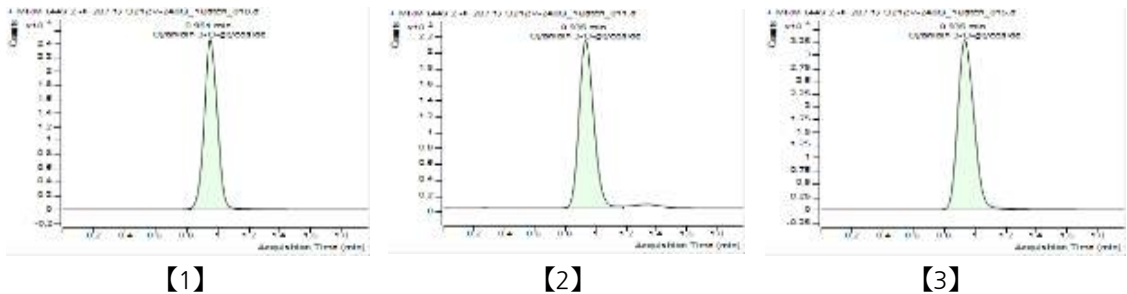


그림 2. 분석물질의 peak 크로마토그램

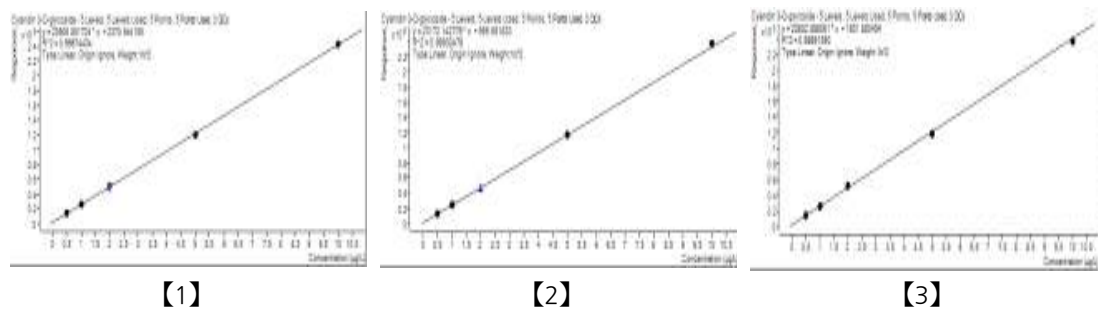


그림 3. 지표성분의 농도별 정량곡선(3반복 분석)

표 4. 표준물질 C3G의 직선성

Batch No.	Nominal concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)
1	0.5	0.498	101.14
	1	1.003	97.52
	2	2.031	100.79
	5	4.912	100.93
	10	10.026	99.62
	$y = 23906.8517 x + 2370.5442, R^2 = 0.9997, \text{Weighting: } 1/x^2$		
2	0.5	0.501	100.26
	1	1.009	100.89
	2	1.935	96.74
	5	5.002	100.04
	10	10.207	102.07
	$y = 23172.1428 x + 959.5518, R^2 = 0.9993, \text{Weighting: } 1/x^2$		
3	0.5	0.494	98.74
	1	1.012	101.23
	2	2.076	103.78
	5	4.887	97.75
	10	9.850	98.50
	$y = 23802.5881 x + 1931.8805, R^2 = 0.9989, \text{Weighting: } 1/x^2$		

표 5. 표준물질 C3G 농도별 정밀성 및 정확성

Nominal concentration (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No. 2	No. 3			
10	11.229	11.253	11.553	11.345	1.60	113.45
500	532.037	495.627	495.820	507.828	4.13	101.57

Precision(%) = Standard Deviation(S.D.)/Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of measured concentration/Nominal concentration × 100

QC(Quality Control): 표준용액 중 2µg/mL의 농도를 품질관리 시료로 사용하여 표준용액 내 품질 관리시료의 실제 측정값과 공칭농도 값을 비교하여 정밀성과 정확성을 측정한 결과, 정밀성 (Precision) 0.51~1.19%로 10% 이하 판정기준 적합하였고 정확성(Accuracy)은 97.73~106.55%로 85 ~ 115% 이내 범위 판정기준에 적합하였다.

표 6. 표준용액 내 품질관리 시료의 정밀성과 정확성

Batch No.	Nominal concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)			Mean (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
		No.1	No. 2	No. 3			
1	2	1.944	1.956	1.964	1.955	0.51	97.73
2	2	2.152	2.125	2.116	2.131	0.89	106.55
3	2	2.102	2.117	2.069	2.096	1.19	104.80

Precision(%) = Standard Deviation(S.D.)/Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of measured concentration/Nominal concentration × 100

#### (시험 4) 자색옥수수 포엽의 한시적 식품원재료 신청

한시적 식품원료 신청을 위하여 국민건강영양조사표를 참고하여 섭취량 평가를 하였다. 독성시험을 통한 신청원료 옥수수 포엽 추출물의 최대무독성량(NOEL, No Observed Adverse Effect Level) 값을 확인하고 일일섭취허용량(ADI, Acceptable Daily Intake) 값을 산출하였다. 옥수수 포엽 추출물의 NOEL 값이 5.0g/kg·bw/day이며, ADI 값은 NOEL 값을 안전계수 100으로 나눈 0.05g/kg·bw/day이다. 안전계수는 동물실험에 의한 독성시험의 결과 얻어진 NOEL 값을 인간에게 적용하여 안전허용량을 구하는 경우 사용되는 것으로 동물 종 사이의 감수성의 차이를 10, 인간에 있어서의 감수성의 차이를 10으로 한다. ADI 산출식은 다음과 같다.

$$ADI = \frac{NOEL}{\text{안전계수}} = \frac{5.0g/kgbw/day}{10(\text{종간차이}) \times 10(\text{개체차이})}$$

\* 일일섭취허용량(ADI) = 최대무독성량(NOEL) / 불확정계수 100

\*\* 불확정계수 100 = 동물종간 감수성 차이 10 x 사람간 감수성 차이 10

표 1. 일일섭취허용량(Acceptable Daily Intake, ADI) 및 상한섭취량

최대무독성량(NOEL)	일일섭취허용량(ADI)	상한섭취량
5,000 (mg/kg·bw/day)	50 (mg/kg·bw/day)	ADI x 평균체중(연령별·성별)

신청원료의 사용대상식품 및 사용량 고형차, 캔디류, 기타주류, 떡류이고 식품유형은 개발 관련 업체와 농가의 수요를 반영하였으며 기타주류의 경우 기존에 승인받은 포엽 및 속대 혼합추출물의 탁주 사용에 제한점 등을 보완하기 위하여 항목을 설정하였다.

표 2. 신청원료의 사용예정식품 및 사용량

식품유형	사용량(g)
고형차	0.5
캔디류	0.5
기타주류	0.5
떡류	0.5

포엽 추출물의 원료 특성에 관한 분석을 수행하고 공인시험분석기관에서 시험성적서를 확보하였다. 배치별(3배치) 추출물의 대장균군(정량, n=5) 및 세균수(정량, n=5)는 모두 불검출이었으며 정밀검사 대상 잔류농약 항목(69종) 모두 불검출이었다. 납, 카드뮴, 비소, 수은 및 총아플라톡신 등 곰팡이 독소 모두 불검출이었다. 일반성분 및 무기질, 비타민 및 아미노산 등 미량 영양소 등 분석 결과는 시험분석 결과는 항목별 표로 정리하였다.

표 3. 포엽 추출물의 일반성분

시험항목	포엽 추출물(%)				
	PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
탄수화물	86.48	86.69	86.80	86.66	0.16
조지방	3.45	3.46	3.48	3.46	0.02
조단백질	1.43	1.56	1.63	1.54	0.10
수분	4.97	4.68	4.48	4.71	0.25
조회분	3.67	3.61	3.61	3.63	0.03
식이섬유	1.71	1.64	1.67	1.67	0.04

표 4. 포엽 추출물의 무기질 함량

	포엽 추출물(mg/100g)				
	PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
인	261.3	249.5	251.7	254.17	6.27
마그네슘	190.5	195.1	194.5	193.37	2.50
칼슘	117.3	121.9	119.6	119.60	2.30

표 5. 포엽 추출물의 비타민류 함량

항목	단위	포엽 추출물				
		PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
비타민A (레티놀)	μgRE/100g	N.D				
비타민 B1		0.16	0.16	0.16	0.16	0.00
비타민 B2		0.46	0.46	0.45	0.46	0.01
비타민 B6(피리독신)	mg/100g	0.08	0.06	0.08	0.07	0.01
비타민 C		N.D				
비타민 E		0.31	0.34	0.32	0.32	0.02
비타민 B12		N.D				
비타민 D	μg/100g	N.D				
비타민 K1		N.D				

표 6. 포엽 추출물의 지방산 함량

NO.	항목	포엽 추출물(g/100g)				
		PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
1	Palmitic acid (C16:0)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00
2	Oleic acid (C18:1n9c)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
3	Linoleic acid (C18:2n6c)	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01
4	Linolenic acid (C18:3n3)	N.D				

표 7. 포엽 추출물의 구성아미노산 함량

NO.	항목	포엽추출물(mg/g)				
		PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
1	Glu	3.14	3.89	3.38	3.47	0.38
2	Asp	2.40	3.01	2.61	2.67	0.31
3	Ala	1.08	1.38	1.17	1.21	0.15
4	Lys	0.48	0.61	0.53	0.54	0.07
5	Val	0.45	0.54	0.48	0.49	0.05
6	Gly	0.37	0.48	0.41	0.42	0.06
7	Pro	N.D				
8	Leu	0.47	0.53	0.47	0.49	0.03
9	Ser	0.76	0.92	0.81	0.83	0.08
10	Arg	0.33	0.40	0.37	0.37	0.04
11	Thr	0.46	0.55	0.49	0.50	0.05
12	Tyr	0.23	0.27	0.23	0.24	0.02

13	Ile	0.28	0.32	0.29	0.30	0.02
14	Phe	0.15	0.13	0.13	0.14	0.01
15	His	0.28	0.35	0.30	0.31	0.04
16	Trp			N.D		
17	Cys	0.31	0.27	0.25	0.28	0.03
18	Met	0.19	0.24	0.20	0.21	0.03

표 8. 포엽 추출물의 유리아미노산 함량

NO.	항목	포엽 추출물(mg/g)				
		PCH001	PCH001-2	PCH001-3	Avg.	S.D
1	Glu	0.40	0.40	0.40	0.40	0.00
2	Asp	0.44	0.44	0.44	0.44	0.00
3	Ala	1.87	1.83	1.87	1.86	0.02
4	Lys	0.41	0.38	0.41	0.40	0.02
5	Val	0.36	0.35	0.36	0.36	0.01
6	Gly	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00
7	Pro	0.17	0.17	0.17	0.17	0.00
8	Leu	0.45	0.44	0.45	0.45	0.01
9	Ser	1.17	1.20	1.17	1.18	0.02
10	Arg	2.06	2.00	2.06	2.04	0.03
11	Thr	0.41	0.39	0.41	0.40	0.01
12	Tyr	0.52	0.51	0.52	0.52	0.01
13	Ile	0.28	0.27	0.28	0.28	0.01
14	Phe	0.18	0.17	0.18	0.18	0.01
15	His	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00
16	Trp	0.21	0.21	0.21	0.21	0.00
17	Cys			N.D		
18	Met			N.D		
19	GLN	0.67	0.66	0.67	0.67	0.01
20	ASN	3.5	3.43	3.50	3.48	0.04

신청원료의 3배치의 지표성분 분석 및 기시법을 확립하였다. 지표성분 함량 분석을 위한 분석 보고서를 작성하였으며 기시법에 따른 추출물의 지표성분 평균 함량은 2.071 g/100g이었다. 지표성분의 기준규격을 80 ~ 120%로 설정 시, 포엽 추출물의 C3G 기준값은 1.66%~2.49%로 확인되었다.

시험물질 : 자색옥수수(색소1호/5호) 포엽 추출물

시험항목 : 지표성분 cyanidin 3-O-glucoside 정량분석

## 1. 시험방법의 요약

본 시험법은 증류수 및 유기용매를 이용하여 시료로부터 충분히 성분을 추출하여 액체크로마토그래프/광다이오드어레이검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 525 nm에서 정량분석을 하였다.

## 2. 장비와 재료

### 2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(10 mL, 100 mL)

2.1.2 용매용 일회용 실린지

2.1.3 여과용 멤브레인 필터

2.1.4 액체크로마토그래프용 유리병

### 2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프(Nano space SI-2, Shiseido, Japan)

2.2.2 광다이오드어레이검출기(525 nm, Nano space 3185, PDA 85)

2.2.3 컬럼오븐

2.2.4 컬럼(150\*4.6 mm, 3  $\mu$ m, Unison UK-C18)

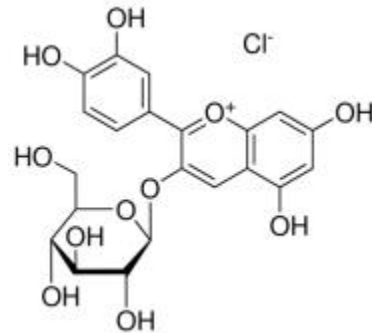
## 3. 표준물질 및 일반시약

### 3.1 표준물질 : cyanidin 3-O-glucoside chloride

분자식 : C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>11</sub>

분자량 : 484.84

CAS No. : 7084-24-4



### 3.2 일반시약

3.2.1 에탄올(Ethanol)

3.2.2 3차 증류수

3.2.3 구연산(Citric acid)

3.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

3.2.5 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid)

## 4. 시험과정

### 4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품 cyanidin 3-O-glucoside chloride 1 mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고, 0.1% 구연산을 함유하는 30% 에탄올로 완전히 녹인 다음 표선까지 채웠다.

## 4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 0.1 g을 정밀히 취하여 50 mL 부피 플라스크에 넣었다.

4.2.2 0.1% 구연산을 함유하는 30% 에탄올 완전히 녹인 다음 50 mL로 표선하였다.

4.2.3 멤브레인필터(0.45  $\mu$ m)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

## 5. 분석 및 계산방법

### 5.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항 목	조 건
기기	Nano space SI-2, Shiseido, Japan
검출기	525nm, Nano space 3185, PDA 85
컬럼	Unison UK-C18, 150*4.6mm, 3 $\mu$ m
컬럼오븐온도 (°C)	35 °C
주입량	5 $\mu$ L
유속	1 mL/분
이동상	A : 0.1% TFA in d-water
	B : ACN

표 2. 이동상 조건

Time (min)	B%	A%
Init	5	95
5	5	95
10	20	80
20	5	95

### 5.2 계산

cyanidin 3-O-glucoside 함량(mg/g)

$$= C \times a/S \times 0.917(\text{표준품 순도}) / 1,000$$

C : 시험용액 중 cyanidin 3-O-glucoside의 농도( $\mu$ g/ml)

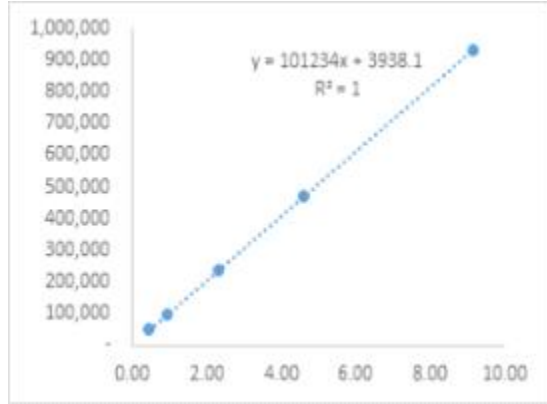
a : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

## 6. 시험·검사 결과

### 6.1 표준품 분석결과

ug/ml	area
0.46	46,118
0.92	96,705
2.29	237,082
4.59	470,787
9.17	930,756



## 6.2 포엽추출물 분석결과

(n=3)


분석 성분	PCH001, PCH001-2, PCH001-3	
	avg.	S.D
Cyanidin-3-glucoside	2.071 g/100g	0.033

제조방법에 관한 자료 중 복합비료 및 추비(요소)에 관한 설명자료를 작성하였다.

### <복합비료>

- 「비료 공정규격 설정 및 지정」 고시(제2019-38호), [별표 2. 보통비료의 공정규격설정, 4. 복합비료, 01. 제2종복합]”에 적합
  - ※ 제2종복합: <정의>제1항의 질소질비료, 제2항의 인산질비료, 제3항의 칼리질비료, 제4항의 제1종 복합비료 중 2종이상을 배합하여 제조한 것
- 국내토양 및 농촌진흥청 시비기준량에 맞는 질소, 인산, 칼리 함유한 복합비료 20kg  
[질소 21%(4.2kg), 인산 17%(3.4kg), 칼리 17%(3.4kg)]
- 옥수수 적정시비량: 40~50kg/10a




<추비(요소)>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 「비료 공정규격 설정 및 지정」 고시(제2019-38호), [별표 2. 보통비료의 공정규격설정, 1. 질소질비료, 02. 요소]”에 적합             <ul style="list-style-type: none"> <li>※ 요소: &lt;정의&gt;암모니아와 이산화탄소의 반응물질로 제조한 것</li> </ul> </li> <li>- 프릴 요소 질소 46%(질소 9.2kg)</li> <li>- 입자가 작은 프릴 타입으로 속성비료 용도로 적합</li> <li>- 중성비료, 연용 시 토양 산성화 및 잔류 우려 없음</li> <li>- 기비 또는 추비 다양한 작물에 사용 가능             <ul style="list-style-type: none"> <li>※ 비료 입자크기 프릴: 1~3mm, 그레놀: 2~4mm</li> </ul> </li> <li>- 옥수수 적정시비량: 17kg/10a</li> </ul>
---	--

재배방법 단계별 공정도를 작성하고 해당 자료는 한시적식품원료 신청 후 1차 보완 자료에 첨부하였다.

표 9. 자색옥수수 재배 공정도

재배과정		단계별 재배방법 및 사진	
재배지 준비	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 생산 재배지 선정</li> <li>- 토양 경운(트렉터 밭 갈기)</li> </ul>		
토양 관리			<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 파종 1주일 전 살포             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가축분 퇴비와 비료(슈퍼21 제2종 복합비료)</li> <li>- 토양 살충제(후라단)</li> </ul> </li> <li>◦ 사용된 가축분 퇴비 및 복합비료는 '비료 공정 규격 설정 및 지정'에 적합</li> <li>◦ 후라단은 '농약 등의 안전사용기준'에 적합</li> </ul>
파종			<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 옥수수 파종: 4월 하순~5월 중순             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약5,500주~6,500주/10a(300평)</li> <li>- 이랑 간격 70cm, 포기사이 20cm</li> <li>- 1립씩 깊이 3cm로 파종</li> <li>- 발아: 파종 후 2~3주</li> </ul> </li> <li>◦ 초기 제초제(랏쏘) 파종 후 바로 살포(농약사용지침 준수)</li> </ul>

재배 및 수확		<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 발아: 파종 후 2~3주</li> <li>◦ 추비 살포: 6~7엽기(6월 상순), 요소 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농촌진흥청 옥수수 표준 재배법 준수</li> </ul> </li> <li>◦ 잡초방제: 중기 제초제(바스타) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농약사용지침 준수</li> </ul> </li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 8월 초 생육 현황 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 필요시 웅수 제거 작업: 꽃가루 날리기 전(7월초~중순)</li> </ul> </li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 수확: 8월 중순에 포엽과 속대 동시수확 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수염 출현 후 20~30일 경</li> <li>- 8월 초 포엽의 색소 집적상태 확인 후 수확일자 결정</li> </ul> </li> </ul>

포엽추출물의 알칼로이드 함유 여부를 판정하기 위하여 TLC법을 참고하여 시험을 수행하였다. 음성 및 양성대조군과 분획물 3종을 TLC에 시료를 점적하고 클로로폼 : 메탄올 : 아세트산 : 증류수 = 25 : 15 : 4 : 2(v/v)의 전개용매로 전개시킨 후, 발색시약 dragendorff을 분사하고 건조 후 육안으로 확인하였을 때, 양성대조군은 주황색 spot(포스파티딜콜린) 및 시료가 전개된 부분(하이드록시퀴놀린)에 주황색 발색이 관찰되었으나, 그 외 처리군에서는 관찰되지 않았다. 따라서 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물과 건조분말시료 내 알칼로이드는 함유되어 있지 않는 것으로 판단된다.

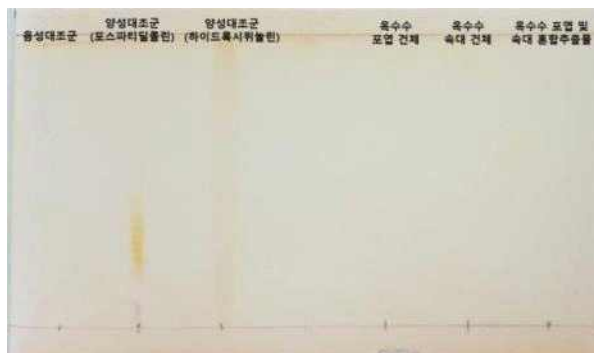


그림 1. 발색시약 처리 후 사진

식품원료의 한시적 기준 및 규격 인정 신청을 하기 위한 자료 작성 완료하여 허가식품유형 및 사용량(100g당) 고풍차 0.3, 캔디류 0.5, 기타주류 0.5, 떡류 0.5으로 2022.12.28. 신청서를 제출하였다. 신청서 접수 후 1~3차까지의 보완자료를 제출하였다.

식품원료의 한시적 기준 및 규격 인정 신청서				처리기간
				30일
제표자	강원도농업기술원 농작물연구소장			
업체명 (기관명)	강원도 농업기술원	영점의 종류	도내 및 소재명/ 식품유종	
		허가신청/영점 번호	221-03-00074	
신청인	영계(기관) 소재지	[주소] 강원도 홍천시 신덕로 300-2, 농작물연구소 (전화번호) 033-248-6520 (팩스) 033-248-6533		
	주소지			
수입 업체명				
소재지				
원료명(세출명)	옥수수 포엽 추출분말			
원산지(원재료 포함)	국내산(광물성, 옥수수 포함)			
사용용도 및 사용량	고형차(0.3g/100g), 캔디류(0.5g/100g), 기타주류(0.5g/100g), 떡류(0.5g/100g)			
<p>「식품등의 한시적 기준 및 규격 인정기준」 제33조에 따라 식품원료의 한시적 기준 및 규격 인정을 받고자 하오니 인정을 부탁드립니다.</p> <p style="text-align: center;">2022년 12월 28일</p> <p style="text-align: center;">강원도농업기술원 농작물연구소장 (인) 2022.12.28</p> <p>제품제작물안전처리용 귀하</p>				
※ 구비서류 등 1. 세출자료의 요약본 2. 세출자료(별표 1)에서 정한 자료 3. 세출 또는 시제품 4. 기타 필요한 자료(외국어자료는 원문과 한글 번역본)				수수료
				100,000원




그림 2. 식품원료의 한시적 기준 및 규격인정 신청서

- 한시적식품원료 신청 후 보완 사항 및 자료 제출
  - 1차 보완자료에 대한 대응 및 추가 작성 자료 제출(23.5.31.)

	1차 보완내용	대응	결과
1	기원 및 개발경위, 국내·외 인정, 사용현황등		
	○ 원료명의 명확화 (예 : 옥수수 포엽 주정 추출분말)	“옥수수포엽주정추출분말”로 수정	
	○ 신청원료(옥수수 포엽 추출분말) 혹은 원재료에 (옥수수 포엽)에 대한 추가적인 사용현황 자료	예전 자료 확인해서 추가할 수 있는 것. 작색 옥수수 포엽 감미료 사용 등 추가 조사 - 옥수수포엽은 식품(첨가물), 향신료 및 건강식품용도로 사용	
2	제조방법에 대한 자료		
	○ 복합비료(고PB 복합 비료) 및 추비(요소)에 관한 설명자료	제품사진, 제품명 등 자료 작성, 옥수수 사용 가능한 비료인지 확인함.	

○ 재배방법 및 제조방법의 단계별 구체적인 설명자료(사진, 공정조건, 주정 재 사용여부, 덱스트린 등 사용비율, 저장 방법, 수율 등)	1차 수정하고 신소재식품과와 협의 ==> 사진 자료 빠진 것 추가 ==> 최종 원료 보관조건 기재
○ 제조과정에 사용하는 주정, 덱스트린 등이 「식품의 기준 및 규격」에 적합함을 확인할 수 있는 자료(제품사진, 성적서 등)	제조공정에 사용된 원료의 품목(또는 수입)신고서 및 성적서 첨부: 추출물 제조 업체 의뢰하여 제출
○ 포장(폴리에틸렌)이 「기구 및 용기 포장의 기준 및 규격」에 적합성을 확인할 수 있는 자료(제품사진, 성적서 등)	원료의 품목(또는 수입)신고서 및 성적서 첨부: 추출물 제조 업체 의뢰하여 제출
3 원료 특성에 관한 자료	
○ 일반성분, 지방산, 아미노산, 무기질, 비타민의 추가 분석 결과	3배치 공인시험기관 성적서의 시험 결과 기재
○ 자색옥수수 포엽에서 추출된 안토시아닌 색소 10종에 대한 정보(종류 함량 등)	논문 & 자체 시험자료인지 확인 후 자료 첨부
○ 신청원료(옥수수 포엽 추출 분말)에 대한 알칼로이드 실험결과	포엽 단독 추출물로 실험 진행 - 양성대조군 포스파티딜콜린, 스코폴라민 사용하여 재실험함
○ 데옥시니발레놀 3batch 분석결과	추가실험진행 후 자료 제출함
4 안전성에 관한 자료	
○ 주요성분(cyanidin-3-glucoside)에 대한 안정성 정보(문헌고찰등)	자색옥수수포엽에서 추출된 안토시아닌색소 10종에 대한 정보, 종류 함량 등 기재된 논문 첨부
○ 신청원료에 대한 인체영양자료 및 추가적인 알레르기성 자료(문헌고찰등)	주성분이나 포엽 추가 검색
○ 90일 반복투여독성시험에서 관찰된 증상 및 변화에 대한 독성학적으로 유해한 변화가 아닌 것으로 판단한 과학적 근거 및 GLP기관 의견서	GLP 기관에서의 의견서 또는 소견서 첨부하였음.
○ 올바른 가충치를 활용한 섭취량 평가 * 국민건강조사 원시자료 이용지침서 참고	이용지침 참고하여 수정 후 제출함

- 2차 보완자료에 대한 대응 및 추가 작성 자료 제출(23.10.31.)

보완항목 및 내용	비고
1. 제조방법에 관한 자료	
<p>○ 제조과정: 1차 보완자료 제출 시 제조공정도에 표기된 '회수 주정' 내용 수정</p> <p>- 회수 주정은 추출액을 농축한 후 수집되는 주정을 의미한다. 1회 200kg, 2배치 이상 제조 시 주정 비용 절감을 위하여 대용량 공정에서 사용하는 방법이다. 해당 신청 원료 최초 추출 시 단 배치 생산으로 회수 주정 사용하지 않았고 각종 분석을 위해 생산된 3배치 추출물 제조시에도 회수주정은 사용되지 않았다. 하여, 당초 제조공정도의 회수 주정을 30% 주정으로 수정하였다.</p> <p>※ 제조공정도 수정: 2회 추출(회수 주정 첨가 → 30% 주정 추가)<sup>1</sup></p>	
<p>○ 위생관리: 옥수수 포엽의 위생관리에 대한 설명 자료</p> <p>&lt;자색옥수수 원료 수확 및 보관 절차&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자색옥수수 재배 → 적기 수확 → 수확 후 포엽 분리 → 냉풍제습 건조 → 보관</li> <li>- 완전 건조 시료 + 산업용 실리카겔 동봉하여 완전 밀폐 → 별도 저장고 보관</li> <li>- 저장고 관리: 전문업체에서 매월 소독 및 살서, 살충 서비스를 받고 있으며 지정 방문 일자 외 위생관리에 대한 수시 요구를 통하여 원료 저장고 관리를 하고 있다. 저장고 외부의 살서제는 유해동물이 먹이를 먹고 서식지로 돌아가서 사망하게 유도하는 약재이며 세스코의 전문인력을 통해서 관리 된다. 또한, 올해 시료 수확 후 저장고에 건조 시료 입고 전 저장고 전체를 청소 업체를 통하여 청소를 진행하고 살균 및 소독 처리를 시행하였다. 별도 보관 장소는 외부와의 접촉을 최소화 하고 제습기 가동 등으로 습도관리를 하고 있다.</li> </ul> <p>① 세스코 방제 서비스(월별 소독 및 살서, 살충 등)<sup>2</sup></p> <p>② 저장고 살균 및 청소(특수업체)<sup>3</sup></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div data-bbox="182 1401 504 1642">  <p data-bbox="275 1652 409 1683">&lt;원료보관&gt;</p> </div> <div data-bbox="526 1401 848 1642">  <p data-bbox="634 1652 741 1683">&lt;포충등&gt;</p> </div> <div data-bbox="871 1401 1198 1642">  <p data-bbox="903 1652 1162 1683">&lt;저장고 외부 살서제&gt;</p> </div> </div>	

○ 식품용 주정 제조 확인

- 제조과정에 사용되는 주정이 식품 용도로 제조되었음을 확인하기 위하여 주정 구입 회사(대한주정라이프)로부터 식품(식품첨가물) 품목제조보고서를 확인하였다. 제품명은 정제주정, 원재료명 또는 성분명은 정제수, 과실수, 조주정, 주정으로 표기되어 있으며 용도용법은 주류 및 식품제조 등의 목적이라고 기재되어 있다<sup>4</sup>.

2. 원료특성에 관한 자료

○ 지방산, 아미노산, 무기질, 비타민의 3 배치 생산 및 이를 분석한 결과 확인

- 추출물 제조 내역
  - Lot.No.: PCH001, PCH001-2, PCH001-3<sup>1</sup>
  - 용도: 독성시험 및 배치별 분석데이터 확보용 시료
  - 지표성분 분석 등 생산배치별 Certificate of Analysis 작성<sup>2</sup>
- 자색옥수수 포엽 건조 시료를 제조공정에 따라 3배치 생산하였다(생산 배치별 추출물 현황 참조)<sup>1</sup>. 각 배치별 추출물은 독성시험 및 지방산, 구성아미노산, 유리아미노산, 비타민, 무기질 분석 시험용 시료로 사용하였고 추출물 입고 시 지표성분 확인 시험을 통하여 품질을 확인<sup>2</sup>하였으며 해당 배치별 분석항목과 일정은 아래 표에 기재하였다.

<생산 배치별 추출물 현황<sup>1</sup>>

제조사	제조일	배치명	생산량		
			건조포엽 (kg)	추출물(kg)	수율(%)
엠앤에이드	2021.04.01.	PCH001	30kg	7.8kg	26%
엠앤에이드	2022.04.29.	PCH001-2	20kg	5.1kg	25.5%
엠앤에이드	2022.04.29.	PCH001-3	20kg	5.2kg	26%

<신청 시 제출 첨부 자료 중 분석보고서 참조>

제조일	배치명	지방산	구성아미노산	유리아미노산	비타민	무기질
		분석일자				
21.04.01.	PCH001	22.10.7.	22.10.20.	22.10.20.	22.10.7.	22.10.7.
22.04.29.	PCH001-2	22.10.7.	22.10.20.	22.10.20.	22.10.7.	22.10.7.
22.04.29.	PCH001-3	22.10.7.	22.10.20.	22.10.20.	22.10.7.	22.10.7.

- 추출물 지표성분 C3G의 저장기간에 따른 안정성 확인 자료
  - 최초분석보고서(시험일자 22.10.17.): 분석시험 성적서 참조<sup>3</sup>
  - 최근분석보고서(시험일자 23.09.15.): 분석시험 성적서 참조<sup>4</sup>
  - 공인인증시험기관 분석보고서(시험일자 23.10.24.): 분석시험 성적서 참조<sup>5</sup>

〈분석일자별 C3G 함량 비교: 강원특별자치도농업기술원 자체시험결과〉

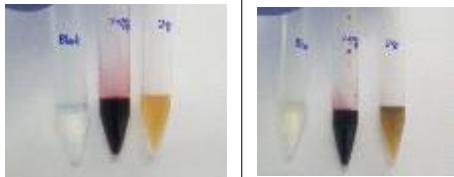

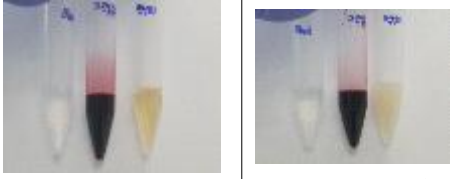

- 아래 표의 C3G분석은 신청기관 자체 분석 결과를 비교한 데이터이다. 최초 분석일로부터 약 1년 경과 후 동일 시료 분석 결과를 나타내었다. 배치별 시료는 동일 조건에 저장한 것을 사용하였다(은박 지퍼백, 밀폐(흡습제동봉), 냉장). 또한 동일 시료를 공인시험분석기관에 C3G 함량 분석의뢰를 진행하였다. 3번의 분석 결과를 아래 표에 기재하였으며 최초 분석 결과를 기준으로 각 시험별 회수율은 90~110% 범위로 나타나 추출물의 지표성분인 C3G 함량은 저장기간 동안 안정적이라는 것을 확인할 수 있었다.

시료명 (Lot No.)	단위	2022.10.17.			2023.09.15.			2023.10.24.		
		자체분석결과						(한국기능식품연구원)		
		배치별	Avg.	S.D.	배치별	Avg.	S.D.	배치별	Avg.	S.D.
PCH001	g/100g	2.105	2.07	0.03	2.057	1.97	0.08	2.174	2.10	0.11
PCH001-2		2.039			1.946			2.144		
PCH001-3		2.070			1.910			1.968		

○ 알칼로이드 침전법

- 침전법 시험은 Korean Pharmacopoeial Forum(Vol.9 No.2 참조) 91~92페이지 “알칼로이드시약에 의한 방법”을 참조하여 수행하였다. 침전법에 사용된 시약은 드라겐드로프(Dragendorff)와 마이야시약이다. 대한민국약전포럼 방법에 따라 시료 0.5g에 묽은 아세트산 10mL을 첨가하고 수욕에서 2분간 가열하여 식힌 다음 여과한 여액 5mL에 드라겐드로프시약또는 마이야시액 2~3방울을 넣을 때 침전정도를 확인하였다. 드라겐드로프 적용시험은 고삼을 양성대조군으로, 미야야시액은 백선피를 양성대조군으로 사용하였다. 추출물과 양성대조군은 모두 동일한 조건에서 전처리하여 각각의 시액을 반응시켰다.

추출물 침전반응 결과 사용된 두 가지 시약에 대하여 양성대조군(고삼, 백선피)에서의 변화는 관찰되었으나 추출물은 짙은 색상으로 인하여 침전반응 유무를 확인할 수 없었다. 하여 동일한 시료를 대상으로 알칼로이드 추출방법에 따라 분획물을 조제하여 침전반응 시험을 하였다. 분획물 침전반응 결과, 사용된 두 가지 시약에 대하여 양성대조군(고삼, 백선피)에서의 색변화와 침전변화를 확인할 수 있었으며, 음성대조군과 분획물에서는 시약으로 인한 침전반응은 확인되지 않았다. 상기 결과에 따라 자색옥수수 포엽 추출물에 알칼로이드는 존재하지 않는 것으로 판단된다. 자세한 시험법과 결과는 보고서에 기재하였다<sup>6</sup>.

<p style="text-align: center;">dragendorff 반응시험</p>  <p style="text-align: center;">&lt;시액 반응 전&gt;      &lt;시액 반응 후&gt;</p>	<p style="text-align: center;">dragendorff 반응시험</p>  <p style="text-align: center;">&lt;시액 반응 전&gt;      &lt;시액 반응 후&gt;</p>
<p style="text-align: center;">Mayer's 시약 반응시험</p>  <p style="text-align: center;">&lt;시액 반응 전&gt;      &lt;시액 반응 후&gt;</p>	<p style="text-align: center;">Mayer's 시약 반응시험</p>  <p style="text-align: center;">&lt;시액 반응 전&gt;      &lt;시액 반응 후&gt;</p>
<p>&lt;추출물 침전반응시험&gt;</p>	<p>&lt;분획물 침전반응시험&gt;</p>

### 3. 안정성에 관한 자료

○ 신청원료의 알레르기성을 확인할 수 있는 추가 자료(Allergene Online등 활용)

- 알레르기성 자료

- (1) 옥수수 포엽 및 속대의 알러지 발생에 대한 자료를 다양한 검색어(corn husk, cyanidin-3-glucoside 등)로 Pubmed 및 SienceON 등에서 조사한 결과, 알러지 발생을 유발한다는 논문 및 연구보고서 등은 보고되지 않았다.
- (2) 알러르겐 데이터 베이스에서 “옥수수 속(Zea mays)”으로 검색한 결과 5종의 알레르겐(Zea m1(beta-expansin), 8(chitinase), 12(profilin), 14(lipid transfer protein), 25(thioredoxin))<sup>5,6</sup> 으로 보고되고 이중 음식 섭취 유발 2종의 알레르겐(Zea m 8, 14)S7,S8으로 있으나 옥수수 포엽(corn husk) 기원 알레드겐은 보고되지 않았다.
- (3) 오히려 corn husk 섭취는 알러지 발생을 억제한다고 보고되었다.<sup>1</sup>
- (4) Cyanidin-3-glucoside의 알러지성 염증 완화 효과를 확인하였다.<sup>2</sup>

\* 국내외 정부보고서, 국제기구보고서 또는 관련 데이터베이스(DB)

Database	검색어	검색 결과	알레르기성 관련 정보 여부	첨부 번호
pubmed 학술지데이터베이스 (전세계)	corn husk & allergy	1	Corn husk(포엽)의 arabinoxylan 수용성 가수분해물(이하CHAX)은 알러지 유발을 억제하는 Th1 cytokine인 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 를 유의적으로 증가시켰으며, CHAX는 NK 세포 활성을 유의적으로 증가시켰다. 또한 CHAX는 아토피 피부염 동물에게서 아토피 증상을 대조군에 비해 유의적으로 개선을 나타내었다.	
SienceON 학술지데이터베이스 (국내)	corn husk & allergy	0	옥수수 포엽에 대한 알러지 발생에 대한 보고는 없음.	
KISS 학술지데이터베이스 (국내)	corn husk & allergy	0	옥수수 포엽에 대한 알러지 발생에 대한 보고는 없음.	
AllergenOnline(국제 알러르겐 데이터베이스)	Zea mays	31	5종의 알레르겐(Zea m 1(beta-expansin), 8(chitinase), 12(profilin), 14(lipid transfer protein), 25(thioredoxin)) 보고 됨	
COMPARE(국제 알러 르겐 데이터베이스)	Zea mays	31	5종의 알레르겐(Zea m 1(beta-expansin), 8(chitinase), 12(profilin), 14(lipid transfer protein), 25(thioredoxin)) 보고 됨	
WHO/IUIS Allergen Nomenclature (국제 알러르겐 데이터베이스)	Zea mays & food allergens	2	1. 알레르겐(Zea m 8):IV급 키티나아제 식품 알레르기 증례 이력, 6명 중 6명은 재조합 단백질에 특이 IgE, 3명은 옥수수 가루 추출물에 IgE 양성 반응 2. 알레르겐(Zea m 14):비특이적 지질전달 단백질 1 옥수수 섭취 후 전신 증상이 나타나고 옥수수에 대한 피부 반응이 양성인 22명의 환자 중 19명(86%)의 혈청이 면역블롯에서 9kd LTP 단백질을 인식함(N 말단 아미노산 서열 분석으로 확인).	
* 국내·외 데이터베이스(DB)에서 옥수수포엽의 주성분인 cyanidin-3-glucoside에 대한 알러지 검색				

Database	검색어	검색 결과	알레르기성 관련 정보 여부	첨부분번호
pubmed 학술지데이터베이스 (전세계)	cyanidin-3-glucoside & allergy	6	cyanidin-3-glucoside가 마우스 천식 모델에서 IL-4Rα-STAT6 신호 전달 경로를 조절하여 알레르기성 기도염증을 완화함.	
ScienceON 학술지데이터베이스 (국내)	cysnidin-3-glucoside & allergy	0	cyanidin-3-glucoside와 관련된 알러지 발생에 대한 보고는 없음.	
DBpia 학술지데이터베이스 (국내)	cysnidin-3-glucoside & allergy	0	cyanidin-3-glucoside와 관련된 알러지 발생에 대한 보고는 없음.	
RISS 학술지데이터베이스 (국내)	cysnidin-3-glucoside & allergy	0	cyanidin-3-glucoside와 관련된 알러지 발생에 대한 보고는 없음.	
○ GLP 기관(크로엔)에서의 안전성 판단 추가 자료				
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 90일 반복투여 독성에 대한 과학적 근거 제시</li> <li>- 요검사 결과 투여군에서의 대조군에 비해 빌리노겐, 단백질 농도 의존적으로 증가, pH의 감소 등에 대한 추가 의견서 첨부(GLP: 크로엔)</li> <li>- 결론: 상세 의견 보고서 참조<sup>6</sup></li> </ul> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>시험물질 자색옥수수 모염 추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 90 일간 반복 경구투여 하였을 때 나타난 요 검사의 변화는 시험물질의 물리화학적 특성, HCD 와 본 시험에서 진행한 검사들의 결과들, 생물학적 변동 범위 등을 종합적으로 고려하여 판단할 때 본 시험에서 관찰된 유로 빌리노겐, 단백질 함량의 농도 의존적 증가, pH 의 감소는 시험물질의 물리화학적 특성에 따른 현상으로 독성학적 영향은 아닌 것으로 사료됩니다.</p> </div>				
○ 기타주류에 대한 식품코드의 재설정, 이를 반영한 섭취자와 전체 대상자의 섭취량 평가				
주류는 탁주·양주·청주·맥주·과실주 등을 포함하는 발효주류와 소주·위스키·브랜디·일반 증류				

주·리큐르 등을 포함하는 증류주류, 그리고 기타주류 등으로 구분된다. 이 가운데 탁주는 흔히 국민들이 즐겨마시는 막걸리다. 최근에는 막걸리 시장도 성장하고 젊은층도 막걸리를 선호하는 추세가 되면서 다양한 향이나 재료 등을 첨가한 새로운 막걸리 제품들이 나오고 있다. 문제는 막걸리에 부원료를 첨가하면 그 순간 탁주가 아닌 기타주류로 주종이 달라지며 막걸리란 명칭사용이 불가능해 진다. 강원특별자치도 농원기술원에서는 기타주류로 막걸리 형태의 주류로 판매하고자 하며, 이에 따라 섭취량 평가는 유사한 막걸리로 진행하였으며 이를 반영한 섭취량 보고서를 첨부합니다.

### (시험 5) 자색옥수수 포엽의 식품소재화 및 적성탐색

식품의 색도는 식품의 이화학적 품질과 안정성을 외관적으로 판단하는 품질지표이다. 천연색소로써 가공적성 탐색을 위하여 안토시아닌이 함유된 포엽 추출물의 열 안정성을 블루베리와 흑미 추출물과 비교하였다. 안토시아닌은 천연색소로 온도, 빛, 산소, pH 등에 영향을 받아 소실되기 쉬운 천연물 중의 하나이다. 자색옥수수 포엽 추출물의 가열시간에 따른 색도 변화를 측정하였다. 포엽, 블루베리, 흑미를 30% 주정에 추출하고 동일 조건으로 분무건조한 시료를 사용하였다. 해당 추출물을 물에 녹인 후 100℃ 수욕에서 20, 40, 60분 반응시키고 가열하지 않은 시료(0분)에 대한 색차와 brown index를 비교하였다. 색차( $\Delta E$ )분석은 색차계를 이용하여 가열 전, 후 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값의 차이에 따른 색차를 산출하였고 brown index(BI)는 각 추출물을 증류수를 1:10(w/v) 비율로 섞고 0.45 $\mu$ m 필터에 통과 후 420nm와 520nm에서 흡광도 측정하여 420nm의 흡광도 값을 520nm의 흡광도 값으로 나누어 산출하였다.

표 1. 추출물별 열처리시간에 따른 색도변화

시료구분	열처리시간 (min)	L	a	b	$\Delta E$	brown index
포엽	0	32.31	-0.05	-0.82	0.00	0.85
	20	32.45	0.00	-0.82	0.15	0.84
	40	32.64	0.01	-0.86	0.34	0.87
	60	32.80	-0.09	-0.85	0.49	0.82
블루베리	0	34.71	2.46	-0.73	0.00	0.68
	20	34.36	1.84	-0.67	0.72	0.81
	40	34.59	1.54	-0.48	0.96	0.94
	60	35.23	1.60	-0.20	1.13	1.07
흑미	0	32.87	0.85	-0.41	0.00	1.16
	20	32.92	1.10	-0.22	0.31	1.26
	40	33.24	1.18	-0.18	0.54	1.27
	60	32.79	1.71	-0.47	0.93	1.29

추출물 간 명도나 황색도 보다 적색도에서 차이를 보였다. 가열시간에 따른 색차는 블루베리 추출물이 가장 컸으며 갈색지수(BI)는 흑미 추출물이 가장 큰 차이를 나타내었다. 안토시아닌 배당체의 가수분해속도에 따른 차이라고 판단된다. 안토시아닌 배당체 중 글루코스가 아라비노스나 갈락토스보다 열에서 더 안정적인 것으로 알려져 있으며 블루베리의 주요 안토시아닌은 malvidin-3-galactoside와 malvidin-3-arabinoside이고, 포엽과 흑미의 주요 안토시아닌은 cyanidin-3-glucose이다. 포엽 추출물은 블루베리 추출물보다 열에서 더 안정적인 주요 안토시아닌을 함유하고 있으며 주요 안토시아닌이 같은 흑미 추출물보다 열에서 더 안정적인 것을 확인할 수 있었다. 갈색지수(BI)는 식품의 갈변정도를 나타내는 척도로 사용되는데, 추출물 간 열처리 후 갈색지수의 변화가 큰 것은 블루베리 추출물이었으며 열에 의한 갈변의 정도가 큰 것을 알 수 있었다. 포엽은 다른 과일이나 곡물보다 당 성분이나 녹말 등의 함량이 낮아 가열 시 갈색지수의 변화가 크지 않은 것으로 판단된다.

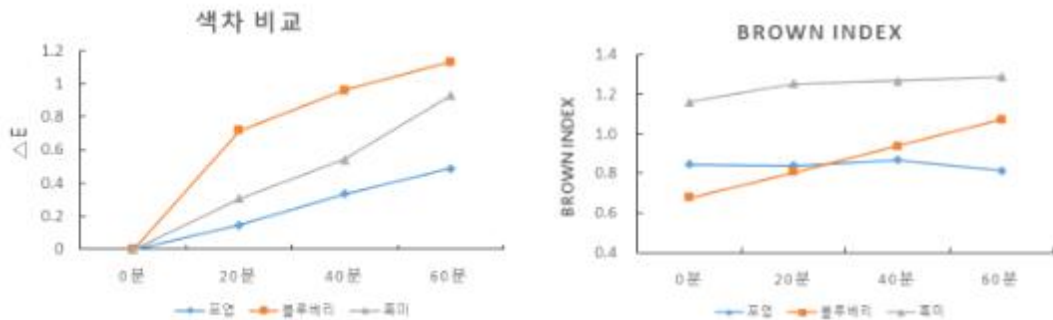


그림 1. 추출물별 색차와 brown index 비교

추출물의 기타주류 적용 시 발효주정 함량(20도, 35도, 40도)에 따른 추출물의 색도와 저장 기간에 따른 총안토시아닌 함량, 추출물의 구연산 함유 여부에 따른 색도와 총안토시아닌을 측정하였다. 구연산이 함유되고 주정의 농도가 높을수록 저장기간에 따른 색차가 낮았으며 구연산이 함유된 추출물의 안토시아닌은 주정 농도와 상관없이 비교적 안정적인 것으로 나타났다. 포엽 추출물의 주류 적용 시 허용 pH가 3.8~4.7인 탁주(막걸리) 또는 알코올 도수가 높은 증류주에 적합하다고 판단된다.

표 2. 주정 농도별 추출물 구연산 함유에 따른 색도 변화

추출물 구분		0일			7일			14일			ΔE
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	
구연산 무첨가	D.W	34.52	2.09	-0.14	34.68	1.84	-0.25	34.43	1.41	-0.36	0.72
	20도	35.52	0.73	0.17	35.55	0.58	0.52	34.38	0.27	0.16	1.23
	35도	35.29	1.51	-0.62	35.59	1.25	-0.12	34.31	0.50	-0.34	1.43
	40도	34.95	2.01	-0.61	34.73	2.16	-0.57	34.17	0.73	-0.93	1.53

구연산 유첨가	D.W	34.80	2.21	-0.14	34.90	1.26	-0.30	34.35	0.11	-0.67	2.21
	20도	35.15	1.64	0.33	35.11	1.58	-0.22	35.74	0.96	-0.35	1.13
	35도	35.26	1.54	-0.55	35.26	1.72	-0.30	34.18	0.66	-0.59	1.39
	40도	35.25	1.66	-0.46	34.30	1.76	-0.43	34.13	1.56	-0.64	1.14

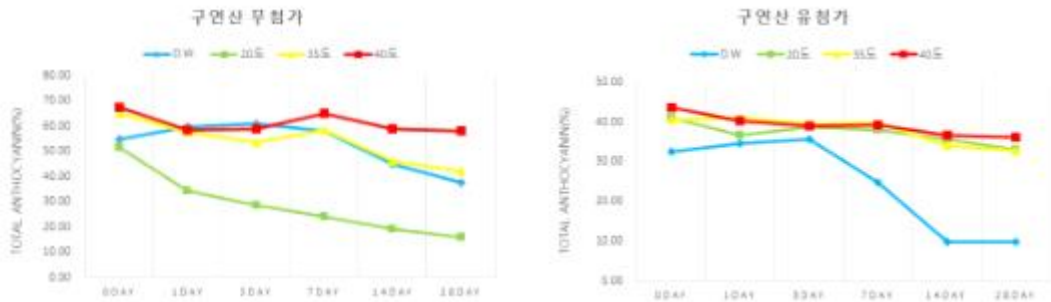


그림 2. 구연산 함유에 따른 총안토시아닌 변화

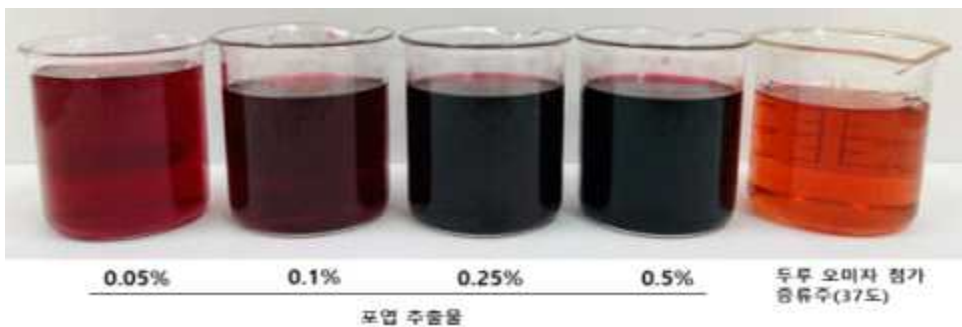


그림 3. 주정(40도) 추출물 적용 색 비교

떡 제조에 주로 사용되는 멥쌀과 찰쌀에 추출물을 첨가하여 색소 발현 정도를 확인하였다. 멥쌀과 찰쌀에 포엽, 자색고구마, 블루베리 추출물을 0.5%(포엽 추출물 최고 적용 용량) 첨가하고 찌는 방식으로 떡을 제조하였다. 색소의 발현은 멥쌀보다 찰쌀이 우수하였고 블루베리나 흑미 추출물 보다 포엽 추출물을 첨가하여 제조한 것이 색소 발현이 우수하였다.

【멥쌀】



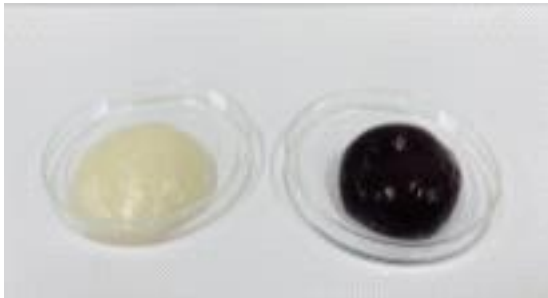
【찰쌀】



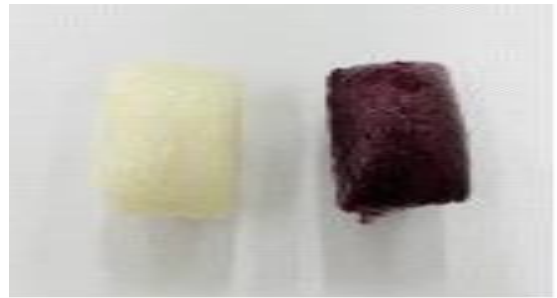
【(왼쪽부터) 포엽-자색고구마-블루베리 추출물 순】

그림 4. 쌀 종류와 추출물 첨가에 따른 떡의 색소 발현 정도

찰쌀을 사용하여 찌는 방식이 아닌 데치는 방식(경단)으로 제조하였을 시 색소 발현이 안정적이었으며 멥쌀의 경우 시루에 찌는 방식인 설기보다 막걸리를 첨가하여 찌는 방식인 증편에서 색소 발현이 우수하였다.



【찰쌀 경단】



【멥쌀 증편】

그림 5. 쌀종류와 제조 방식에 따른 떡의 색소 발현 정도

포엽 추출물 첨가 떡 제조 및 사업화 추진을 위하여 지역농산물 활용 트렌드 떡을 상품화(예향(황성))하였다. 제과제빵에 추출물 첨가 시 화학적 팽창제로 사용되는 염기성의 탄산수소나트륨으로 인하여 제품의 색소 발현이 떨어지는 특징이 있다. 팽창제를 사용하지 않는 떡 제조에 추출물 첨가 시 안정적인 색소 발현이 가능하며 고품질 상품개발이 가능하다. 추출물을 천연색소로 사용하여 떡소와 반죽에 추출물 첨가하여 제조 테스트 시, 떡소로 사용되는 크림에 첨가된 추출

물은 색소 발현이 떨어지고 단시간 내 색상이 변화되었다. 포엽이 보라색이고 알곡이 노란색인 자색옥수수 품종의 특징을 반영하여 보라색 떡 반죽에 노란색 옥수수 크림을 넣어 제조하였다. 포엽 추출물의 한시적식품원료 등록 시 추출물을 첨가하여 제조한 떡의 품목제조신고 후 대형마트 등에 납품하는 상품으로 출시 예정이다.

## 4 적 요

### <제2세부과제 : 자색옥수수 포엽 활용 식품소재화 및 적성 탐색>

#### (시험 1) 자색옥수수 포엽 수확후 관리

- 가. 포엽의 최적 건조 온도는 50℃, 수확 후 즉시 건조 → 1일 경과 후 포엽 분리 → 완전 건조 방법이 품질관리면에서 유리하며, 건조 포엽의 저장 기간동의 안토시아닌 함량 분석 결과, 색소 함량의 큰 차이는 나타나지 않았음
- 나. 수확한 포엽 시료를 즉시 건조할 수 없는 경우, 냉동보다는 냉장 보관 후에 건조하는 것이 원재료의 색소 함량이 안정적이며 포엽을 분리하지 않고 저장한 시료의 색소 함량이 더 높은 것으로 확인됨
- 다. 연도별 분무건조 추출물의 C3G 함량은 1.64%~2.07%이었으며 포엽 추출물의 지표성분 C3G 기준값인 1.66%~2.49% 범위 내로 확인됨.

#### (시험 2) 자색옥수수 포엽의 대량 추출방법 확립

- 가. 건조 포엽의 20~60% 에탄올의 추출 수율에 큰 차이가 없었으므로 주정(에탄올) 비용과 식품활용을 고려하였을 때 대량 추출 시 주정의 비율은 20%~30% 적함함.
- 나. 30% 주정-20% 부형제 첨가 추출물이 지표성분인 C3G의 함량이 2.17%로 가장 높았으며 추출 수율은 24.9%이었음

#### (시험 3) 자색옥수수 포엽 독성평가

- 가. 유전독성시험 결과, 복귀돌연변이시험 및 소핵시험, 체외 염색체 이상 시험에서 모두 음성 판정 받았으며 추출물의 유전독성은 없는 것으로 확인됨
- 나. 설치류 경구 투여 독성시험 결과, 최대 5,000 mg/kg까지 투여 시 시험물질에 의한 독성반응 없었으므로 GHS 분류는 'Category 5 or Unclassified'(최고안전 등급)로 분류됨
- 다. 설치류 90일(13주) 반복투여 독성시험 및 28일 회복시험에서 포엽 추출물에 의한 다음 검사 항목에 대한 독성학적 변화 및 특이사항 관찰되지 않음
- 라. 포엽 추출물 대상 조제물 분석 결과, 시스템적합성(System suitability): 정밀성 5% 이내로 적합, 특이성(Specificity) 및 직선성(Linearity) 우수, 일내재현성(Intra-day)의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85 ~ 115 % 범위로 확인되어 판정기준에 적합함

#### (시험 4) 자색옥수수 포엽의 한시적 식품원재료 신청

- 가. 독성시험 결과를 바탕으로 무독성량 5,000mg/kg 기준 섭취량 평가를 수행하였으며 사

용대상식품은 고행차, 캔디류, 기타주류, 캔디류로 설정하고 「식품원료의 한시적 기준 및 규격 인정」 신청서를 제출함

- 나. 한국기능식품연구원 등 공인인증 분석기관에서의 한시적 식품원료 신청용 분석 결과 데이터와 3 batch 생산한 포엽 추출물의 시험성적서를 확보함
- 다. 지표성분 분석 및 기시법을 확립하고 이에 따라 분석한 결과, 포엽 추출물의 지표성분 평균 함량은 2.071 g/100g이었으며 지표성분의 기준규격을 80 ~ 120%로 설정 시, 포엽 추출물의 C3G 기준값은 1.66%~2.49%로 확인됨

#### (시험 5) 자색옥수수 포엽의 식품소재화 및 적성탐색

- 가. 포엽 추출물은 블루베리 추출물보다 열에서 더 안정적인 주요 안토시아닌을 함유하고 있으며 주요 안토시아닌이 같은 흑미 추출물보다 열에서 더 안정적인 것을 확인함
- 나. 구연산이 함유되고 주정의 농도가 높을수록 저장기간에 따른 색차가 낮았으며 구연산이 함유된 추출물의 안토시아닌은 주정 농도와 상관없이 비교적 안정적인 것으로 나타남
- 다. 떡류 제조에 추출물 적용시, 색소의 발현은 멥쌀보다 찰쌀이 우수하였고 블루베리나 흑미 추출물 보다 포엽 추출물을 첨가하여 제조한 것이 색소 발현이 우수하였음

### 5 인용문헌

- 강예빈, 고은미. 2022. 안토시아닌 조성이 다른 베리류 3종의 열 안정성 비교.32(6) 360-369. 동아시아식생활영양학회지
- 김효주, 위지향, 양은주. 2015. 흑미 미강으로부터 안토시아닌의 최적 추출 조건 및 안토시아닌 추출 분말의 저장 안정성. 44(1) 1543-1549. 한국식품영양과학회지
- 김희연, 박종열, 박기진, 류시환, 장은하, 고병대, 윤병성, 용우식, 최재근. 2021. 안토시아닌 고함유 자색옥수수 '색소1호'의 주요특성. 534-538. 한국육종학회지
- 의약품심사부 의약품규격과. 2015. 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서. 1-55. 식품의약품안전평가원
- 식품기준기획과. 2021. 한시적 기준, 규격 제출자료 작성 가이드. 1-117. 식품의약품안전처

## 6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2020(1년)	학술발표	자색옥수수 포엽의 품질특성
2021(2년)	학술발표	포엽 분무건조 추출분말의 제조 및 특성
	논문게재	자색옥수수 포엽 및 속대추출물의 Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체 이상시험
2022(3년)	학술발표	자색옥수수 포엽 추출물의 특성(유해물질 등)
	홍보	건강한 보랏빛 유혹, 기능성 옥수수의 새시대를 열다!
	정책제안	자색옥수수 포엽 추출물의 한시적식품원료 등록
2023(4년)	학술발표	자색옥수수 포엽 활용 식품소재화(주류 적용 특성)
	영농정보	자색옥수수 포엽 추출물 항비만 활성
	홍보	안토시아닌이 풍부한 자색옥수수

성과지표명		연도		1년차 (2020)		2년차 (2021)		3년차 (2022)		4년차 (2023)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
논문 게재	SCI												
	비SCI			1	1							1	1
학술 발표	국제			1	1	1	1					2	2
	국내	1	1							1	1	2	2
영농 활용	기술												
	정보									1	1	1	1
홍보					8	1	8			8	8	1	24
정책제안								1					
계				2	2	2	10	2	10	2	10	7	31

7 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도			
					'20	'21	'22	'23
과제책임자	옥수수연구소	농업연구사	김희연	과제 총괄	○	○	○	○
세부책임자	농업기술원	농업연구사	이기연	세부주관 수행	○	○	○	○
공동연구자	농업기술원	농업연구사	이재형	시험수행 및 평가		-	○	○
	"	"	이재희	품질조사 지원		○	○	○
	"	"	김경대	품질조사 지원		○	○	
	"	농업연구관	장은하	평가분석 지원		○	○	
	"	"	서영호	현장조사 지원				○
	"	"	김기선	평가분석 지원				○