

11-1543  
000-002  
039-01

발간등록번호

11-1543000-002039-01

국민 건강 증진을 위한 알러지  
물질이 저감화된 천연색소의 발굴  
및 나노화를 통한 안정성 향상 기술  
개발과 대량 공정 표준화를 통한  
산업화 최종보고서

2017.12.29

주관연구기관 / (주)케미메디  
협동연구기관 / (재)한국천연색소산업화센터

High Value-added Food Technology  
Development Program R&D Report

국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화된 천연색소의 발굴  
및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공정 표준화를  
통한 산업화 최종보고서

2017

농림축산식품부

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화된 천연색소의 발굴 및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공정 표준화를 통한 산업화”(개발기간 : 2015. 10. 12 ~ 2017. 10. 11)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 11 . 24 .

주관연구기관명 : (주)케미메디 (대표자) 최 건 섭 (인)

협동연구기관명 : (재)한국천연색소산업화센터 (대표자) 정 우 석 (인)



주관연구책임자 : 김상욱

협동연구책임자 : 김윤희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	315062-2	해당 단계 연구 기간	2	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화된 천연색소의 발굴 및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공정 표준화를 통한 산업화			
	세 부 과 제 명	주관기관 : 신규 알러지 유발 저감 효과를 가지는 천연색소 발굴 및 기능성 나노융복합체 개발 협동기관 : 대량생산공정 확립 및 나노융복합체의 산업화			
연구책임자	김상욱	해당단계 참 여 연구원 수	총:   명 내부:   명 외부:   명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:200,000천원 민간: 67,000천원 계:267,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총:   명 내부:   명 외부:   명	총 연구개발비	정부:400,000천원 민간:134,000천원 계:534,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)케미메디 (재)한국천연색소산업화센터			참여기업명 (주)케미메디	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수	
1. 알러지 저감 신규 천연색소의 선정과 기능성 및 지표물질 함량 확인 2. 천연 색소의 나노 복합체 제조 및 안정성 유무 확인 3. 대량생산 공정 확립을 위한추출조건 확립 4. 효율 및 안정성을 고려한 천연색소 대량 생산 기반 기술 개발 5. 나노 복합체색소의 효능,안정성 확인 및 시제품 개발 6. 나노화복합물 대량생산 최적 공정 확립 7. 산업화 적용 테스트 완료				93 페이지	

## < 국문 요약문 >

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>알러지 물질 저감 효과를 지니는 천연 색소의 발굴과 나노 기술을 접목한 색소의 대체제 국산화 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 알러지 저감 천연 색소 원료의 선정</li> <li>- 신규 색소의 기능성 연구</li> <li>- 신규 색소의 알러지 유발 유무 확인</li> <li>- 천연 색소의 나노 콤플렉스제조</li> <li>- 추출조건 확립</li> <li>- 안정성 기술적용</li> <li>- 나노 입자 개발 기술 적용을 통한 대량 생산 기술 개발</li> </ul>	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자소엽 자초, 감국, 강황의 추출 조건에 따른 색상의 변화 비교               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 최적 추출 조건 확립</li> <li>· 추출 조건에 따른 색가 비교</li> </ul> </li> <li>- 저장에 온도와 시간에 따른 안토시아닌 지표 성분의 함량 변화 비교</li> <li>- 알러지 저감 효과 검증</li> <li>- 자소엽, 자초 의 안토시아닌과 양전하성 다당류인 키토산과의 복합체 형성</li> <li>- 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체의 안정성 시험               <ul style="list-style-type: none"> <li>· pH 에서의 안정성 시험</li> <li>· 온도에서의 안정성 시험</li> <li>· 광에서의 안정성 시험</li> </ul> </li> <li>- 천연색소의 원료 선별 및 대량 최적 추출공정개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 자소엽, 자초(자근), 강황을 이용한 최적 추출공정개발</li> <li>· 추출온도, 추출시간 색상변화 확인</li> </ul> </li> <li>- 대량생산을 위한 공정 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 최적화 추출용매 배합비율 선정</li> <li>· 추출 최적시간 설정</li> <li>· 추출 최적온도 설정</li> </ul> </li> <li>- 효율 및 안정성을 고려한 천연색소 대량 생산 기반 기술 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 약용작물 유래 천연색소의 저장안정성향상연구</li> <li>· 산도조절제와 유기용매법을 활용한 추출을 통한 추출효율 및 안정성 향상</li> <li>· 농축공정 안정성 기술적용 테스트</li> </ul> </li> </ul>	
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p><b>경제적/산업적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연색소 소재의 단점인 알러지 및 쇼크 발생률 감소를 통한 해외 수출</li> <li>- 다양한 소재에 융복합체 기술을 도입함으로써 신규시장 형성 및 부가가치 창출 기대</li> <li>- 인공색소 남용으로 인한 환경오염 저감, 국민 건강 위해성 감소</li> <li>- 약용작물 재배 활성화와 수급체계 확립을 통한 농가소득 증대 및 향토자원의 가치 제고</li> <li>- 지역 약용작물의 안정적인 생산 및 판로를 통한 지역경제 활성화 기대</li> <li>- 수입의존적인 천연 색소의 국산화</li> <li>- 고부가가치 색소 함유 제품 개발</li> </ul>	

	<p><b>관련 제품 및 산업 분야</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품 산업 (천연색소를 함유한 다양한 음료, 유제품 등 안전한 색소가 필요한 식품 첨가물 산업)</li> <li>- 색상을 필요로 하는 유아용 식품이나 제품 활용</li> <li>- 인공 적색소와 황색소의 부작용으로 인해 개발된 코치닐 색소와 치자 황색소의 부작용이 발견됨에 따라 신규 알러지 유발 저해 효과를 가지는 적색 색소와 황색 색소의 대체제로 사용 가능</li> <li>- 알러지 특이 체질을 가지거나 항산화 활성 증가를 통한 항노화 식품소재 및 제약이용 가능성 확대</li> </ul> <p><b>관련 제품 및 산업 분야</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 확보에서 상품 판매까지 경제성과 과학기술 응용을 고려한 체계적인 연구 개발 필요</li> <li>· 천연색소를 이용한 기능성 용복합체 제품의 특성에 맞는 신규 통합 브랜드 · 패키지 개발과 홍보 마케팅 지원</li> <li>· 최종 제품 개발 가능성 분석 및 제품화 추진, 기존 거래업체 활용 및 신뢰성 인증 확보</li> <li>· 천연 색소의 수입 대체 효과 및 수출 증진</li> <li>· 국내 천연 색소 시장의 무분별한 남용으로부터 안전성을 확보한 제품을 통한 인증 및 식품 첨가물 등록을 통한 차별화 전략 구축</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	천연색소	안토시아닌 나노복합체	저장 안전성	자소염	강황

## < SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p>Development of localized technology of substitute for pigment that combines nanotechnology with excavation of natural pigment which has allergy reducing effect</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Select allergy reducing natural coloring materials</li> <li>- Study functional activity of new pigment</li> <li>- Check whether new pigment is allergen induced</li> <li>- Manufacture of Nano complexes of natural pigments</li> <li>- Establish extraction condition</li> <li>- Applicate stability technology</li> <li>- Develop mass production technology by applying nanoparticle technology</li> </ul>	
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparison of color change according to the extraction conditions(perilla frutescens, Lithospermum erythrorhizon, chrysanthemum, turmeric)               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Establish optimum extraction conditions</li> <li>· compare color value in line with extraction condition</li> </ul> </li> <li>- Compare contents of anthocyanin(standard component) with storage temperature and time</li> <li>- Verify allergy reduction effect</li> <li>- Formation of complex of anthocyanin of perilla frutescens and Lithospermum erythrorhizon with chitosan which is positively charged polysaccharide</li> <li>- Stability test of anthocyanin-glycol chitosan complex               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Stability test at pH</li> <li>· Stability test at temperature</li> <li>· Stability test in light</li> </ul> </li> <li>- Select raw materials of natural pigment and develop optimal mass extraction process               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Develop optimal extraction process using perilla frutescens, Lithospermum erythrorhizon and turmeric</li> <li>· Identify extraction temperature, extraction time and changing color</li> </ul> </li> <li>- Establish process for mass production               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Optimum solvent extraction ratio selection</li> <li>· Optimal extraction time setting</li> <li>· Optimum extraction temperature setting</li> </ul> </li> <li>- Develop mass production technology of natural pigments in consideration of efficiency and stability               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Improvement of storage stability of natural pigments derived from medicinal crops</li> <li>· Improve extraction efficiency and stability by extraction using acidity regulator and organic solvent method</li> </ul> </li> </ul>	

	· Test for application of concentration process stability technology				
Expected Contribution	<p><b>Economic / Industrial aspects</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Exports through reduction of allergy and shock rate, which is a disadvantage of natural coloring materials.</li> <li>- By introducing fusion technology to various materials, it is expected to form new market and create added value</li> <li>- Reduction of environmental pollution caused by abuse of artificial coloring and reduction of risk to public health</li> <li>- Increase the income of farm households and increase the value of local resources through the activation of medicinal crop cultivation and establishment of supply and demand system</li> <li>- Stable production of local medicinal crops and expectation of activation of local economy through marketing channels</li> <li>- Localization of import-dependent natural pigments</li> <li>- Development of products with high value added pigment</li> </ul> <p><b>Related Products and Industries</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Food industry (food additive industry that requires safe coloring such as various beverages containing natural pigments, dairy products)</li> <li>- Use baby food or products that require color</li> <li>- It can be used as a substitute for red and yellow pigment which have new allergic inhibition effect because of the adverse effects of cochineal pigment and gardenia yellow color developed due to side effects of artificial coloring matter</li> <li>- Increase the use of anti-aging food materials and pharmaceuticals by having allergic specific constitution or increasing antioxidant activity</li> </ul> <p><b>Related Products and Industries</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Systematic R &amp; D required from economics and application of science and technology from procurement of raw materials to sale of goods</li> <li>· Development of a new integrated brand / package that meets the characteristics of functional fusion products using natural pigments and support for promotional marketing</li> <li>· Analysis of final product development potential and promotion of commercialization, utilization of existing dealers and securing reliability certification</li> <li>· Substitute imported products and promote export of natural pigments</li> <li>· Establishing differentiated strategy through authentication and food additive registration secured from indiscriminate abuse of the domestic natural pigment market</li> </ul>				
	Keywords	Natural pigment	Antocyanin-na no complex	Storage stability	Perilla frutescens

# CONTENTS

I . Introduction of R&D projects.....	10
II . Current national and international technology trends.....	16
III . Results of R&D projects.....	22
IV . Target achievement rate of R&D projects and Contribution rate of related fields... .....	88
V . Research utilization plan.....	89
VI . Key performance of R&D projects.....	91
VII . References.....	92



## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	10
2. 국내외 기술개발 현황 .....	16
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	22
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	89
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	91
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	91
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	91
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	92
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	92
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	92
11. 기타사항 .....	93
12. 참고문헌 .....	93

<별첨> 자체평가의견서

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

# 1장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1절 연구개발 목적



○ 최근 소비자들의 건강을 중시하는 웰빙 트렌드에 맞추어 화학 합성된 소재와의 차별화된 안전성이 높고 인체에 대한 유해성과 부작용이 적은 천연 색소의 개발이 요구되어지고 있다. 그러나 일부 천연 색소에서 알러지 유발과 쇼크사망 사고가 발생하고 있으며, 아동의 ADHD를 발생시키는 원인으로 규명되어 지고 있다. 국민 건강 증진을 위하여 식품첨가물로 사용되는 천연색소의 단점인 알러지 반응 저감 효과와 기존 천연 색소의 단점을 보완하는 안정화 기술을 개발하여 기능성과 안정성이 개선된 천연 색소의 개발 및 산업화가 목표이다.

나노 소재 융복합 기술 개발을 통한 안토시아닌의 안정화 및 알러지 저감 원료로부터 색소를 분리하는 대량 공정 기술 개발을 통해 고부가가치 기능성 식품과 다양한 식품의 첨가물로 활용하고자 한다. 대체 하고자 하는 색소는 코치닐 색소 (붉은색)과 지차 황색소의 대체용 원료를 개발하여 산업화 하고자 한다.

○농산물유래 알러지 유발 저해 효과를 가지는 천연 색소의 발굴 (자소엽, 지치, 감국, 강황)

- ⇒ 소엽(자소엽), 감국(황국화), 강황, 지치 (자초)의 천연 색소의 추출 수율 최적화, 정제 기술 개발
- ⇒ 소엽(자소엽), 감국(황국화), 강황, 지치 (자초)의 천연 색소의 저장 안정성 향상 연구
- ⇒ 대량 생산 공정 확립 (안토시아닌의 나노 복합체 )
- ⇒ 천연색소의 알러지 저해 및 알러지 패턴 유무 효과 검증
- ⇒ 소엽(자소엽), 감국(황국화), 강황, 지치 (자초)의 나노 복합체의 형성
- ⇒ 천연 색소 소재의 식품 적용 제품군에 대한 열, pH, 광선 안정성 비교 검증

- ⇒ 고가가 가치 식품, 식품 첨가물등의 소재에 적합한 시제품 개발 및 제품화  
: 개발 색소 2건, 적용 시제품 3건 개발 (음료, 병과류, 제과 및 제빵)
- ⇒ 대체용 색소개발 이후 식품품목 신고를 위하여 추진계획 수립
- ⇒ 적용성 검증 및 저장 안정성 평가 미흡점 보완 연구
- ⇒ 지속적, 안정적인 색소의 대량 생산공정 기술 개발 및 공급체계 확보
- ⇒ 선택된 약용작물의 생산보급 확대 및 농가소득 기여
- ⇒ 천연색소를 활용한 고부가가치 제품 및 관련 시장 규모 확대
- ⇒ 천연 색소의 수입 의존 시장에서 탈피 수출 시장 확대

## 2절 연구개발의 필요성

### 1. 알러지 저감 기능성 천연색소 개발의 필요성

#### 가. 세계 천연색소 시장 및 국내 천연 색소 시장의 증가

- 천연 색소 산업은 시각적 감각에 민감한 인간 본연의 욕구 충족 의지와 생활수준의 향상과 맞물려서, 해마다 성장을 거듭하고 있는 미래 생물자원 사업임.
- 2013년 기준으로, 전 세계 색소 시장의 규모는 162억 달러에 달하며 연 평균 3.9%의 지속적인 성장을 보임 ('13, Freedonia).
- 천연색소 시장은 적은 비중을 차지하고 있으나, 기존의 인공색소에 대한 환경오염과 안정성 문제가 대두되면서, 천연색소가 차지하는 비중과 시장 규모가 증가되고 있음
- 2013년 기준, 천연색소 시장은 7억 2천만 달러이며, 전년 대비 3.6%가 증가함 ('14, technavio).
- 특히 국내 천연 색소 시장 규모는 약 343억원으로 추정되며, 2008년 이후 연평균 13% 이상의 성장을 보이고 있다.
- 천연색소의 주요 적용 산업 분야들은, 현재까지 음료, 과자, 그리고 향신료 등의 식음료 시장의 수요에 편중되어 있음 ('14, UBIC).
- 국내 천연색소 시장은 원료 확보가 가장 큰 문제이다,  
천연색소 대부분을 중국에서 수입하고 있어 원료 확보에 어려움이 예상되기 때문이다. 현재 국내 천연색소 사용량은 전체의 20%에 불과하다. 또 2012년 기준 천연색소 수입은 수출을 제외한 국내 출하량의 약 63%에 달하는 166억원(완성품+원료)어치가 들어오지만 수출은 7억원에 그치고 있다. 수출 품목은 캐러멜 색소, 홍국적색소, 파프리카 추출 색소가 주를 이루고, 수입은 원료 자체보다 완성품 형태로 들어오는 비율이 높다.

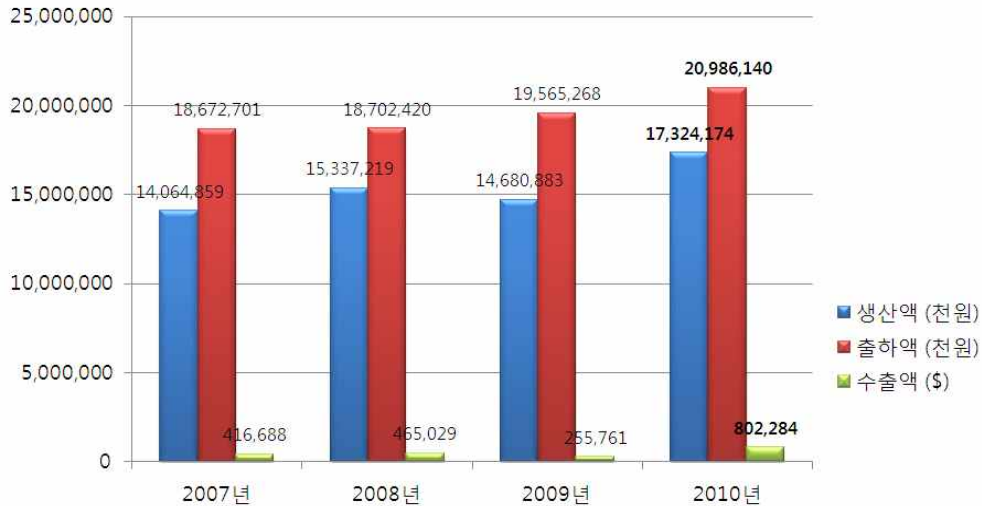


그림1. 국내 천연색소 생산실적 현황  
(출처 : 식품의약품안전청, 식품첨가물 생산실적 보고)

- 더불어서, 천연색소는 최근 식품산업 뿐만 아니라 화장품, 안료 및 염료 등의 다양한 산업 분야에 걸쳐 적용 확대가 이루어지고 있음.
- 천연 색소 중 코치닐 적색 색소와 치자 황색소 등은 우유나 제과, 맛살 등 다양한 분야에 적용 되어 지고 있다.
- 코치닐추출색소는 천연색소 중에서도 동물성색소로 분류된다. 선인장에 기생하는 연지벌레가 원료이기 때문이다. 연지벌레는 제조과정 중 카르민산이라는 물질을 생성하는데 이는 장염과 알레르기를 유발할 뿐 아니라 과민성 쇼크를 일으킬 수 있다는 연구 결과가 있다.
- 현재 미국과 일본 등은 코치닐색소를 유해물질로 규정하고 있지만 우리나라에서는 특별히 규제를 하지 않는 현실이다. 시중에서 붉은 색을 띠는 음료나 우유, 계맛살 등에는 여전히 코치닐추출색소가 아무렇지 않게 사용되고 있다.
- 유해성에 대한 논란이 분분한 치자황색소는 치자라는 천연재료가 원료가 된다. 중요한 것은 치자는 식용이 아닌 약용 혹은 염료로 사용해 왔다는 점이다. 일본에서는 치자황색소에 대해 위험물질로 분류하기도 했다.
- 천연색소는 안전하다고 마냥 신뢰할 수 없는 상황이지만 이들 제품들은 '천연'을 무기삼아 소비자들에게 어필하고 있다.

#### 나. 천연색소의 장점

- 천연색소는 인공색소와 달리 친환경소재이며 생체 내 안전성이 높음.
- 자연스러운 천연의 색조로 다양하게 조합할 수 있는 장점을 보유하고 있으며 가식(可食)할 수 있는 식품의 성분이기 때문에 여러 분야에서 다양하게 적용이 가능함.
- 착색효과가 좋고 생산 및 정제 기술이 인공색소에 비해 간단하고 제조원가도 절감할

수 있음.

- 원료 및 색상에 따라 다양한 생리활성 기능(phytonutrient)을 보유하고 있어 기능적·영양학적 가치도 매우 높음. (Table 1)

표 1. 천연색소의 원료, 형태, 구조에 따른 분류

분류	종류
<b>원료 (근원물질)에 따른 분류</b>	
동물성 색소	코치닐, 락색소 등
식물성 색소	치자황, 치자청, 홍화황, 비트레드, 적양배추색소, 자색고구마색소, 루테인색소, 파프리카 색소
미생물 색소	모나스커스(Monascus), 스피루리나 (Spirulina) 등
<b>형태 (유형)에 따른 분류</b>	
천연물 그대로 사용	과일의 잼류, 농축 주스류
천연물을 건조, 분쇄 등의 단순처리로 가공한 것	카레분말 등
천연물질로부터 색소 성분 추출, 정제, 농축한 후 분말화한 것	코치닐, 치자, 홍화, 적양배추, 자색고구마, 마리골드 등
가열 효소처리 등에 의해 만들어진 것	카라멜, 치자청색소, 치자적색소, 치자흑색소 등
합성으로 제조되어지는 카로티노이드색소	베타카로틴, 리보플라빈 등
<b>구조에 따른 분류</b>	
카로티노이드계 (Carotenoids)	안나토색소, 파프리카, 치자황, 베타카로틴
키논계 (Quinones)	코치닐색소, 락색소
플라보노이드계 (Flavonoids)	적양배추색소, 자색고구마색소, 포도색소
안토시아닌계 (Anthocyanines)	베리류 색소
칼콘계 (Chalcones)	홍화황색소, 홍화적색소
포르필린계 (Phorphylins)	클로로필, 스피루리나청색소
베타시아닌계 (Betacyanines)	비트레드
디케논계 (Dikenoids)	심황색소 (Tumeric)
기타	치자청색소, 치자적색소, 카라멜 등

#### 다. 천연색소의 단점 및 부작용

- 천연색소는 인공합성색소와는 다르게 안전성이 높아 신뢰성이 있었으나, 일부 천연색소의 부작용으로 인한 알러지 유발과 쇼크 사망 사고가 발생하였으며 , 아동의

ADHD를 발생 시키는 원인으로 안정한 천연 색소의 대체제가 필요함

- 인공색소에 비해 열, 빛, pH 등 다양한 조건하에서 안정성이 떨어짐.
- 인공색소에 비해 사용량이 많으며 균일한 색조를 발현하기에 제한성이 있음.
- 상기한 단점을 보완하고 알러지 저감 천연 색소의 개발이 필요하며, 다양한 기능성 소재와의 융복합체 기술 개발이 절실히 요구되는 상황임.

### 3절 연구개발 범위

#### 1. 알러지 저감효능을 가진 천연색소 및 나노복합물의 대량 생산 및 안전성·안정성 연구 가. 작물(농산물) 유래 알러지 유발 저해 효과를 가지는 천연 색소의 발굴

- 기반 선행 연구를 통해 항알러지 효과와 항염 효과를 가지는 원료 선별
- 소염(자소염), 강황, 지치 (자초)등의 항알러지 효능 검증을 통해 기 확보된 원료 소재 사용
- 원료소재의 수급 가능성, 안전성, 안정성 확보를 위한 나노 기술 도입 및 제품 유형별 적용을 통한 기존상품과의 차별성과 상품성 분석
- 알러지 유발 인자 발현에 대한 검증 및 실험
- 알러지 민감 모델을 통한 알러지 유발 패턴 연구

#### 나. 소염(자소염), 강황, 지치 (자초)의 천연 색소의 추출 수율 최적화, 정제기술 개발

- 최적 추출 공정 개발 : 온도, 시간, 추출 횟수, 열수 및 용매 추출법의 비교를 통한 안토시아닌계열 지표 물질의 함량 비교를 통한 최적 조건 확립
- 분리 정제 기술 개발 :저온 냉각 분리, UF- FILTER, 효소 처리
- 저비용 고효율의 건조 조건의 확립: 분무 건조, 유동층 건조 조건 확립을 통한 수율과 색소 지표 물질의 변화 비교 분석

#### 다 .소염(자소염), 감국(황국화), 지치 (자초)의 천연 색소의 저장 안정성 향상 연구

- 나노 복합체의 형성: 안토시아닌과 다당류의 수상에서의 혼합을 통해 charge-complex를 이용한 복합체 형성
- 소염(자소염), 감국(황국화), 지치 (자초) 원료 별 적합한 다당류의 선별
- pH, 열, 광 등 저장 안정성 확립: 안토시아닌은 pH, 열, 광에 매우 불안정한 색소로서 구조에 따라 색이 변함. 따라서 나노복합체와 안토시아닌을 다양한 pH, 온도의 용액에 넣거나 용액에 다양한 빛을 시간별로 조사하였을 때의 색을 비교함으로써 안토시아닌의 구조적 안정성을 비교함

#### 라.대량 생산 공정 확립

- 천연 색소의 대량 생산을 위한 추출 및 분리 정제, 건조 제조 공정 확립
- 나노 복합체 형성 대량 공정 확립 : 천연 색소 가루와 음전하성 다당류를 각각 수상에 균질화하며, 보관, 온도 시간에 따른 나노 복합체 형성 최적화 조건 확립
- 2차 건조를 통한 천연 색소 나노 복합체 형성 확인

- 생산 농가 및 관련업체와의 B2B전략적 구매 협약 MOU 체결

## 2. 알러지 저감효능을 가진 천연색소 및 나노복합물의 산업화

### 가. 소엽(자소엽), 감국(황국화), 지치(자초)의 나노 천연 색소의 가공 적성을 통한 제품 적용성 연구

- 개발 색소를 병과류, 음료류, 제과 및 제빵에 적용하여 나노 기술을 첨가와 미첨가 간의 열, Ph,빛에 대한 안정성확인 (3개의 제품군에서 각 1종 선정)
- 안전성 평가 : 개발된 나노 천연 색소의 4주 반복 독성 검증 평가

### 나. 고부가가치 가치 식품, 식품 첨가물등의 소재에 적합한 시제품 개발 및 제품화

- 코치닐 대용 붉은색소, 치자 황색소 대체용 황색 색소 , 안토시아닌 계열 색소 각 1종
- 이미, 이취가 제거된 기능성 분말
- 개발된 천연 색소의 생리 활성 연구(총 폴리페놀, DPPH 등)
- 천연 색소 나노 복합체의 겔이나 액상 타입의 제형 개발
- 시제품 개발 3건, 천연 색소 품목신고 2건

### 다. 적용성 검증 및 저장 안정성 평가 미흡점 보완 연구

- 천연 색소의 가열, 저장 온도, 저장기간에 대한 안정성 평가를 통해 제품 적용성이 낮을 경우 색소의 나노 콤플렉스 제조 시 사용된 폴리사카라이드 다당류의 종류를 변경하여 보완 실험 실시 예정



## 2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 1절. 천연 색소 및 인공 색소의 부작용에 대한 국내외 연구 및 개발 현황

#### 1. 인공 색소와 천연 색소의 부작용 사례 연구

- 국내 천연 색소는 코치닐 추출색소나 치자 색소, 락색소 등이 대부분의 시장을 차지하고 있다. 특히 천연 색소에 사용하는 대부분이 열대 지방에서 생산되고 있어 대부분 수입에 의존 하고 있는 실정이다. 특히 카라멜 색소 , 파프리카추출색소, 치자 황색소 등이 대량 수입되고 있다
- 코치닐 색소는 선인장에서 발견되는 연지벌레 암컷의 몸통에서 나오는 빨간색 착색 물질을 원료로 만들어 지는 천연 색소 이다. 그러나 이러한 색소를 추출하기 위한 공정 과정 중 연지 벌레의 단백질 성분까지 추출되어 이 단백질 성분에 의한 알레르기 반응이 있는 경우 쇼크나 극심한 알러지 반응을 일으킨다. WHO 에서는 코치닐 색소를 “알레르기 유발 의심 물질” 로 공포하였으며, 일본 등에서는 사용 금지 색소이다.



그림2 . 코치닐 색소의 부작용 사례 예

- 식용 색소 중 적색 40호는 주로 애완동물 식품, 소시지, 칩스, 탄산음료등에 사용 되며 각종 암과 ADHD, 심한 알러지, 천식, 편두통 유발 물질로 유럽에서는 사용을 금지 하고 있음
- 적색 3호는 감상선암 유발 물질로 미국 FDA에 의해 사용이 이부 금지 되었으나, 푸르트나 껌제품에 사용되기도 한다.
- 황색 5호는 콜타르에서 얻은 제품으로 사탕과 씨리얼등 여러가공 식품에 사용되고 있다. 특히 이 색소로 인한 알러지는 가벼운 소화불량에서 심한우울증까지 다양하며, 약 36만명의 미국인이 이 색소를 섭취 후 부작용을 나타내는 것으로 추정 됨 .
- 황색 6호는 ADHA, 음식 알러지 암과 관련이 있으며 유럽국가에서는 사용이 금지 되었다.
- 이러한 인공 황색 색소와 적색 색소를 대체하기 위하여 사용되는 천연 색소인 코치닐과 치자 색소 역시 알러지 유발물질로 일본과 유럽 등지에서 사용이 금지 되어 있다.
- “Cocktail Effect” 란 독성이 있거나 혹은 잠재적으로 독성이 있는 물질이 혼합 되었을 때 나타나는 효과로 하나의 활성 물질이 다른 혼합물에 영향을 주어 더 민감한 물질로

만드는 것이다.

특히 사람이 섭취하는 한가지 음식에는 여러 가지 화학물질이 포함되어 있을 수 있다. 색소는 식품등의 색을 나타내기 위하여 사용 되는 식품 첨가물로 다른 보존제 등과 혼합되면서 “Cocktail Effect” 로 부작용을 나타내는 경우가 발생 하고 있다

## 2. 알러지 유발 저감 천연색소 개발의 기술적 배경

- 식품 및 의약품 산업에서 여전히 사용되고 있는 인공색소(타르색소)대한 유해성 논란이 가중되면서 천연색소로의 전환이 가속화되고 있으며, 최근에는 여러 정부부처가 지원하여 산학연을 중심으로 기초연구, 산업화 활동이 추진되고 있음.
- 일부 천연 색소 물질 이 치자와 코치닐 등에서 부작용이 발생하여 대체제의 개발이 시급한 실정.
- 특히 적색과 황색의 경우 인공 색소에서도 심한 알러지와 부작용이 발생하여 금지되거나, 이를 대체하기 위하여 대체 천연 색소로 코치닐색소와 치자 황색소가 각광을 받아 왔으나 이 또한 부작용이 발생하여 대체 원료의 발굴과 안정성 확보를 위한 공정 개발 기술이 필요한 실정이다.
- 천연색소의 국산화를 위하여 대형 프로젝트 및 여러 지원 사업 등으로 국내에서 생산하는 작물들을 소재로 하여 연구개발 사업이 진행되고 있음에도 불구하고 실제 사업화까지 이뤄진 경우는 극소수이며, 이 또한 수입 작물과의 가격경쟁력 때문에 시장에서 호응을 얻고 있지 못하고 있는 실정임.
- 국내에서 천연색소를 제조 및 공급하고 있는 대부분의 업체들은 추출, 생산과 관련된 원천기술을 보유하고 있지 않은 상태이며, 가격적인 측면만을 고려하여 원료를 수입한 후 혼합 및 희석한 제품을 제조·공급하고 있음.
- 천연 색소를 추출하는 가공 공정 기술 개발을 통해 알러지 유발 물질을 정제하며 안정화 시킬수 있는 국내 공정 기술 개발이 부족한 상황임.

## 3. 천연 색소의 저장 안정성 기술 개발의 필요 및 기존 기술과의 차별성

- 천연 색소의 경우 열, 빛, Ph 등에 대한 안정성과 저장 기간이 길어 질수록 저장 안정성이 급격히 떨어지는 단점을 지니고 있다.
- 안토시아닌 계열의 적색을 나타내는 천연 색소는 Ph 에 따라 다양한 색을 장점을 가지고 있는 반면 안정성이 매우 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 안토시아닌의 안정화를 위하여 다양한 당류 나 산도 조절제 , copigments 로 알려진 방향족 페놀산류인 tannic acid 등을 처리하는 기술이 개발 되어 있다.
- 산도 조절제는 구연산(식품에 상큼한 맛을 주시 위해 사용하는 산미료로 과일맛 사탕이나 음료에 필수적으로 사용된다. 특히 천연에서 추출한 색소의 안정성 확보를 위해 사용하는 경우가 많다. 인산염은 주로 육가공류나 맛살등에 사용하며 이 화합물은 체내에서 미네랄 흡수를 교란한다는 보고가 있다.

이러한 산도 조절제는 대략 55여 종류의 화학 물질을 가지고 있다.

- 본 기술에서는 이러한 산도 조절제를 사용하지 않고 안토시아닌계열의 색소를 안정화시키는 기술 개발의 필요성을 인지, 생체 적합성을 가지는 음전하성 다당류를 이용한 안토시아닌 색소 복합체와 이를 통해 안토시아닌의 수화에 의한 분해를 방지하며 PH에 의한 안토시아닌의 구저적 안정성을 증진하는 천연 색소를 개발 하여 저장 안정성을 향상 시키려고 한다.
- 이러한 농산물을 이용한 천연 식용 색소의 시장이 9억 8천만 달러 인 점을 고려하였을 때, 나노 기술을 이용한 천연 색소 개발은 국가 농업 분야 경쟁력 강화를 위해 개발될 필요성이 있다.

## 2절. 천연 색소 및 인공 색소의 부작용에 대한 국내외 시장현황

### 1. 美 천연색소, 천연 향 등 천연재료 열풍

▶ 네슬레(Nestle), 초콜릿 제품에 인공감미료와 식용색소 미사용 계획 발표

- 최근 네슬레USA는 미국에 판매되는 초콜릿 제품에 인공감미료와 식용색소를 사용하지 않을 것으로 발표함.
- 2015년 중순부터 250여개 초콜릿 제품에 사용되던 식용색소 적색40과 황색5를 아키오테(Achiote) 나무 씨앗인 아나도(Annatto)에서 추출한 천연색소로 대체, 인공 바닐라향은 천연 바닐라로 대체할 계획임.
- 현재 사용하고 있는 인공색소 및 향은 FDA에서 승인된 재료이지만, Nil소비자 조사에 따르면 60% 이상의 소비자들이 제품 구매 시 인공색소 및 향을 첨가한 식품을 꺼리는 것으로 나타남.
- 'No Artificial Flavors or Colors(인공색소/향 무첨가)'을 통해 차별화된 고품격 제품으로 초콜릿 시장을 공략할 전망
- 미국 최대 초콜릿 기업인 허쉬(Hershey)도 천연재료 사용 계획
- 허쉬는 주요 초콜릿 제품인 'Kisses'에 인공 바닐라, GMO 콩 레시틴, 인공설탕 등의 재료를 천연 바닐라, Non-GMO 콩 레시틴, 천연 설탕을 사용할 것이라고 발표
- 이미 허쉬 Kisses, Milk 초콜릿 바(1.55oz)는 클루텐 프리 및 콘시럽 함량이 적은 제품을 판매 중. 앞으로 인공 바닐라와 유화제를 사용하지 않고, 인공 성장 호르몬(rBST)을 안맞은 젖소에서 짜낸 우유와 천연 바닐라를 사용해 제품을 생산할 전망이다.



그림3. 판매 중인 글루텐 프리(Gluten Free) 허쉬 초콜릿 바

자료원: KOTRA 달라스 무역관

▶ 시장 현황

○ 2014년 204억 달러의 초콜릿 시장규모

- 시장 전문 조사기관 유로모니터(Euromonitor)에 따르면, 2014년 미국 초콜릿 시장규모는 204억 달러
- 허쉬(Hershey)는 초콜릿 시장의 44.2%를 차지하고 있으며, M &M 초콜릿으로 유명한 리글리 (Mars/Wrigley)는 29.5%, 네슬레(Nestle)는 5.8%를 차지하고 있음.

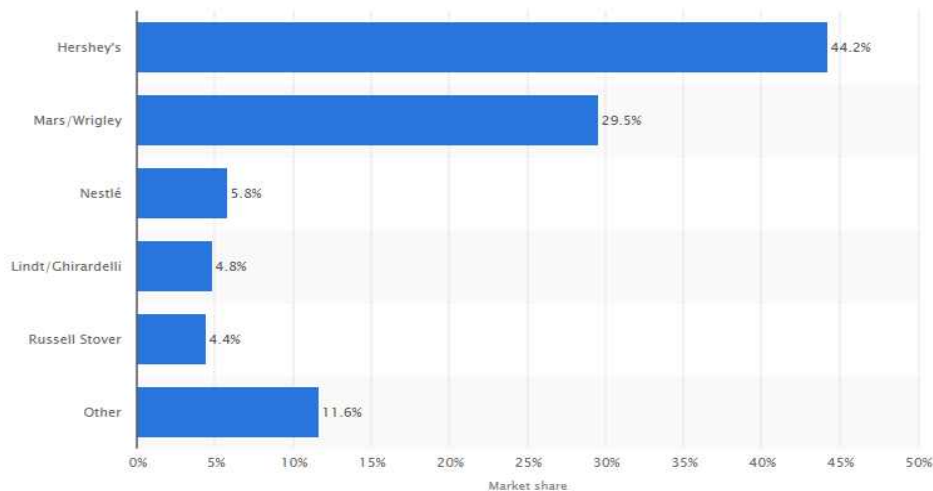


그림4. 미국 초콜릿시장 기업별 점유율

자료원: Statista

▶ 소비자 동향

○ 미국 소비자들 제품 구매 시 인공색소 및 향을 중요하게 고려함.

- Global Health and Wellness Report에 따르면, 최근 미 소비자의 인공색소 및 향이 과잉 행동에 영향을 미치는 것으로 생각함.

○ 간단한 재료와 가공되지 않는 깨끗한 제품을 선호

- 시장조사 전문 기관인 NPD Group의 따르면, 최근 소비자들은 진짜(real)와 자연(natural) 식품을 선호하는 것으로 나타남.

- 이는 소비자들의 식품에 대한 선호도가 무지방(fat-free), 저염(low sodium)에서 고섬유질 (High fiber), 오메가3(Omega-3), 최근 가공되지 않은 진짜 (real), 자연(natural) 제품으로 변화하고 있음.

○ 60% 소비자 '천연(Natural)' 라벨을 선호

- Consumer Reports National Research Center에 따르면, 60%의 미 소비자들은 '천연 (Natural)' 라벨 표시가 있는 제품을 선호하며, 이들 제품에 인공 성분, 살충제 및 GMO가 없는 것으로 간주한다고 함.

- 또한, 80% 이상의 소비자가 가격이 비싼 프리미엄(Premium) 제품에도 건강에 좋다면 기꺼이 구입할 수 있다는 의견을 표시함.



그림5. 주요 유통시장 전시 제품

자료원: KOTRA 달라스 무역관

▶ 수입시장 동향

○ 2014년 미국 초콜릿 및 코코아를 함유한 기타 조제식품 수입 규모는 22억7654만 달러로 전년 대비 7.18%로 성장

- 미국의 주요 수입국은 캐나다, 멕시코, 독일. 캐나다로부터 전년 대비 14.10% 성장한 11억 5457만 달러를 수입, 멕시코로 전년 대비 6.74% 감소한 4억5224만 달러, 독일로 3.35% 증가한 1억5601만 달러를 수입함.

- 우리나라로부터 전년 대비 261.22% 증가한 25만 달러를 수입했으며, 중국으로 31.36% 증가한 647만 달러, 일본으로 35.54% 증가한 439만 달러를 수입함.

(단위: 천 달러, %)

순위	국가	금액			점유율			증감률
		2012	2013	2014	2012	2013	2014	
0	전체	2,032,483	2,123,946	2,276,542	100	100	100	7.18
1	캐나다	961,630	1,011,923	1,154,571	47.31	47.64	50.72	14.10
2	멕시코	499,416	484,942	452,248	24.57	22.83	19.87	-6.74
3	독일	132,238	150,967	156,019	6.51	7.11	6.85	3.35
4	벨기에	118,203	121,190	127,829	5.82	5.71	5.62	5.48
5	스위스	49,919	56,214	60,407	2.46	2.65	2.65	7.46
6	프랑스	35,315	38,177	44,206	1.74	1.80	1.94	15.79
7	이탈리아	31,540	41,389	41,285	1.55	1.95	1.81	-0.25
8	아일랜드	29,590	29,204	37,163	1.46	1.37	1.63	27.25
9	폴란드	22,256	27,578	28,459	1.10	1.30	1.25	3.19
19	중국	5,269	4,927	6,472	0.26	0.23	0.28	31.36
21	일본	2,845	3,243	4,396	0.14	0.15	0.19	35.54
57	한국	226	69	250	0.01	0.00	0.01	261.22

자료원: World Trade Atlas

표2. 미국 초콜릿 주요 수입국 현황(HS Code 1806 기준)

▶ 바이어 인터뷰 및 시사점

○ 천연(Natural), 유기농(Organic) 제품에 관심을 보임.

- 대형 유통 업체인 'K' 관계자에 따르면, 최근 소비자들이 유기농 식품에 대한 구입이 증가할 뿐만 아니라 천연재료에 대한 관심이 증가해 제품 구매 시 라벨을 확인하는 소비자들이 증가하고 있다고 전함.

- 또한, 기업 자체 유기농(Organic) 브랜드가 타제품에 비해 가격 경쟁력이 우수해서 소비자들이 선호하고 있으며, 과자·아이스크림 등에도 천연재료 사용 비율을 높일 전망

○ 주요 유통마켓, 천연(Natural), 유기농(Organic) 제품 주요 위치에 배치

- 주요 유통마켓인 'K', 'T' 등은 천연(Natural), 유기농(Organic), 인공재료 무첨가(No Artificial) 제품 등을 소비자들이 쉽게 볼 수 있는 위치에 전시하고 있음.

○ 한국 초콜릿 제품의 전년 대비 261.22% 수출 증가는 미국 소비자들이 한국 초콜릿 및 코코아가 함유된 한국 제품에 대한 관심이 증가를 보여줌. 이에 따라 한국 기업도 미 소비자들이 선호하는 천연재료를 사용한 제품 생산에 주목할 필요가 있음.

○ 현재 대부분의 한국 초콜릿 관련 제품들은 한인 및 아시안시장에서 판매되며, 마켓 관계자에 따르면 아시안 마켓을 찾는 미 소비자들은 한국 초콜릿 제품에 만족하고 있다고 함.

- 관계자에 따르면, 미국 내 아시아 인구가 증가 추세를 보이고 있어 일부 대형 마켓에서는 아시아 제품에 대한 관심을 보이고 있다고 함. 따라서 한국 기업이 천연재료를 사용한 프리미엄 제품으로 미국 시장을 공략할 수 있는 좋은 기회가 될 전망

### 3장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호                      D-05

#### 1절. 연구개발 의 목표 및 연구개발 수행 내용

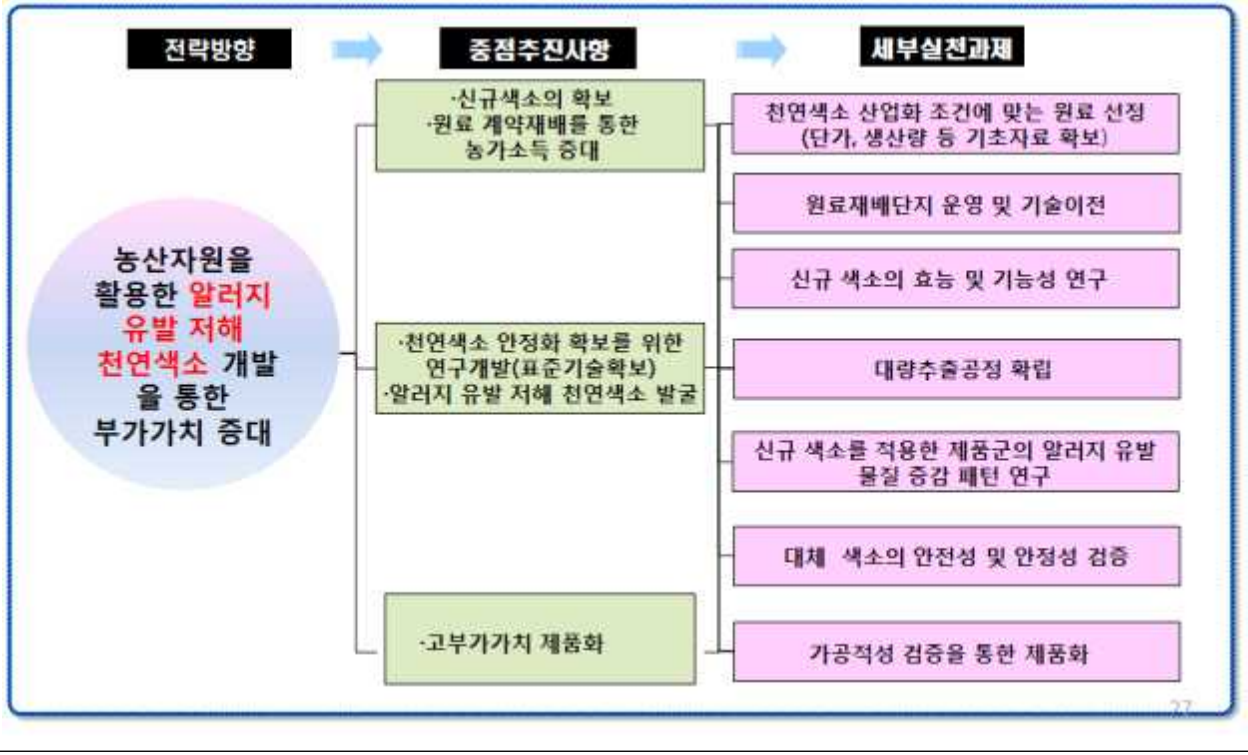
##### 1. 연차별 연구개발 목표 및 연구개발 수행 내용

구분	연도	연구개발의 목표		달성도	연구개발의 내용
1 차 년 도	알러지 저감 천연색소의 발굴 및 나노 콤플렉스 제조	알러지 저감 천연색소의 선정과 기능성 및 지표물질 함량 변화	알러지 저감 천연 색소 원료의 선정 및 추출조건 확립	100%	○ 자소엽 자초, 감국, 강황의 추출 조건에 따른 색상의 변화 비교 -최적 추출 조건 확립 -추출 조건에 따른 색가 비교
			신규 색소의 기능성 연구 및 색소 지표 물질 분석	100%	○ 저장에 온도와 시간에 따른 안토시아닌 지표 성분의 함량 변화 비교
		천연 색소의 나노 복합체 제조 및 안정성 유무 확인	신규 색소의 알러지 유발 유무 확인	100%	○ 알러지 저감 효과 검증 -Histamon assay, Elisa Assay
			천연 색소의 나노 복합체 제조	100%	○ 자소엽, 자초 의 안토시아닌과 양전하성 다당류인 키토산과의 복합체 형성
	알러지 물질이 저감화된 천연색소의 대량생산 공정 확립 및 표준화	대량생산 공정 확립을 위한 추출 조건 확립	대량 생산 추출 조건 개발	100%	○ 천연색소의 원료 선별 및 추출공정 개발 - 자소엽, 자초(자근), 강황을 이용한 최적 추출공정개발 - 추출온도, 추출시간 색상변화 확인
			최적화 추출 공정 개발	100%	○ 대량생산을 위한 공정 개발 -최적화 추출용매 배합비율 선정 -추출 최적시간 설정 -추출 최적온도 설정
		효율 및 안정성을 고려한 천연색소 대량 생산 기반 기술 개발	저장안정성 향상 확인	100%	○ 약용작물 유래 천연색소의 저장안정성향상연구 -산도조절제와 유기용매법을 활용한 추출을 통한 추출효율 및 안정성 향상 - 농축공정 안정성 기술적용 테스트
			나노 복합체 색소의 효능, 안정성 확인	100%	○ 천연색소와 나노복합체 색소의 알러지 유발패턴 비교실험
			안토시아닌 나노 복합체 색소의 안전성 확보	100%	○ 천연색소의 알러지 저감효과 검증
			및 시제품 개발	100%	○ 색소의 섭취 안전성 평가 확인 - 단회투여 독성시험



물의 시제품 개발과 산업화		신규 천연 색소를 활용한 코치닐 및 치자 황색소 대체 소재 산업화 및 시제품 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2주 반복 독성(DRF)</li> <li>○ 천연색소의 제품 적용 테스트 및 시제품 개발</li> <li>- 천연색소 적용 비타민류 시제품 개발 및 산업화 생산</li> <li>- 어린이용 음료 : 천연색소 첨가 음료 시제품 개발</li> <li>- 천연 색소가 첨가된 컵면·면류 시제품 개발</li> <li>- 천연색소가 첨가된 아이스크림 시제품 개발</li> </ul>
	나노복합물 대량생산 최적 공정 확립	효율 및 안정성을 고려한 대량 생산 기반 기술 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 알러지 물질 저감효과를 지닌 천연색소 발굴 대량생산최적화(자소염, 강황)</li> <li>○ 나노복합물을 활용한 천연색소 나노컴플렉스 대량 공정확립</li> </ul>
		나노 복합물을 활용한 과립분말 형태다양화	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유동층과립분말기를 활용한 제형화</li> <li>- 슈가seed 활용 과립제형 생산</li> </ul>
	산업화 적용 테스트	천연색소의 제품 적용 테스트 및 제품 적용	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ B2B 전략을 통한 색소 첨가물 산업화</li> <li>○ 제품원가 산정</li> <li>○ 천연색소 분말의 식품 품목 신고 및 허가</li> <li>○ 관능평가</li> </ul>

2. 추진전략 · 방법 및 추진체계





## 가. 연구 추진 전략

### (1) 1세부 기관 : (주)케미메디

#### (가) 추진 전략 및 방법

##### ▶ 약용작물 유래 신규 천연 색소의 발굴 및 기능성 소재와의 융복합체 개발

- 1) 신규 색소의 항알러지 기능성 분석과 색가, 고수율을 가지는 천연 색소 선정
- 2) 색소의 용매 추출 최적화, chromatography를 이용한 색소 성분 분리 및 정제
- 3) 색소 기능성 연구 (항염증, 항산화, 알레르기 유발검토 등)
  - 대식세포를 활용한 항염 활성 검토 및 독성 실험

##### ▶ 기능성 나노소재의 특성 및 활성분석

#### 1)알러지 저감 신규 나노 천연 색소의 기능성 검증

- 자소엽, 자초, 강황 색소 성분의 항알러지 효과와 나노복합체의 항알러지 효과 검증
  - 천연 색소에 대한 항 알러지 효과를 알러지 효력 시험 가이드 라인을 기준으로 하여 식이유도모델을 통해 알러지 유발 민감 상태를 만든 후 천연 색소 투여 반응 검토
  - 오발부민(OVA)에 의해 유발된 알레르기모델
  - 비만세포에 의해 매개된 알레르기질환 모델

; 비만 세포는 피부, 호흡기, 림프관주위, 혈관주위, 위장관의점막, 뇌 등 전신의 장기에 분포하고있으며, 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다. 비만세포로부터 히스타민의 유리는 즉시형알레르기반응의 병리학적 진행 과정에서 필수적인 단계인데, 비만 세포 표면에 존재하는 IgE 수용체인 FcεRI에 항원이 결합하여 유발되는 비만 세포 활성화에 의해 히스타민이 유리된다.

즉, 비만세포가 활성화 되면 비만세포는 탈과립 되어 히스타민이 유리되고 이어서 아라키돈산 대사 물질과 염증 반응을 유발 하는 다양한 cytokine이 분비 된다. 비만세포에서 분비되는 다양한 화학 매개 물질 중 히스타민은 즉시형 과민성 면역반응을 유발 하는 가장 강력한 생리활성 물질이며, 아라키돈산 대사물질 및 leukotrienes는 히스타민보다 한단계 늦게 합성되지만 작용은 히스타민보다 강력하고 오래 지속되어 만성염증 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다.

#### ○ 기능성 나노 소재의 안전성 테스트

-천연 색소 적용 제품군의 알러지 민감 모델 제작을 통한 패턴 연구

; 알러지 민감 계층 동물 실험 모델을 설정하여 4주 반복 투여 후 알러지 유발 관능 관찰 실시

; 일정 기간이 지난 후 관찰을 통한 비교 기존 물질과의 제품 적용성 검증 실시

#### ○ 나노 복합체 천연색소의 세포 독성 평가

- 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내부에서 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 reductase 반응에 의해 formazan으로 환원되면서 보라색이 나타나는 반응으로, 식품 및 처리 약물에 대한 세포의 생존률을 나타내는 실험임.
- 배양된 primary hepatocytes에 약물을 농도별로 처리하여 CO<sub>2</sub> incubator에 24-48시간 배양함.
- 이후, MTT 용액을 0.5 mg/ml의 농도로 각각 처리한 후 4시간 이상 배양함.

- 배양 후 DMSO 100µl를 첨가하여 formazan을 완전히 용해한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 생존률을 계산한다
- 천연색소와 기능성 용복합체의 비임상 독성 시험
  - 단회 투여 독성과 반복 투여 독성 검사 실시
- 신규 나노 복합체 천연 색소의 제품 적용을 위한 용해도 및 안정성 추가 검증
- 기존의 천연 색소(코치닐 색소, 치자 황색소) 제품과의 비교 분석
  - 제품 적용군에 대한 안정성, 안전성, 색도 등을 비교
  - 알러지 유발 빈도 비교
- 관능평가
  - 관련 업무 종사자 20인을 대상으로 한 관능 평가를 통한 이미(맛) 평가 설문지를 통한 평가.
    - ; 천연 색소의 적용 농도에 따른 이미, 이취, 맛 평가 실시
    - ; 농도를 올려가며 제품 적용 실험진행, 농도에 따른 용해도와 침전물질등의 비교
- 약용작물 천연 색소의 제품 적용 색변화 실험 분석
  - 개발 색소를 빙과류, 음료류, 제과 및 제빵에 적용하여 나노 기술을 첨가와 미첨가 간의 열, Ph, 빛에 대한 안정성 및 색도 변화 확인
  - 적용 농도에 따른 효과 실험 분석 : 농도를 올려가며 실험진행, 농도에 따른 용해도와 침전물질 등의 비교 분석
  - 어린이용 건강식품 및 음료 적용 : 염착력이 우수한 적색계 천연 색소인 코치닐 색소는 최근 알레르기 및 ADHD 유발 가능성이 높은 동물성 천연 색소로서 사용이 기피되고 있으며, 본 제품 적용 실험에서는 음료나 건강식품에 추출한 나노 천연 색소를 사용하여 유사한 염착력을 나타내는 대체제로 적용 가능성 평가
  - 제과 및 제빵 : 신규 색소를 이용하여 황색을 나타내는 안토시아닌 계열의 색소 적용성 확인
- 시제품 개발 2-3종 (음료, 제과 제빵, 캔디 류 중 2종)
- 제품 개발 1건

**(2) 제 1협동 (재)천연 색소 산업화 센터**

**(가) 연구추진전략 및 방법**

**▶ 천연색소 대량생산 공정확립 및 안정성 확보**

연구추진목표	추진전략 및 방법
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량생산 공정확립.</li> <li>- 안정성 확보</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 원료로 선정된 작물을 생산하는 지역농가 및 가공업체와 구매계약을 통해 대량생산을 위한 안정적인 원료 수급을 진행.</li> <li>2. 천연색소의 대량생산을 위한 최적화된 제조공정을 자체적으로 확립.</li> <li>3. 안정성 확보를 위한 자체개발 기술을 통해 최종 제품 생산.</li> <li>4. 최적화 대량 공정의 확립을 위해 나노 입자 개발 기술을 최적화함</li> </ol>



연구추진목표	추진전략 및 방법
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산업화 적용 테스트</li> <li>- 제품 적용시험</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 색가 조절, 안정성 향상, 사용 편의성이 높은 다양한 형태 (분말 및 액상)의 최종 제품을 개발하여 사업화.</li> <li>2. 부형제 첨가와 미처리 간에 천연색소가 적용되는 다양한 제품 (음료, 제과, 제빵, 시럽 등의 가공식품등)에 직접 적용실험을 하여 가능성을 확인하고 관련 시장에 진출할 수 있는 상업적 방안을 모색.</li> </ol>

▶ **제품 적용을 통한 상업화**

- 천연색소를 이용한 고부가가치의 알러지나 아토피에 민감한 어린이용 건강 기능식품 개발을 통한 상품화를 통한 상용화
- 용도에 적합한 다양한 형태 (건강 기능성식품)의 제형화 및 산업화

연구추진목표	추진전략 및 방법
<p>대량생산 확인실험, 안전성검증 및 제품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▫ 개발된 자체 추출분리기술의 대량생산화 적용확인실험</li> <li>▫ 공인인증기관을 통한 안전성검증(잔류농약, 중금속(납, 수은, 카드뮴, 비소 등), 세균검사 등 종합 검증)</li> <li>▫ 식품첨가물 등록</li> <li>▫ 제품화 및 사업화</li> </ul>

▶ **가공적성**

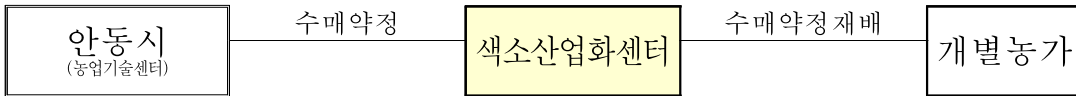
- 열처리 특성은 80~170℃에서 10~60분간 열처리 한 후 다시 용매에 녹여 남은 천연색소 양을 측정 하여 비교함. 또한, 열처리 시 열에 의한 기능성 물질의 안정성 변화 역시 동시적으로 측정 및 비교하여 최적의 열처리 특성을 확립함. pH 영향은 pH 3~7을 가 하여 방치시킨 후 일정시간마다 색 소의 감소량을 분석함. 당류 영향은 pH 2.0 완충용액으로 20배 희석한 표준색소 용액에 glucose, galactose, fructose maltose, sucrose 첨가에 따른 최대흡수파장에서 흡광도 변화량측정. 유기산영향은 pH 완충용액으로 20배 희석한 표준색소액에 citric acid, maleic acid, tartaric acid, acetic acid, succinic acid 첨가에 따른 흡광도 변화량측정. 금속이온영향은 pH 완충용액으로 20배 희석한 표준색소액에 Ca+2(CaCl2), Al+3((Al2(SO4)3), Fe+3(Fe2(SO4)3), Cu+2(CuSO4), Hg+2(HgCl2), Mg+2(MgSO4) 등의 금속염첨가에 따른 흡광도 변화량측정. pH, 유기산, 금속이온 등에 대한 영향은 80~100℃의 가공온도조건에서의 중속변수변화량을 측정함.

▶ **갈변 방지와 이미 이취 관능 개선을 위한 대량 공정 개발**

- 분리 , 정제 기술 도입
  - 약용작물 유래 천연색소의 분리정제기술은 양이온 교환수지(cation exchange resin)를 이용한 solid-phase extraction (SPE) 기술의 최적화공정을 통하여 개발할 것임. 천연색소의 식품소재로써 이미, 이취 등의 관능적 문제점을 파악하고 제거기술을 개발
- 원료의 전처리 기술 개발
  - 효소전처리공정 개발을 통해 갈변 현상을 일으키는 물질 제거

- 관능평가 실시  
천연 색소의 효소 전처리 방법에 따른 이미, 이취, 맛 관능평가 실시

▶ 생산농가와 원료구매 계약 및 상생 협력 방안



○ 원료수매 공급모형

안동시	(재)한국천연색소산업화센터	개별농가
<ol style="list-style-type: none"> <li>경제성 높은 약용작물종자의 농가보급</li> <li>멸종위기/희귀 약용작물종자의 보존 및 개발</li> <li>우수한 종자 증식 기술개발</li> <li>약용작물 종자정보의 DB화</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>대량 생산공정 확립.</li> <li>색가 조절, 안정성 향상, 사용 편의성이 높은 형태(분말 및 액상) 제품 개발</li> <li>천연색소 적용 제품(음료, 제과, 제빵 등)에 상업적 방안을 모색</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>고품질의 원료생산/공급</li> <li>원료생산 고품질 유지</li> <li>계약재배를 통한 고정 판매</li> </ol>

○ 계약재배 및 농가와 직접적인 수매를 통한 대량 매입을 통해 원료 단가 절감 효과 기대

▶ 개발제품의 B2B시장 진입방안 및 상품화 전략

		
<p><b>시장조사</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 대형마트를 대상으로 조사</li> <li>• 코치닐 수출국(외) 카르틴이 표시된 식품 조사</li> </ul>	<p><b>실문 조사</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 가공식품 제조사 대상 설문조사서 작성</li> <li>• 코치닐 수출국(외) 카르틴 사용 여부 조사</li> </ul>	<p><b>식품유형파악</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 코치닐 수출국(외) 카르틴 사용 가공식품 확인</li> <li>• 실제 판매되는 가공식품 확인</li> </ul>

	고객사의 요구사항	공급 기업의 대응 포인트
보수적	<b>신뢰도</b> 1) 공급기업 - 시장에서의 검증과 평판 - 장기적 사업지속성 및 설비 투자 역량 - 지속적 관계를 통한 일관성 - 고객사에 대한 충성도 2) 제품 - 품질이 충분히 검증되고, 원활한 공급이 가능한 제품 선호	- 시장 내 우호적 이미지 구축 - 고객사에 일관적 Value proposition - 명확한 Positioning 전략 : 기술적 제안과 가격 및 물량 제안의 일관성 구축 - 고객사에 대한 헌신도 강화(Commitment) - 전담 조직 구성을 통한 대응 - 사업 인프라(인원 및 간접 설비) 구축을 통한 대응 - 제품에 대한 기본적 요구 조건 충족 - 안정적 성능 구현, 효율적/안정적 생산 시스템
	<b>다부문, 다층적 의사 결정</b> - 직급별 의사결정 단계의 철저한 준수 - 구매, 개발, 품질관리 등 부서간 동등한 결정권 행사	- 다양한 의사 결정 요소별 대응 - 주요 의사 결정권자 직접 대응 - 각 부문별 요구에 맞는 전문적 대응
혁신적	<b>혁신적 기술</b> - 시장을 선점할 수 있는 차별적 기술력	- 시장 변화를 읽을 수 있는 마케팅 역량과 이를 제품으로 구현할 수 있는 기술력 - 장기적 관점의 R&D 자원 투입
	<b>원가 경쟁력</b> - 개별 부품의 초기 제작 단계부터 공급시점까지 Value Chain 관점의 경쟁력 - 추가 핵심 부품의 통합적 구매 가능성	- 총 원가 경쟁력(Total Cost leadership) 구축 - Cost driven process 구축 - 추가 핵심 부품의 공급 능력

1) 생산 제품의 실사용 중심의 유통 및 공급으로 시장진입

- 아이스크림이나 어린이용 제과 제빵등에 적용 가능 하므로 , 프렌차이즈 제과점을 통한 홍보 마케팅 실시
- 인공 감미료를 뺀 ‘Natural 100%, All natural(천연재료 100%, 100% 내추럴)’ 문구 사용으로 천연 재료 사용을 강조하여 소비자에게는 보다 자연과 가까운 맛을 느낄 수 있는 건강한 브랜드라는 이미지를 가지게 하는 프리미엄급 고급 브랜드 아이스크림 제조 업체 등과의 제휴
- 1차적 시장 진입 방안 : 천연 원료를 이용한 유기농 과자나 제빵, 유기농 아이스크림등의 원료로 납품
- 2차 진입 방안 : 식품 공전에 식품 첨가물로 등록 후 식품 첨가물 회사에 납품
- 3차 진입 방안 : 건강 기능 식품등의 원료로 사용 , 건강기능 식품 시장이 매년 증가하는 추세
- 생산제품의 소재화를 단순화
- 제품 제형화를 다양화하여 적용제품에 고객 대응  
 (제품별 적용 제형화는 단순분말 및 액상에서 벗어나 고객의 원하는 제형으로 생산공급 가능하도록 변환하여 시장 진입을 선점 하고자 한다.)

▶ 단계별 B2B 진입 방안

- 1) 1차 소규모 B2B 방안 : 천연 색소나 원료를 사용 하는 제과나 제빵업체, 유기농 음료 판매 업체등으로의 진입

2) B2B 방안 : 대기업이나 MSC 와 같은 식품 첨가물 전문 유통 업체를 통한 진입

### 소규모 1차 진입을 위한 B2B 방안



- 1) 홈메이드 제과업체 : 쿠키모리, 베아킨 스튜디오 등 수제 쿠키 전문점
  - 어린이용 또는 특수 용도의 제과에 적용
- 2) 프렌차이즈 베이커리
  - 제빵에 적용
- 3) 과일음료나 유기농 음료 판매 카페
  - 음료에 적용
- 4) 퓨전 한방 카페
  - 멸류에 적용 가능



### B2B 전략수립 방안



1. 천연첨가물 안정성 제시
2. 저자 대체용떡, 면 첨가물 색소
3. 제과, 면류가공품 등 어린이전용 색소
4. 기능성 식품 전용 색소  
(국내산 약용작물을 이용한 고순도 색소)
5. 유기공품, 음료 저비용 색소  
(저비용 색소는 중국산 원료 사용)



▶ B2B 전략수립방안

1) 식품첨가물(천연색소) 유통판매 업체 기업정보

업체명	업종	매출액	상시 인원	홈페이지
엠에스씨 (MSC)	식품 첨가물 업체, 카라기난, 천연색소, 키토산, 씨즈닝, 향신료 등 생산.	77억*	335명	http://www.msckorea.com/
두미산업	젓갈용색소, 천연식용색소, 식품첨가색소, 치자황색소 등 식품첨가물 제조업체.	34억*	12명	http://www.dobecolor.com/
남영후드넷	식품첨가물 전문 제조업체, 천연 색소, 식품 향료, 조미식품 등 소개, 견적 안내.	39억**	12명	http://www.nyfn.co.kr
에이원카프	식품첨가물 전문업체, 색상별 천연색소, 조합향료, 건강소재, 향신료, 누트리푸드 등 취급	29억*	10명	http://www.aonecaf.com
서도비엔아이	식품 첨가물 제조 전문업체, 인산염, 유화안정제, 천연색소, 함산화제, 보존제 등 안내	50억*	26명	http://www.sdbni.com
롯데식품	식품가공 전문업체, 천연색소, 살균소독제, 식품첨가물, 향료, 초콜릿 등 제품 소개	-	-	http://www.lottefood.co.kr
그린텍21	초임계유체 전문업체, 화장품, 식품, 생활용품 원료, 천연색소, 한방향료 등 제품 소개	9억**	14명	http://www.greent21.com
코시스	식품첨가물 제조업체, 조미용 향료, 한방제 제품, 농축액, 조미식품, 천연색소 취급	100억*	55명	http://www.cosisco.com
삼영화성공업	식품첨가물 제조업체, 향료, 천연색소, 천연조미료, 안정제, 조미식품 등 취급	44억*	29명	http://www.향료.kr
두리종합식품	수입 식품첨가물 제조업체, 식품향료, 천연색소, 농축액, 스파이스, 실험실용기 등 취급	-	-	http://www.doori-food.kr
아진식연	식품첨가물 제조 전문업체, 천연색소, 과즙, 향료, 액기스, 스파이스 등 판매	-	-	http://www.ajinfr.com
내팜	천연 식품첨가물 제조업체, 천연색소, 치자황색소, 파프리카 추출색소 등 취급.	10억*	6명	http://www.nafarmcolor.com
제이스 에프아이	천연색소 제조업체, 식품향료, 유화안정제, 보존료, 조미식품 등 제품 생산 안내.	23억*	16명	http://www.천연색소.kr
삼영식품 원료공업	식품 첨가물, 향료 제조업체, 천연색소, 액기스, 스파이스, 분무건조 등 제품 소개.	19억***	14명	http://www.samyongfood.com
한솔비엔에프	식품첨가물 제조업체, 식품향료, 천연색소, 기능성식품, 향신료, 카테일시럽 등 제품 안내.	19억*	-	http://www.시럽.kr

상기 데이터는 중소기업현황정보시스템의 기업정보 참고. \*: 2007년 기준, \*\*: 2006년, \*\*\*: 2005년 기준.

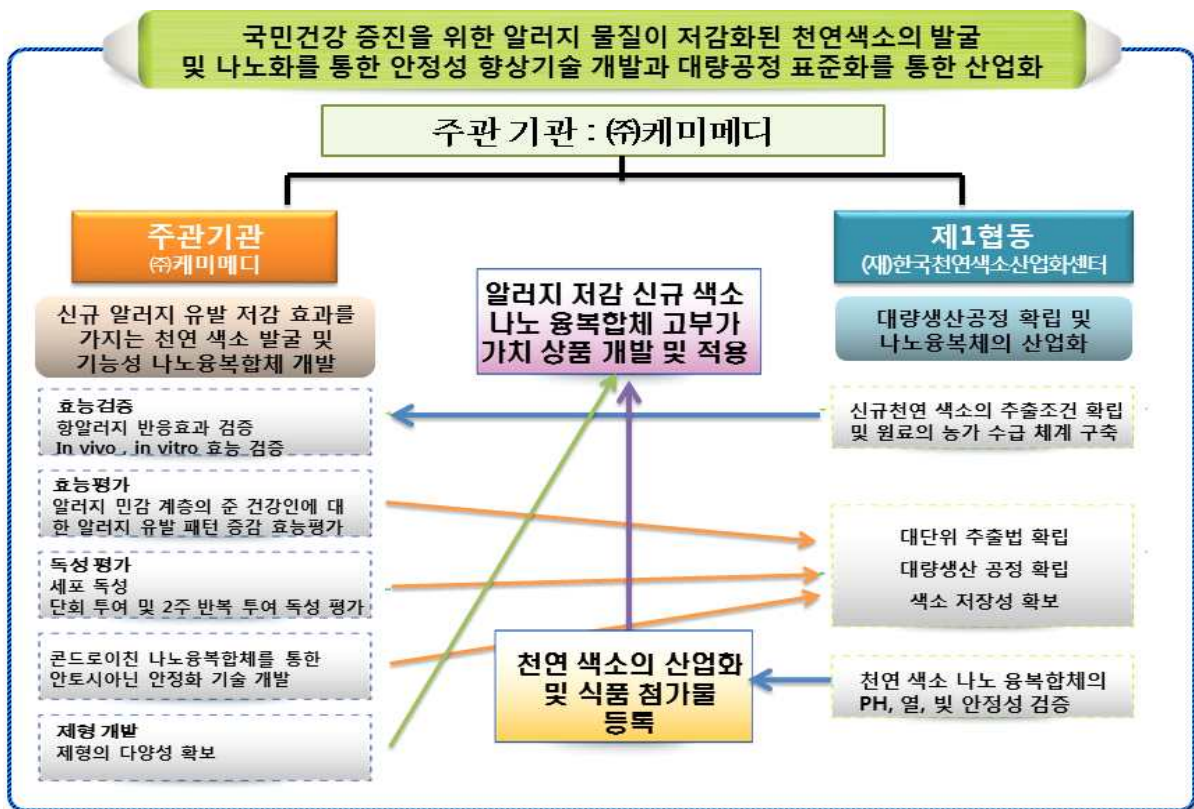
참고자료: 중소기업현황정보시스템, -: 관련정보 없음.

2) 제품화의 성공적인 시장 진입을 위한 상품화 전략:

- ① 1차 진입 : 홈페이지 제과 업체나 제빵 업체에 판매하여 판매 실적 확보 (초기 매출액 약 5천만원 - 1억원 규모), 작은 규모의 유기농, 천연 원료를 사용하는 업체를 통한 마케팅 홍보
- ② 2차 진입: 서도 비엔아이, 엠에스씨와 같은 식품 첨가물 제조 전문회사와 MOU 체결을 통한 맞춤형 제품 개발과 세제품 생산. 이를 통한 판매와 대량 산업화를 통한 천연 색소를 제품화하여 판매 경험이 풍부한 유통 업체로 시장 진입이 비교적 쉬울 것으로 판단됨

- 본사 사업화 지원의 업무영역을 기술개발 지원, 기술사업화 역량강화 지원, 마케팅 지원 부분으로 나눠 구성.
- 기술개발지원 할 수 있는 자회사를 이용하여 제품개발 및 신제품개발 추진
- 마케팅 지원 부분은 성공사례로 이끌었던 기존 제품의 마케팅 경험과 네트워크를 바탕으로 트렌드 및 시장조사를 통해 제품 컨셉의 방향등을 제시하고 영업 및 사업 경험이 있는 전문인력으로 구매 계약 및 해외 런칭등을 통해 제품 판매망 확보
- “알러지 유발 가능성을 낮춘 천연색소“의 특징을 이용하여, 식품첨가물 및 기능성 시장을 타겟으로 하여 사업화 진행 중.
- 트렌드 및 시장조사, 특허맵 분석을 통해 고객에게 감동, 가치 창출을 해줄 수 있는 제품 개발을 위한 로드맵 제시
- 기술개발 단계에 맞춘 IP 창출, R&D 전략을 수립하여 개발된 기술의 원천기술 보호 및 지적재산권 확보.

나. 연구 추진 체계





다. 추진일정

책임자 (소속 기관)	일 련 번 호	연구내용	추진 일정												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
김상욱 [(주)케 미메디]	1 차 년 도	1	알러지 저감 천연색소 선정 및 지표물질 확인	■	■	■	■	■	■	■					
		2	나노궤플렉스 제조				■	■	■	■	■	■	■		
		3	안정성 확인							■	■	■	■	■	■
	2 차 년 도	4	알러지 유발 물질 증감패턴 및 저감효능 확인	■	■	■	■	■	■						
		5	관능 평가										■	■	
		6	안전성 평가	■	■	■	■	■	■	■	■				
		7	제품 적용 및 시제품 제작				■	■	■	■	■	■	■	■	■
김윤희 [재)한 국천연 색소산 업화센 터]	1 차 년 도	1	천연색소 원료 선발 및 최적 추출공정 개발	■	■	■	■	■	■	■					
		2	대량생산위한 공정 확립			■	■	■	■	■	■	■			
		3	저장안정성 향상연구								■	■	■	■	■
	2 차 년 도	4	원료계약재배 및 대량생산원료구매	■											
		5	색소추출농축액 분리 정제 기술 개발	■	■	■	■	■							
		6	색소 부형제 설정 및 배합비율 확립				■	■	■	■	■				
		7	제형다양화 설정(과립,미세분 말, 농축액 등)					■	■	■	■	■			
		8	색소분말 대량생산 최적 조건 확립							■	■	■	■	■	■
		9	색상 안정성 테스트							■	■	■	■	■	■
		10	시제품 적용테스트										■	■	■

라. 연구결과

(1) 알러지 물질 저감 효과를 지니는 천연자원 확보 및 선정

▶ 자소엽 (*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decne)

- 꿀풀과에 속하는 자소엽은 지해평천(止咳平喘) 및 윤장통변(潤腸通便)하는 효능이 있으며 기관지나 천식, 항염증 및 항 알러지에 사용 되고 있음



▶ 자초 (*Lithospermi Radix*)

- 자초는 지치과의 Borraginaceae 에 속하는 다년생 초본인 지치 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb.et Zucc의 뿌리 이다. 자초는 한방 임상에서 주로 피부과 영역의 질환을 치료 하는데 오랜전부터 사용한 약재로 항염증, 항균작용에 대한 연구 결과가 있다. 자초의 비만 세포 탈과립 억제 작용과 혈장 histamine 유리 억제 효능에 대한 보고가 있다.



▶ 강황(*Curcuma aromatica* Salisb)

- 생강목에 속하는 다년생 식물로서 인도를 중심으로 한 열대, 아열대 지역에서 주로 재배되며 줄기와 뿌리를 식용, 약용 등으로 사용된다. 인도·중국·동남아시아 등지에서 많이 재배되며, 우리나라는 전남 진도, 전남 해남, 전북 부안, 경기 시흥, 충남 청양 등지에서 재배되고 있다. 뿌리줄기를 한약재로 사용한다. 맵고 쓴 맛이 나는 황색의 약재로, 통증 완화와 월경불순에 효능이 있다. 인도에서는 타박상이나 염좌에 바르는 약으로 사용되기도 한다.



**(2) 천연 색소의 추출 조건 설정 및 색가 비교 측정**

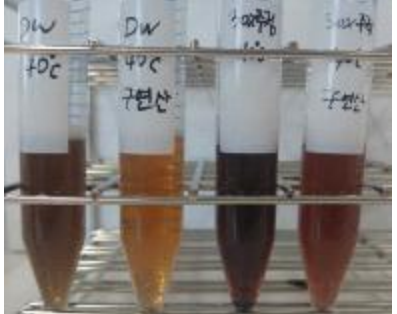
▶ 자소엽의 추출조건 별 색가 확인

○ 자초 추출물의 경우 40도 30% 주정 추출과 열수 추출에서 뚜렷한 붉은 색을 나타내었으나 건조시 산화 작용등에 의해 색이 갈색으로 변색 되었다. 색소 추출물을 다시 물에 용해 시 30% 주정 추출물에 구연산을 첨가한 경우 약간 붉은 색을 나타내었으나 추출 시 나타나는 선명한 붉은 색이 나타 나지 않는 단점이 있다. 나노복합체 형성물의 경우 색도가 그대로 유지되는 것을 확인함

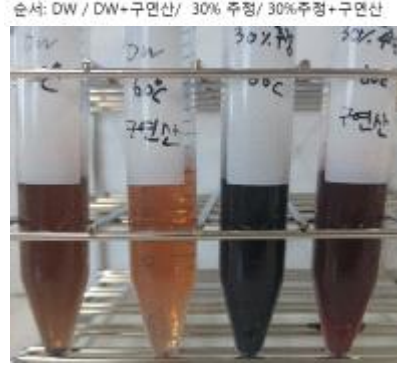
추출 조건	추출물의 색도 비교	추출 건조후의 색도 비교
(40도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출		
(60도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출		
(70도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출		

▶ 자초 추출 분말의 물에 대한 용해 시 색도의 변화 관찰

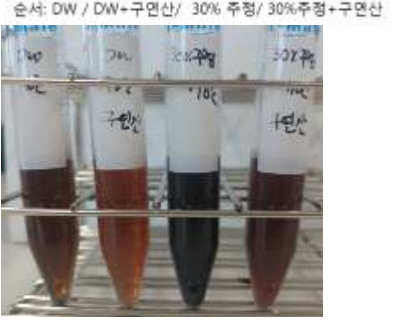
추출 조건	100mg/ml 농도	10mg/ml 농도
(40도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출	순서: DW / DW+구연산/ 30% 주정/ 30%주정+구연산	순서: DW / DW+구연산/ 30% 주정/ 30%주정+구연산



(60도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출



(70도 , 2시간 , 10배수 )열수 추출 및 주정 추출



(키토산 나노 콤플렉스 형성추출 분말의 용해 시 색도변화)

▶ 강황 추출 조건별 색도 확인



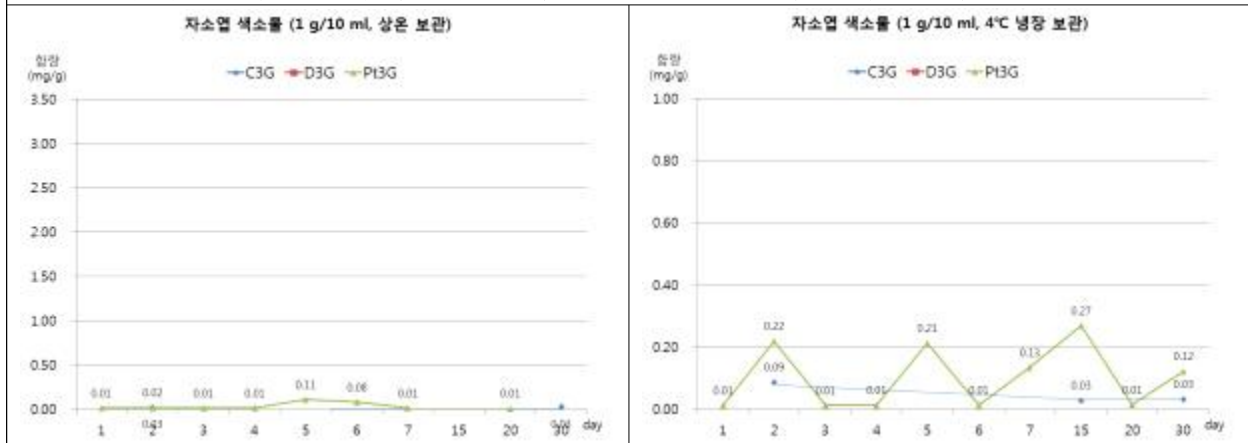
강황 추출물			
	흡광도(440nm)	검체량(g)	색가
열수 추출	0.036	0.2	180
60%주정 추출	0.037	0.04	925
치자황색소	0.039	0.04	975



### (3) 천연 색소 추출물의 온도 및 저장 방법에 따른 안토시아닌 (지표 물질 함량 비교)

자소엽 천연 색소 추출물과 색소 분말의 온도에 따른 저장 기간에 따라 안토시아닌의 함량이 줄어들거나 불안정하게 함량이 나타나는 것을 관찰 하였다 특히 C3G의 경우 30일간 저장 후 급격히 함량이 줄어드는 경향을 나타 내었다. 특히 색소 추출물을 액상 상태로 보관 시 안토시아닌 함량은 천연색소 분말에 비하여 불안정 하게 감소하여 미량을 나타내었다. 거의 안토시아닌이 파괴되어 없는 것으로 경향이 나타 나고 있다. 이러한 문제점을 나노 복합체 형성을 통해 저장 기간에 따른 파괴를 방지하는 기술이 필요 하다고 판단하여 나노 복합체 형성 후 안토시아닌의 함량을 관찰한 결과 안토시아닌의 함량이 그대로 유지됨을 관찰 함

자소엽 추출물(액상상태)의 저장 기간과 저장 온도에 따른 안토시아닌 함량 변화 (1일-30일간 관찰)



### (4) 알러지 저감 효과 검증

#### ▶ 자소엽 색소 분말의 알레르겐에 대한 과민 반응 관찰

○ 시험관 실험

실험물질	실험계	실험방법	결과
자소엽 (30%주정 추출물)	in activated HMC-1 cells	NF-kB/Rel A 및 caspase-1 activation	NF-kB 및 caspase-1 activation (in activated HMC-1)이 EPPF투에 의하여 감소됨

○ 동물 실험 결과

시험 물질	실험동물	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과

자소엽 (물추출물)	male Sprague-Dawley rats(200~300g)	열수추출물(PFAE) : 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 g/kg BW 1hr, 48hr (n=10/group)	compound 48/80-induced systemic allergic reaction, PCA reaction, plasma <b>histamine</b> , anti- DNP IgE에 의한 local allergic reaction, TNF- $\alpha$ production, cAMP level	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PFAE급이(0.05~1g/kg)에 의해 compound 48/80으로 유도된 systemic allergic reaction을 농도 의존적으로 억제 및 혈청 <b>히스타민</b>의 유의적 감소 효과 (p&lt;0.05)</li> <li>- PFAE(0.1, 1g/kg)은 anti-DNP IgE에 의해 활성화되는 국소 알레르기 반응(PCA)을 현저하게 억제(p&lt;0.05)</li> <li>- PFAE는 0.001~1mg/ml의 농도에서 compound 48/80 또는 anti-DNP IgE-유도에 의한 비만세포(RPMC)로부터 <b>히스타민</b> 유리 농도 의존적으로 억제 (p&lt;0.05)</li> <li>- PFAE(0.001과 0.1mg/ml)은 anti-DNP IgE-induced TNF-<math>\alpha</math> 생산을 현저하게 억제 (p&lt;0.05)</li> </ul>
자소엽 (30%추정 추출물)	6주령 male ICR mice (25-30g) 와 7주령 male SD rats (250-300g)	EPPF : 0.01, 0.1, 1 g/kg BW, RA : 4mg/kg 1hr (n=5)	compound 48/80-induced histamine release and systemic anaphylactic reaction, PCA, PMACI-induced TNF- $\alpha$ , IL-6, and VEGF production on HMC-1 cells, IL-4 production from whole spleen cells, IgE production from whole spleen cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EPPF(0.01~1mg/ml)는 투여량에 따라 compound 48/80에 의해 유도되는 <b>히스타민</b> 방출을 억제, 1mg/ml 농도에서 억제율 약74.11% (P&lt;0.05)</li> <li>- EPPF (0.01~1g/kg), RA (4mg/kg)은 비만세포 매개 PCA 반응을 억제(P&lt;0.05)</li> <li>- EPPF(1mg/ml)에서 TNF-<math>\alpha</math>, IL-6와 VEGF 발현의 최대 억제율은 상대적으로 93.66%, 77.20%와 72.72%.(P&lt;0.01)</li> <li>- 비장세포에서 LPS와 IL-4의 동시처리에 의해 EPPF 투여량 의존적으로 <b>IgE</b> 생성량이 억제 (P=0.001)</li> <li>- 결론적으로, EPPF과 그 활성성분인 RA는 생체 내에서 compound 48/80에 의해 유도되는 아나필락시 반응을 억제, 알레르기 반응의 주요 요인인 TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, VEGF, IL-4와 <b>IgE</b>는 EPPF와 RA에 의해 억제</li> </ul>

○ 자소엽의 알러지 민감 반응에 대한 고찰 결과 알러지 발현 물질이 억제 되는 효과를 나타냄

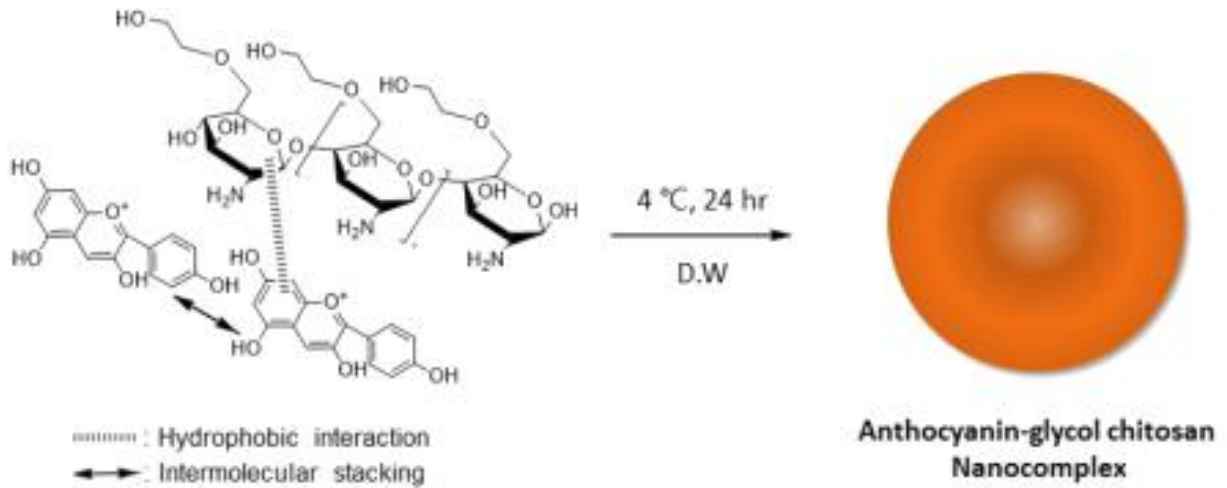
### (5) 안토시아닌을 다량 함유한 자소엽과 자초의 나노 복합체 형성을 통한 안정성 확보

#### ▶ 연구 내용

안토시아닌은 낮은 pH에서 높은 안정성을 가지며, 특히 pH 3 이하에서 가장 높은 안정성과 가장 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있음. 본 연구를 통하여 제조한 안토시아닌-다당류 복합체는 산화안정성 및 저장안정성이 매우 뛰어나기 때문에 약품 또는 식품에 응용 시 가공조건 • 유통과 저장성을 향상시킬 수 있음.

안토시아닌은 생체 내에서 활성이 매우 낮고 불안정한 문제점을 갖고 있음. 이를 개선하기 위하여 생체적합성이 뛰어난 양 전하성 다당류인 키토산을 이용하여 안정화시킴. 안토시아닌이 수상에서 일정 농도 이상이 되면 벤젠 ring이 pi-pi stacking 을 통해 hydrophobicity가 높은 core를 형성함. 글라이콜 키토산 또한 수상에서 나노젤 형태의 입자

를 형성함. 글라이콜 키토산이 수상에서 안토시아닌을 감싸 core-shell 구조를 형성함으로써 안정화 됨.



이 안토시아닌-다당류 복합체는 안토시아닌의 환원에 의한 구조적 변이를 방지할 수 있어 안토시아닌의 색상을 유지할 뿐만 아니라 안정성을 증진시킴. 또한 안토시아닌을 외부환경, 즉 산소·빛·자외선·증발·분자간의 상호작용 등으로부터 보호하여 손실을 줄이고, 반응성이 큰 물질을 격리시킬 수도 있으며, 냄새나 맛 등을 은폐시킬 뿐만 아니라 고형화시켜 취급을 간편하게 하는 등 그 응용성이 다양함. 뿐만 아니라 안토시아닌-다당류 복합체는 안토시아닌의 색도를 오랫동안 높게 유지할 수 있고 안토시아닌의 보관기간을 개선할 수 있음. 다당류 종류로는 녹말, 셀룰로오스, 글리코젠, 키틴, 키토산 등이 있다. 키토산은 동물성 식이 섬유로서 갑각류의 껍질, 곰팡이, 효모, 버섯등의 세포벽에도 존재하고 있다. 이러한 물질들은 우리 몸의 에너지원인 영양소중의 하나이며 대사를 관장하는 물질로서 천연에 존재하는 영양소이다. 저분자 수용성 키토산을 사용하여 체내 흡수도를 증가 시키며 이러한 생적합성 물질을 이용한 융복합 나노 복합체를 형성하여 천연 색소의 물리적특성의 변화 없이 안정성을 향상 시킬수 있다.

▶ **실험 방법**

- 자소엽 추출물과 다당류인 글라이콜 키토산과의 복합체 형성
  - 자소엽에서 추출한 안토시아닌 100mg 을 100ml D.W (deionized water) 에 녹임.
    - 글라이콜 키토산을 D.W에 녹임. 이때 안토시아닌과 글라이콜 키토산의 복합체 형성 비율을 (안토시아닌 : 글라이콜 키토산 (v/v) = 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1) 로 하여 각각 11 mg, 13 mg, 14 mg, 17 mg, 20 mg, 25 mg, 33 mg, 500 mg, 100 mg 을 100ml D.W에 녹임.

- 두 용액을 고르게 교반하고 4 °C에서 24시간 동안 보관하여 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체를 제조함.

- 복합체 크기 분포 확인 : Dynamic Light Scattering (DLS)
- 복합체 형태 확인 : Scanning Electron Microscope (SEM)

- 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체의 안정성 시험

- pH 에서의 안정성 시험

; 글라이콜 키토산과 복합체를 형성하지 않은 안토시아닌과 다양한 비율별로 형성된 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체를 각각 5 mg/ml의 농도로 녹인 후 UV spectrophotometer 를 이용하여 안토시아닌 색소가 활성을 나타내는 파장대인 400-700 nm 에서의 흡광도 값을 비교함.

; pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 의 조건에서 흡광도 값을 비교함.

- 온도에서의 안정성 시험

; 글라이콜 키토산과 복합체를 형성하지 않은 안토시아닌과 다양한 비율별로 형성된 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체를 각각 5 mg/ml의 농도로 녹인 후 UV spectrophotometer 를 이용하여 안토시아닌 색소가 활성을 나타내는 파장대인 400-700 nm 에서의 흡광도 값을 비교함.

; 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C 의 조건에서 흡광도 값을 비교하고, 100 °C에서 10 분, 30 분, 1 시간, 2 시간 별로 흡광도 값을 비교함.

- 광에서의 안정성 시험

; 글라이콜 키토산과 복합체를 형성하지 않은 안토시아닌과 다양한 비율별로 형성된 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체를 각각 5 mg/ml의 농도로 녹인 후 UV spectrophotometer 를 이용하여 안토시아닌 색소가 활성을 나타내는 파장대인 400-700 nm 에서의 흡광도 값을 비교함.

; 시료를 해가 잘 드는 곳에 두어 0일 ,1일, 3일, 5일까지의 광 안정성을 시험함.

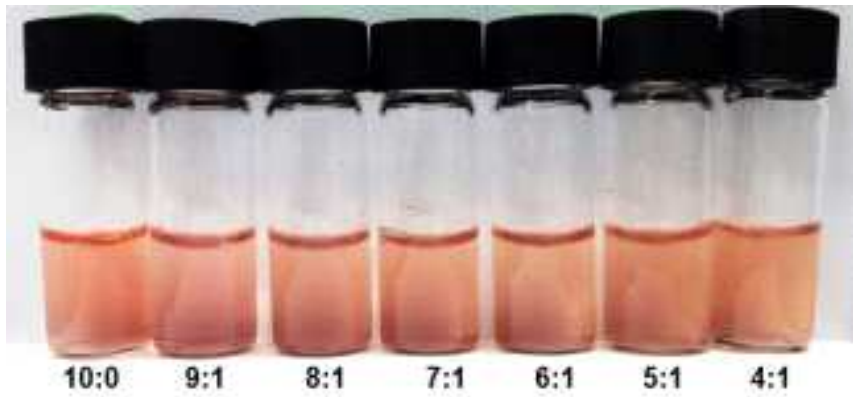
## ▶ 연구 결과 및 고찰

### ○ 결과

- 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 형성 후 색가 확인

- 안토시아닌(10:0)과 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체(Chitosan complex)를 같은 농도(5mg/ml)로 D.W에 녹여 색가를 비교해 보았을 때 붉은색의 색가를 유지하는 것을 눈으로 확인함.





- 안토시아닌이 색상을 나타내는 파장대인 533nm에서(그림7) 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체가 안토시아닌 자체와 같이(10:0) 흡광도 값을 가지는 것을 확인함(그림3). 또한 그림4에서 흡광도 수치 또한 안토시아닌과 같이 복합체에서도 유지되는 것을 확인함.

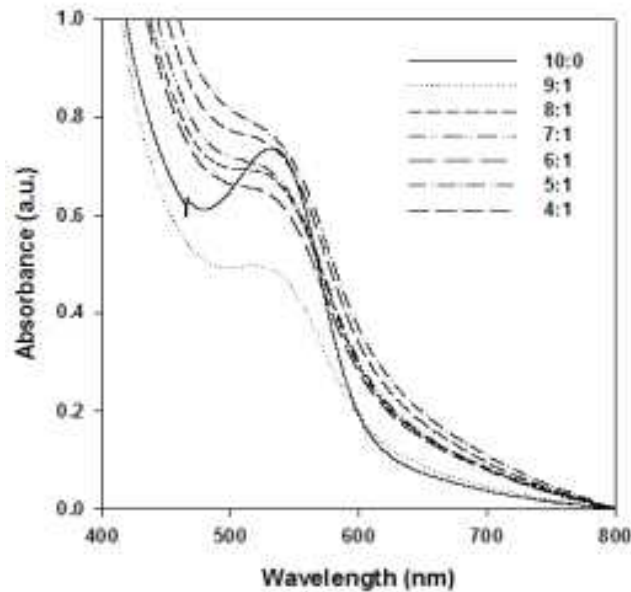
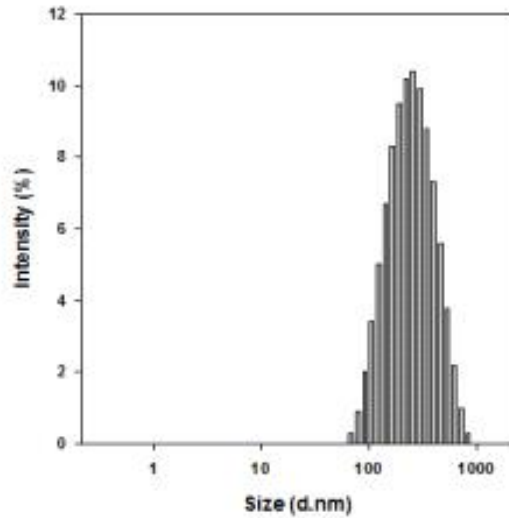


그림 6 복합체의 비율별 흡광도 그래프

Anthocyanin : glycol chitosan	10:0	9:1	8:1	7:1	6:1	5:1	4:1
Absorbance (a.u.)	0.7360	0.4869	0.6750	0.6846	0.6370	0.7608	0.7363

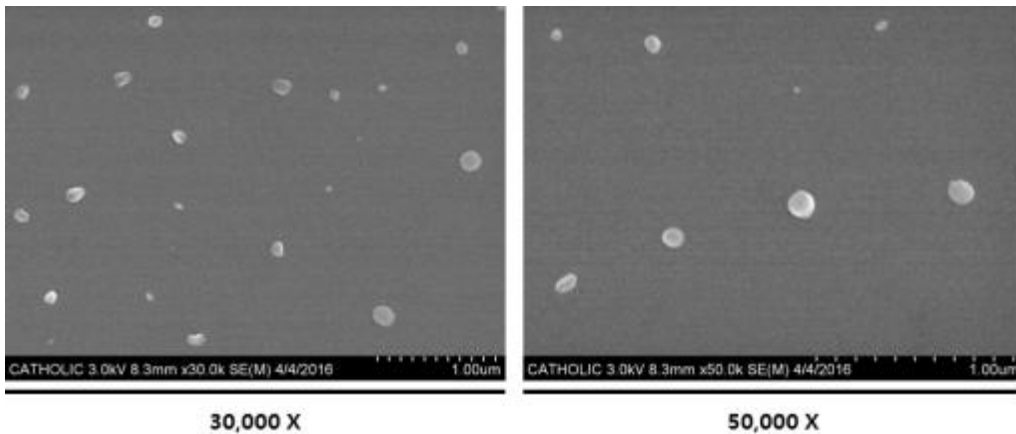
그림 7 안토시아닌(10:0)과 복합체의 533nm 에서의 흡광도 값

- 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 형성 확인
  - 혼합된 가루를 생리식염수에 녹여 생체 내의 조건에서 형성된 복합체의 크기를 확인함. 가루를 5 mg/mL 농도로 녹였을 때 217.2 nm ( $\pm$  4.4 nm) 크기의 입자가 형성된 것을 확인함.



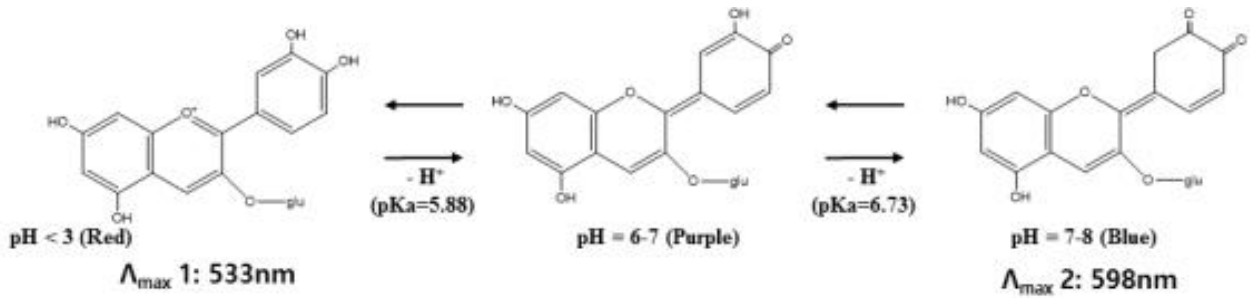
	Size (d.nm)	PDI
5 mg/ml	217.2 ± 4.4	0.355

- 상기와 형성된 복합체의 형태가 구형으로 형성 된 것을 확인함.



- pH 안정성 시험

- 안토시아닌은 pH 에 따라 구조와 최대 흡광도 값이 변하는데(그림7) 붉은 색을 나타내는 구조에서는 최대 흡광도 값이 533nm( $\Lambda_{max1}$ )이고, pH 7-8에서 나타나는 구조에서의 최대 흡광도 값은 598nm( $\Lambda_{max2}$ ) 이다. 따라서 구조에 따른 안정성을  $\Lambda_{max1}/\Lambda_{max2}$  의 비율로 나타냄(그림8).



- 안토시아닌만 있는 경우, 흡광도 값이 pH 5 까지 급격히 떨어지다가 pH 6 부터는 최대 흡광도 값이 이동하는 것을 볼 수 있음(그림9). 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체의 경우, pH 에 따른 최대 흡광도 값의 기울기가 안토시아닌 : 글라이콜 키토산 = 4:1 의 비율(그림 10)에서 가장 완만한 것으로 보아 pH 에서의 안정성을 확보함. 또한 기존 안토시아닌은 최대 흡광도 값이 이동한 것에 비해 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체는 최대 흡광도 값이 이동하지 않은 것을 확인함

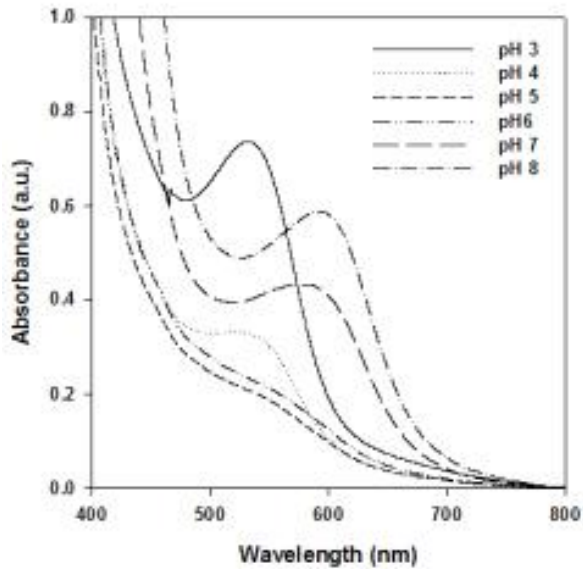


그림 8 안토시아닌만 있을 때  
pH 에 따른 흡광도

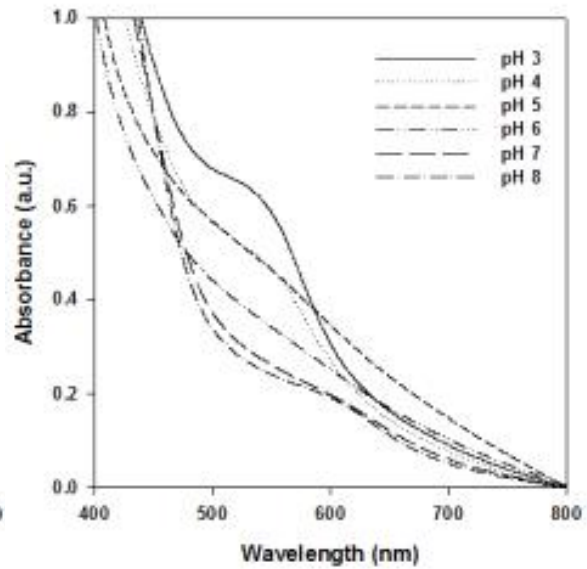


그림 9 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 4 : 1 복합체의 pH에 따른 흡광도

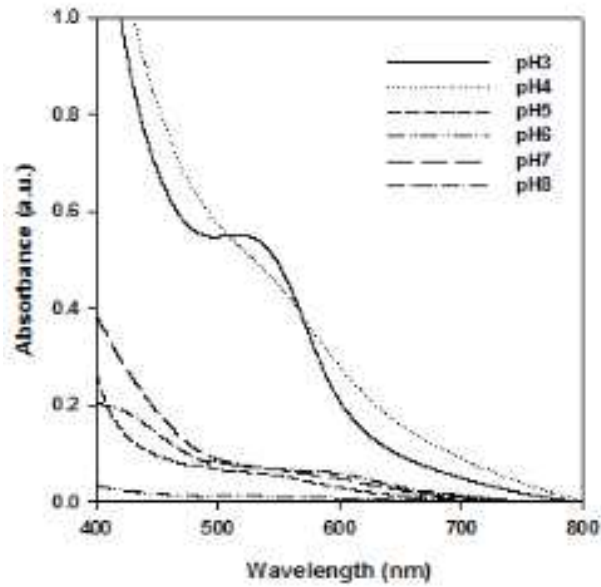


그림 10 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 9:1 복합체의 pH에 따른 흡광도

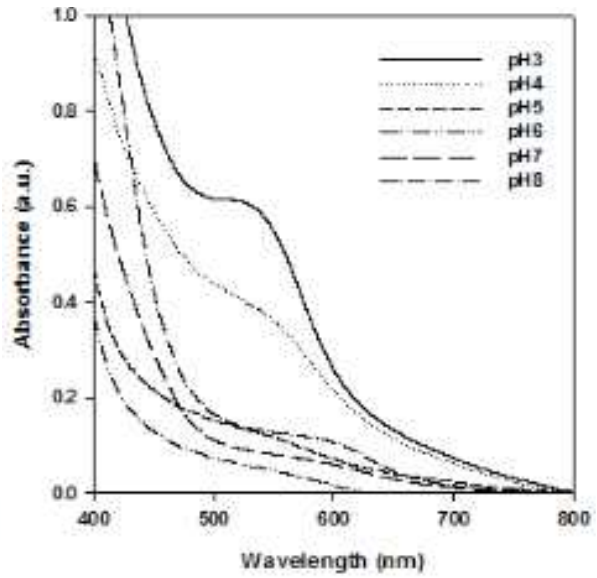


그림 11 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 8:1 복합체의 pH에 따른 흡광도

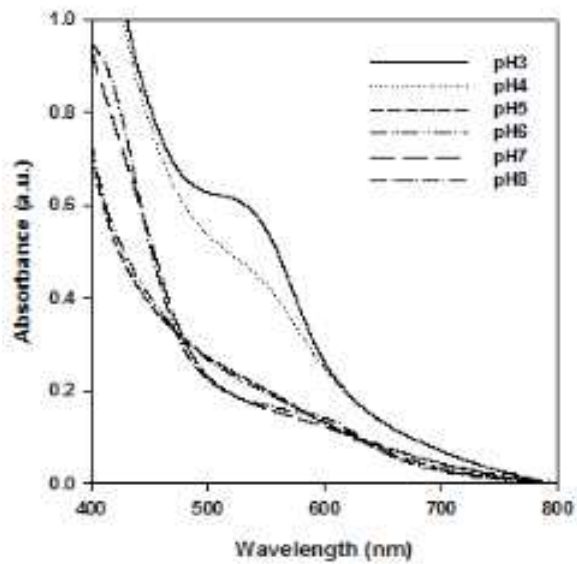


그림 12 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 7:1 복합체의 pH에 따른 흡광도

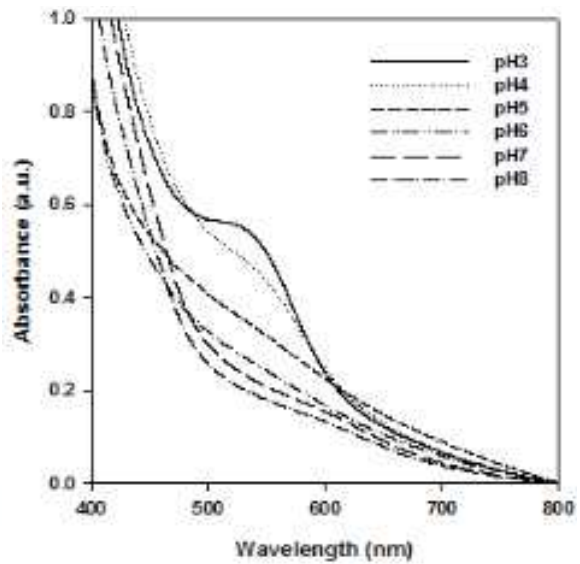


그림 13 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 6:1 복합체의 pH에 따른 흡광도

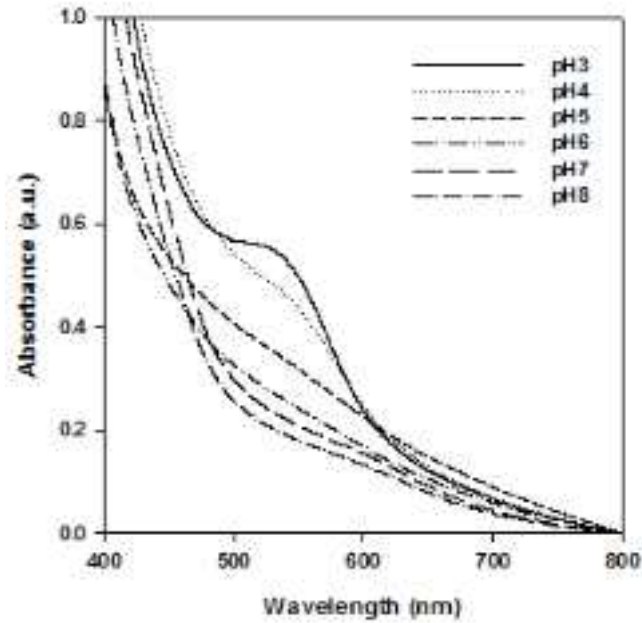


그림 14 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 5:1 복합체의 pH에 따른 흡광도

- 온도 안정성 시험

- 글라이콜 키토산과 복합체를 형성하지 않은 안토시아닌을 20 °C 부터 100 °C 까지 30분이 지난 후에 흡광도 값을 비교함(그림16). 또한, 100 °C에서 시간별로(10분, 30분, 60분, 120분) 안정성을 보았음(그림17).

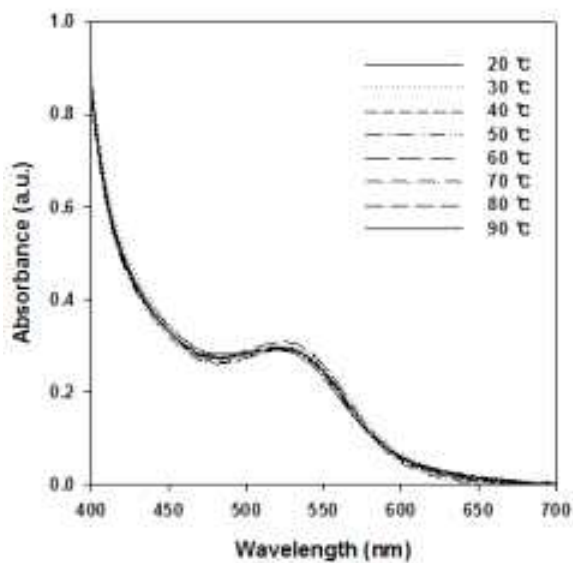


그림 15 안토시아닌만 있을 때 다양한 온도에서의 안정성

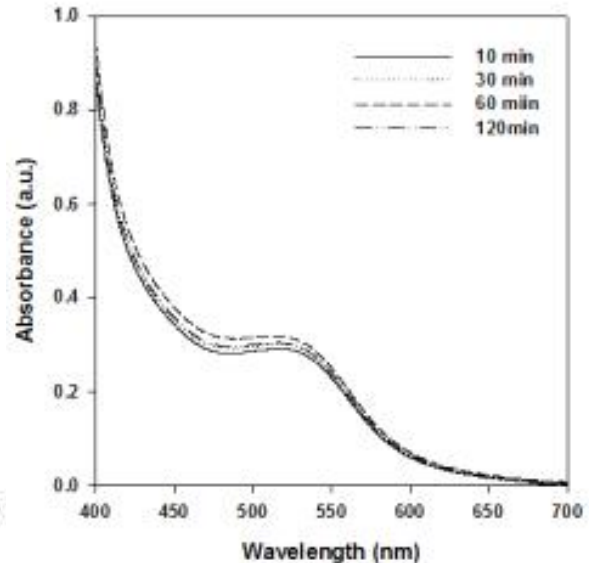


그림 16 안토시아닌만 있을 때 100 °C 에서 시간별 안정성

- 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 또한 위의 결과와 같이 다양한 온도에서 안정성을

나타냄(그림 18, 19, 20, 21, 22, 23).

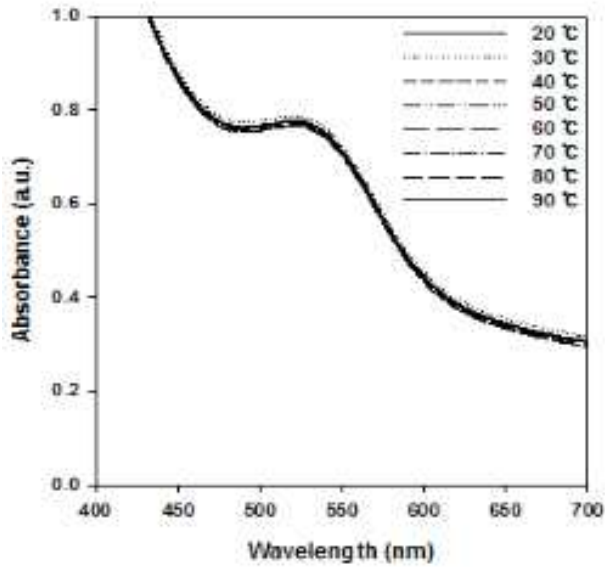


그림 17 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 9:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

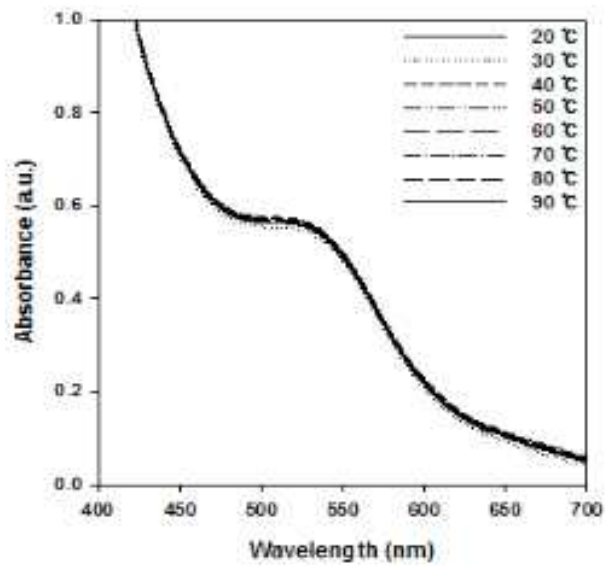


그림 18 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 8:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

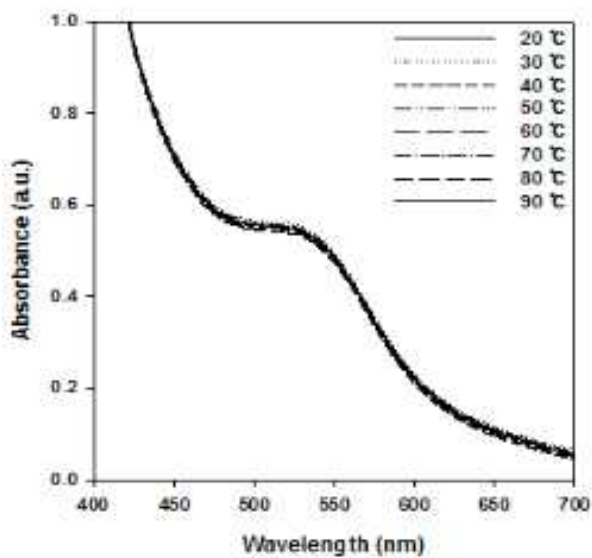


그림 19 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 7:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

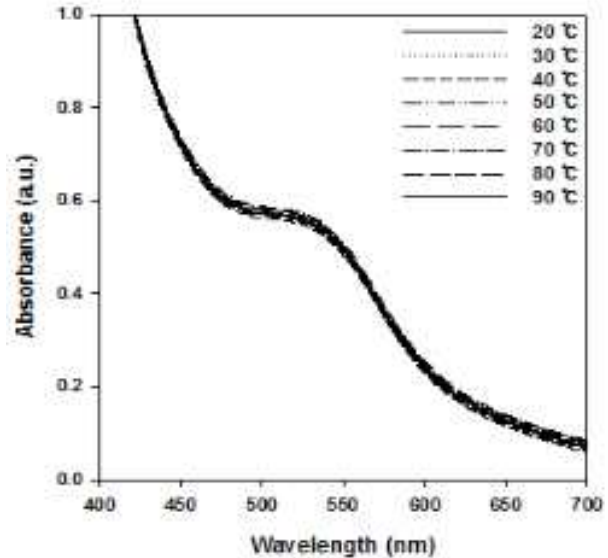


그림 20 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 6:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

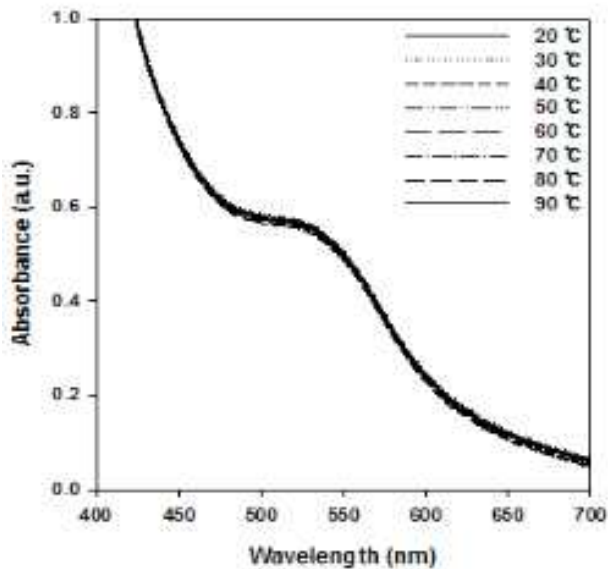


그림 21 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 5:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

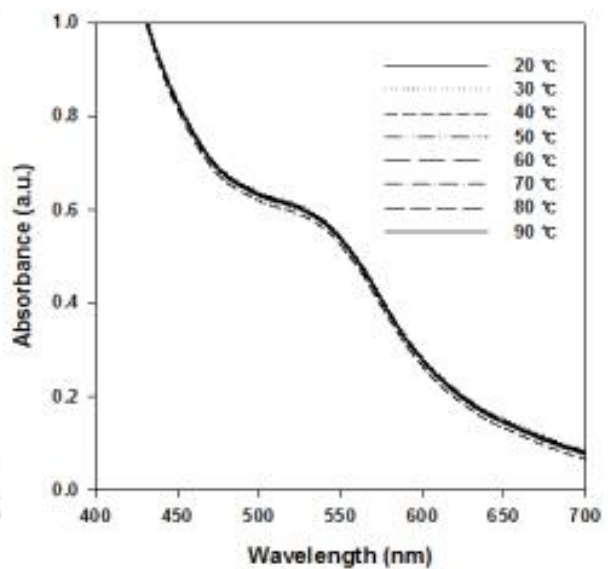


그림 22 안토시아닌 : 글라이콜 키토산  
= 4:1 복합체의 온도에 따른 흡광도

- 온도에서의 안정성을  $\lambda_{\max 1}$  (533nm) /  $\lambda_{\max 2}$  (598nm) 비율로 나타낸 결과 안토시아닌과 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체(4:1) 각각에서 안정성을 나타내는 것을 확인함(그림24).

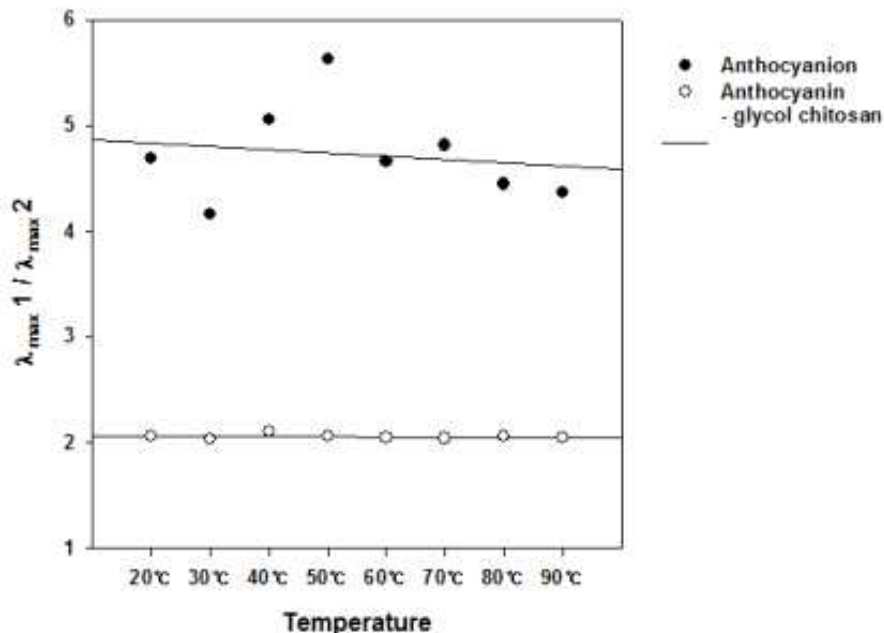


그림 23 온도에 따른 안정성을  $\lambda_{\max 1}$  (533nm) /  $\lambda_{\max 2}$  (598nm) 값으로 나타냄

- 광 안정성 시험

- 실험 결과 안토시아닌만 있을 때 안토시아닌이 활성을 나타내는 파장대인 533nm에서 시간이 지날수록 흡광도 값이 낮아지는 것에 비해 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체에서는 흡광도 값이 낮아지는 폭이 줄어드는 것을 확인함(그림25).



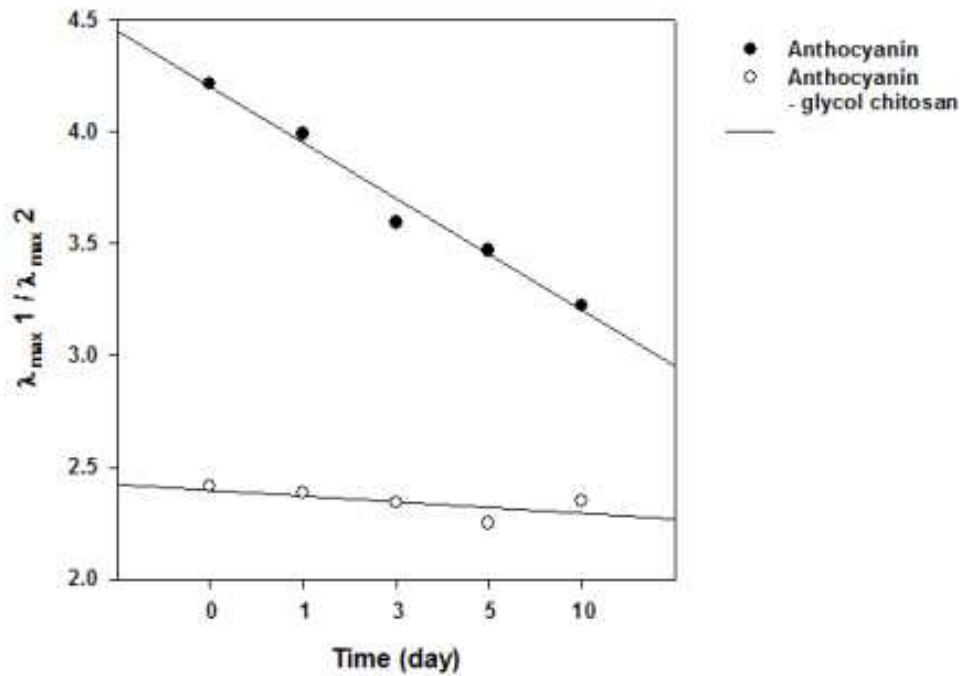


그림 24 광에 따른 안정성을  $\lambda_{max1}$  (533nm) /  $\lambda_{max2}$  (598nm) 값으로 나타냄

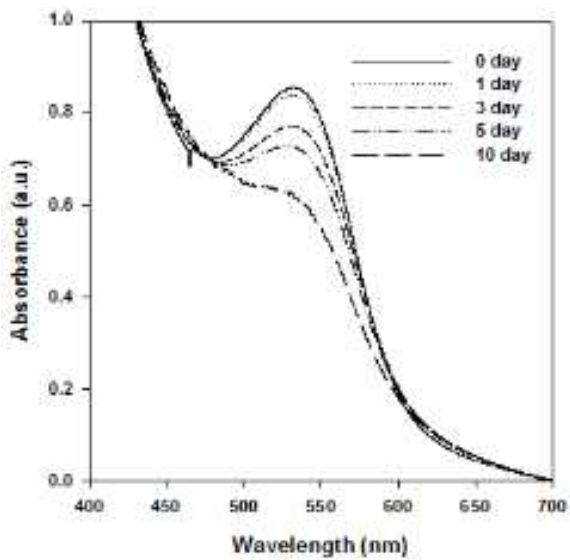


그림 25 안토시아닌만 있을 때  
광 안정성

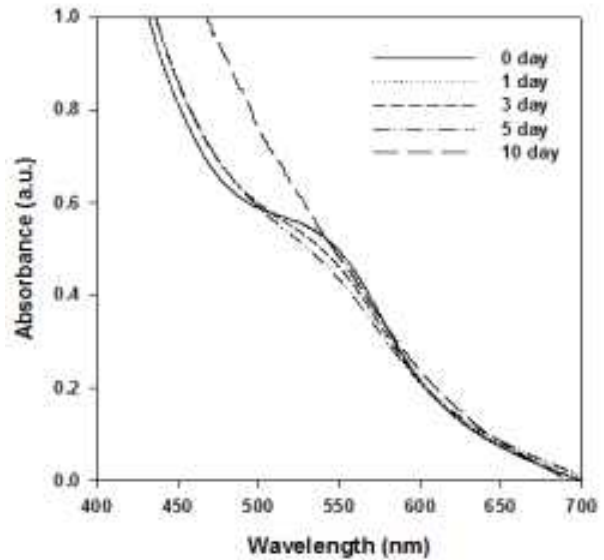


그림 26 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체  
(4:1) 의 광 안정성



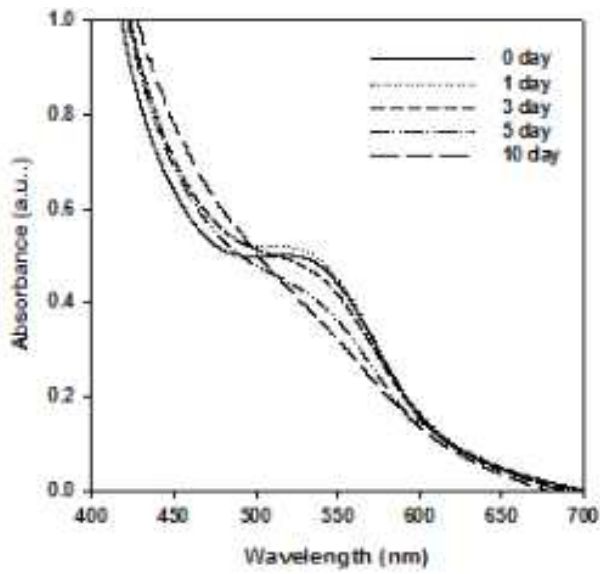


그림 27 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 (9:1) 의 광 안정성

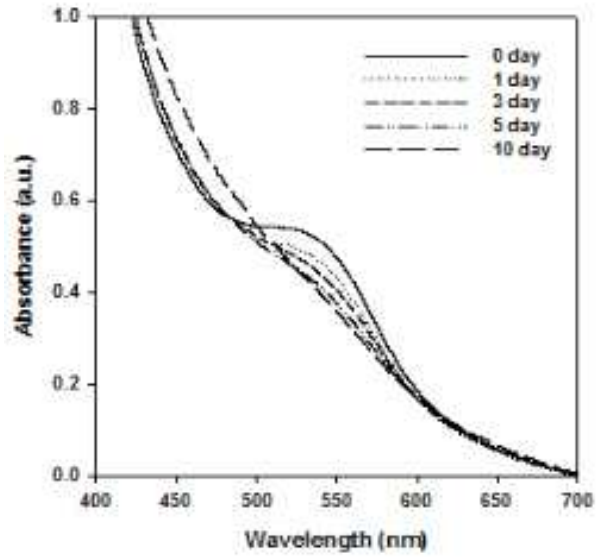


그림 28 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 (8:1) 의 광 안정성

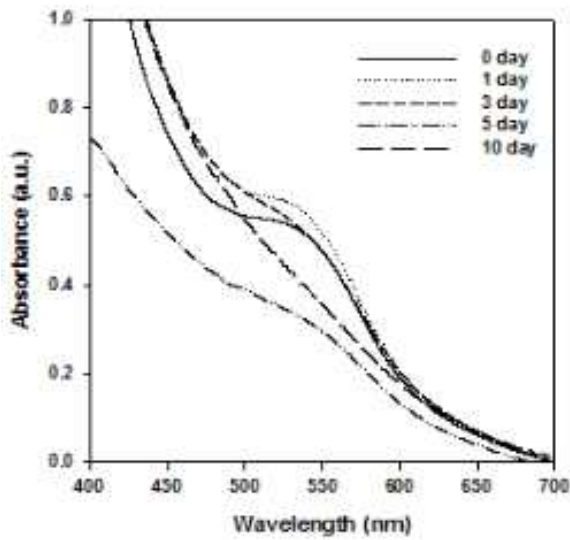


그림 29 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 (7:1) 의 광 안정성

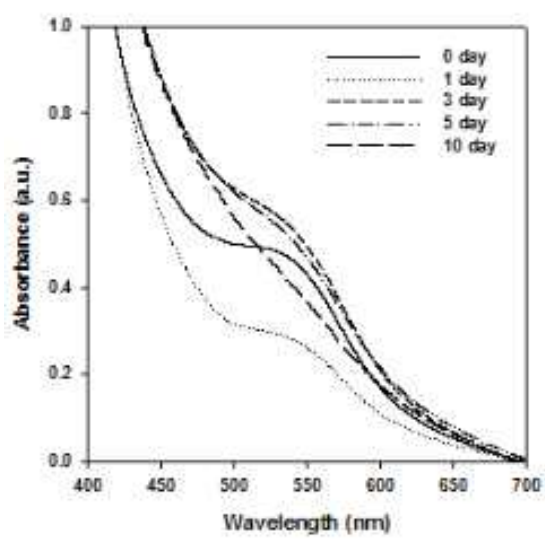


그림 30 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 (6:1) 의 광 안정성

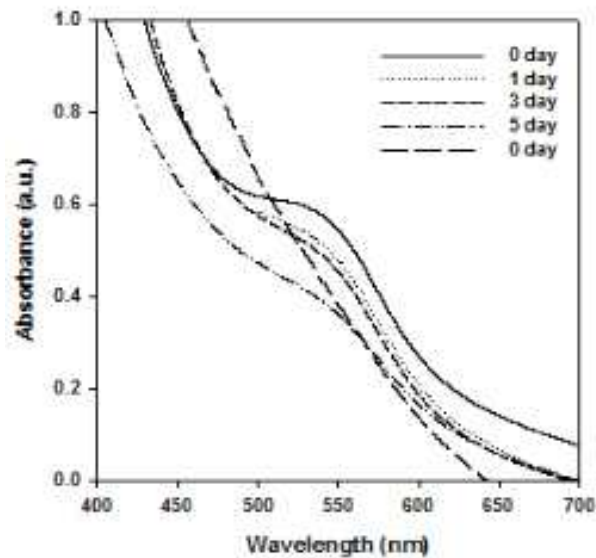


그림 31 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체 (5:1) 의 광 안정성

▶ 고찰

- 실험 결과 양이온성 다당류인 글라이콜 키토산과 복합체를 형성하였을 때 안토시아닌의 색이 유지가 잘되는 것을 확인함. 또한, 다양한 조건에서의 안정성 시험에서 안토시아닌 색소의 취약점인 pH에서의 안정성을 확보함. 실험 결과 안토시아닌만 있을 때는 pH가 올라감에 따라 안토시아닌의 활성을 나타내는 파장대인 533nm에서 흡광도 값이 낮아지다가 pH 6의 조건에서 구조적 변화를 일으켜 흡광도 값이 이동하는 것을 확인하였음. 그에 비해 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체는 다양한 pH에서도 533nm에서 최대 흡광도 값을 유지하였고 흡광도 값이 이동하지 않는 것으로 보아 안토시아닌 색소와 글라이콜 키토산 복합체를 형성함으로써 기존의 안토시아닌이 활성을 가지는 구조를 안정화 시킨다는 것을 확인함.
- 온도 안정성 시험에서는 안토시아닌 자체의 온도 안정성을 확인함으로써 안토시아닌 추출과정에서 안토시아닌의 활성이 유지 된다는 것을 확인함.
- 광 안정성 시험에서는 안토시아닌과 안토시아닌-글라이콜 복합체를 각각 자연광에 날짜별로 노출시켰을 때, 안토시아닌만 있을 때는 최대 흡광도 값이 줄어드는 것을 확인하였지만 안토시아닌-글라이콜 키토산 복합체는 최대 흡광도 값이 크게 줄어들지 않는 것으로 보아 광 조건 하에서도 안정성을 가지는 것을 확인함.
- 실험 결과 안토시아닌과 글라이콜 복합체를 다양한 비율로 형성하였을 때 안토시아닌 : 글라이콜 복합체 = 4:1 의 비율에서 pH 및 광조건 하에서 가장 안정성이 높을 것을 확인함.

▶ 결론

본 연구에서 안토시아닌과 양이온성 다당류인 글라이콜 키토산과 복합체를 형성함으로써 안토시아닌의 구조적 안정성을 향상시킨 안토시아닌-글라이콜 키토산을 제조함. 이는 기존의 안토시아닌이 가지고 있던 다양한 환경조건(pH, 온도, 광)에서 불안정하다는 취약점을 극복하여 식품, 천연색

소, 의약품 등 다양한 제품으로의 제품화가 가능하고, 자소엽 자초뿐만이 아닌, 안토시아닌을 함유하고 대량 함유하고 있는 다른 원료들로 확대가 가능 할 것으로 기대됨.

(6) 알러지 유발 패턴과 항알러지 효과 기능성 분석

▶ 천연색소와 나노복합체 색소의 알러지 유발패턴 비교실험

▶ 천연색소의 알러지 저감효과 검증

	추출물	군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여량 (mg/kg)		
Control	Nomal control	NC	Male	5	1~5	-		
	Vehicle control	VC	Male	5	6~10	-		
자소엽	-	1	Male	5	11~15	200		
	Water	0.5% Citric acid	2	Male	5	16~20	200	
		0.6% Citric acid +Chitosan	3	Male	5	21~25	200	
	30%	-	4	Male	5	26~30	200	
		0.5% Citric acid	5	Male	5	31~35	200	
	EtOH	0.6% Citric acid	6	Male	5	36~40	200	
		+Chitosan	7	Male	5	41~45	200	
	자초	Water	0.5% Citric acid	8	Male	5	46~50	200
			0.6% Citric acid +Chitosan	9	Male	5	51~55	200
		30%	-	10	Male	5	56~60	200
0.5% Citric acid			11	Male	5	61~65	200	
EtOH	0.6% Citric acid	12	Male	5	66~70	200		
	+Chitosan	13	Male	5	71~75	200		
강황	Water	-	13	Male	5	71~75	200	
	60% EtOH	-	14	Male	5	76~80	200	

○ ICR mouse에 systemic anaphylaxis 및 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) 유발 후 시험물질에 의한 알레르기 저감 효능 확인.

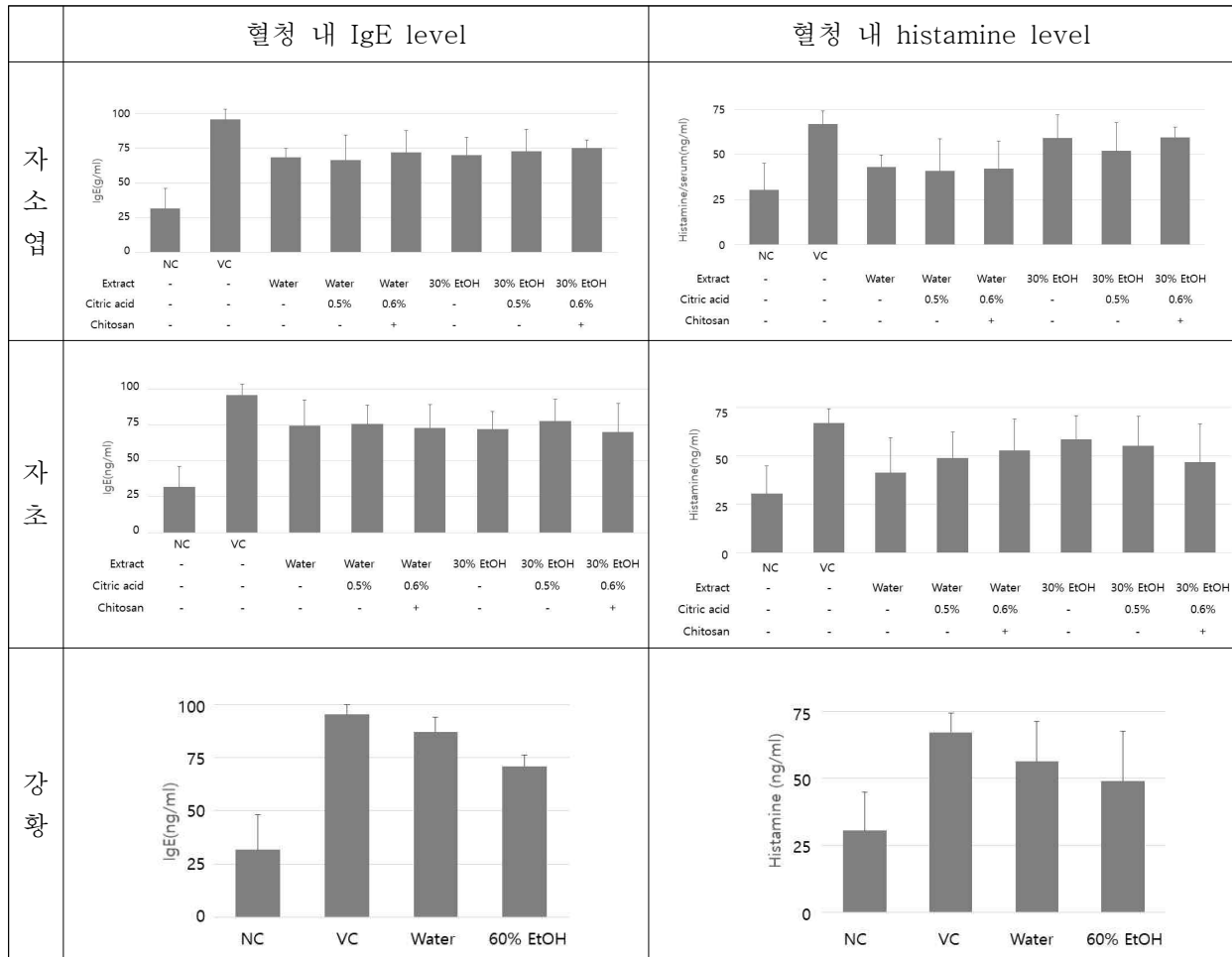
- Systemic anaphylaxis

: 시험물질 투여 후 1시간에 Compound 48/80을 정상생리식염수에 녹여 8 mg/kg의 용량으로 복강주사하여 Systemic anaphylaxis 유발

· 측정항목 : 혈청 내 IgE 및 histamine 수치 측정

· **혈청 내 IgE 및 histamine level** : IgE의 경우, (66.54 ng/ml, p < 0.05), 3(72.18 ng/ml, p < 0.05), 4(70.10 ng/ml, p < 0.01), 5(72.65 ng/ml, p < 0.05), 6(75.23 ng/ml, p < 0.01), 8(75.39 ng/ml, p < 0.05), 9(72.78 ng/ml, p < 0.05), 10(71.74 ng/ml, p < 0.01), 11(77.53 ng/ml, p < 0.05), 12(69.85 ng/ml, p < 0.01) 및 14(71.06 ng/ml, p < 0.01)를 투여한 경우에 혈중 IgE 수치가 부형제 대조군에 비해 유의적인 수준으로 감소. histamine의 경우에는 시험물질 1(43.25 ng/ml, p < 0.01), 2(40.88 ng/ml, p < 0.05),

3(42.24 ng/ml, p < 0.05), 7(41.36 ng/ml, p < 0.05) 및 8(49.11 ng/ml, p < 0.05)을 투여한 경우에 혈중 histamine 수치가 부형제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였고, 두 측정항목 모두 시험물질 2번을 투여한 군에서 가장 낮은 수치를 나타냄

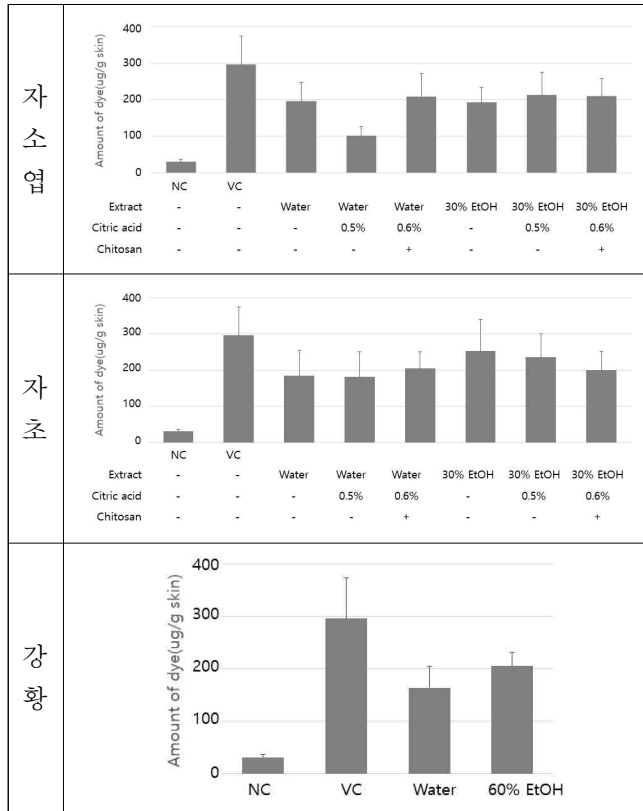


- PCA

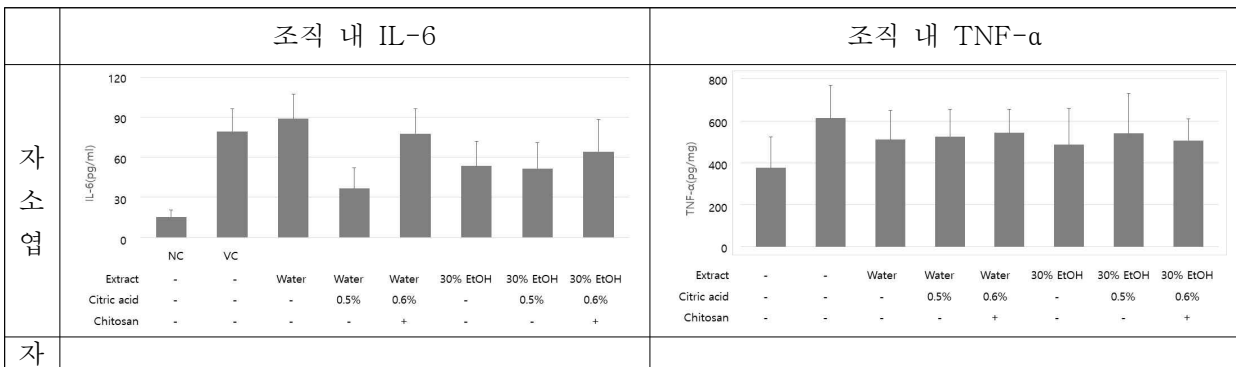
: 마우스를 제모한 후 isoflurane을 이용한 호흡마취하에 등쪽 피부 네군데에 각각 100 ng의 murine monoclonal anti-DNP IgE를 20  $\mu$ l의 정상생리식염수에 녹여 피내주사한 후 48시간에 시험물질을 투여하고 1시간 후에 100  $\mu$ g의 DNP-HSA를 100  $\mu$ l의 1% Evans blue에 녹여 정맥내 주사하여 유발

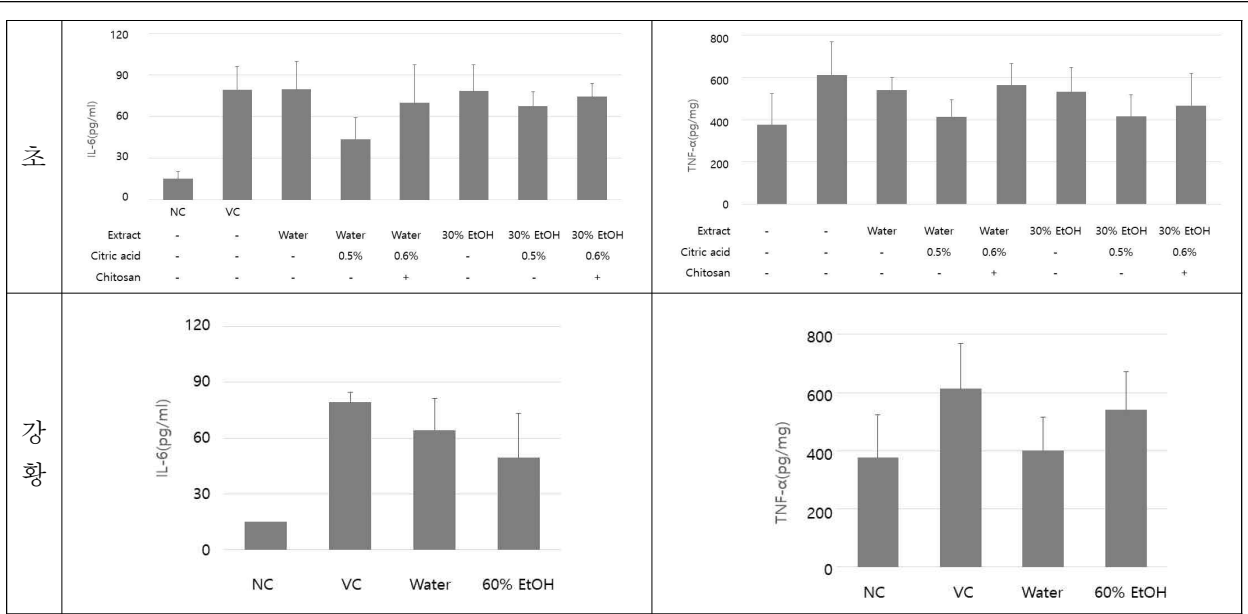
- 측정항목 : Skin : BCA protein assay, mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 및 IFN- $\gamma$  측정  
Serum : mouse histamine, IL-6 및 TNF- $\alpha$  ELISA 측정

· **Evans blue** : Evans blue 염색 정도를 통해 시험물질의 PCA 모델에 대한 효능을 평가한 결과, 시험물질 1(195.98  $\mu$ g/g skin, p < 0.05), 2(101.27  $\mu$ g/g skin, p < 0.01), 4(192.27  $\mu$ g/g skin, p < 0.05), 7(184.15  $\mu$ g/g skin, p < 0.05), 8(181.18  $\mu$ g/g skin, p < 0.05), 13(163.56  $\mu$ g/g skin, p < 0.05) 및 14(205.02  $\mu$ g/g skin, p < 0.05)를 투여한 경우에 염색 양이 부형제 대조군에 비해 유의적인 수준으로 감소

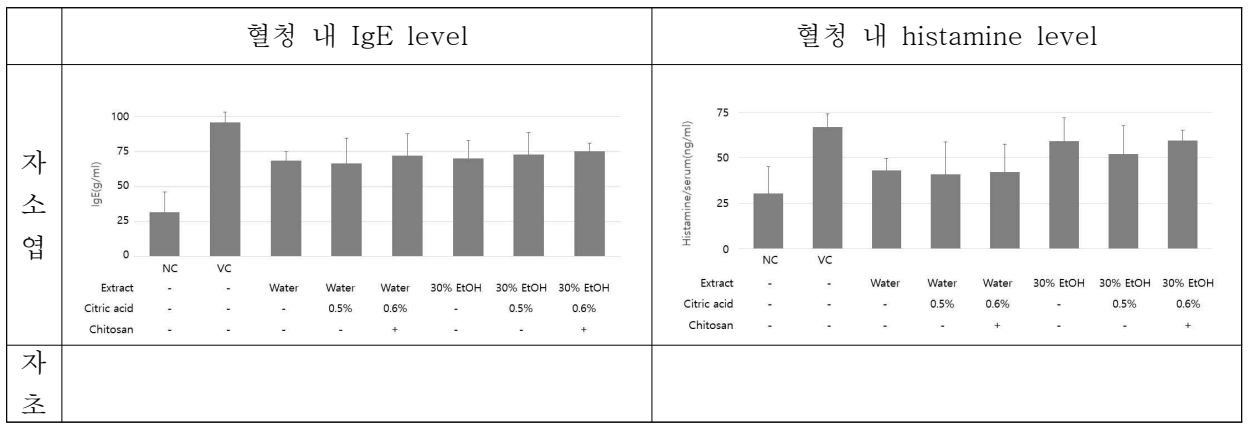


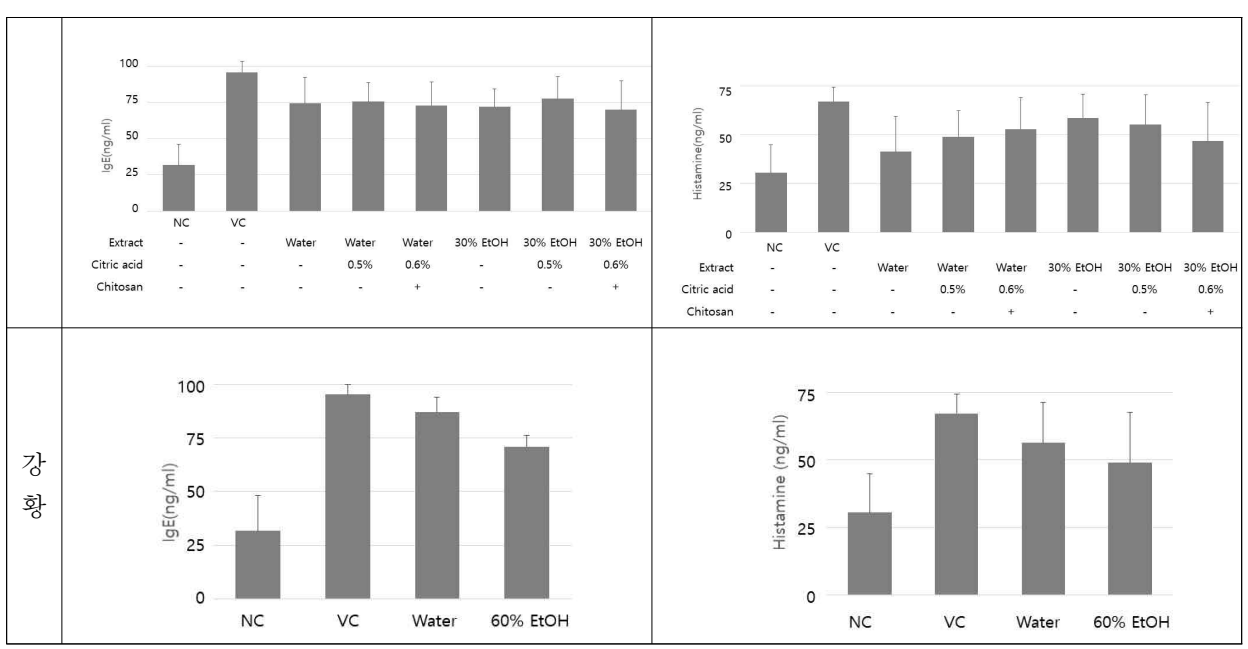
· 조직 내 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 및 IFN- $\gamma$  level : IL-6의 경우, 시험물질 3, 5, 7, 8, 9 및 10을 투여한 경우에 피부 조직 내 IL-6 수치가 부형제 대조군에 비해 유의적인 수준으로 감소하였고(각각 4.57, 4.95, 5.06, 4.90, 5.26 및 5.39 ng/mg protein,  $p < 0.05$ ), TNF- $\alpha$ 의 경우에는 시험물질 8과 13(각각 414.23과 401.58 pg/mg protein)을 투여한 군에서 피부 조직 내 TNF- $\alpha$ 의 수치가 부형제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). IL-4의 경우, 시험물질 1, 5, 8 및 10을 투여한 경우에 피부 조직 내 IL-4 수치가 부형제 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(각각 215.49, 221.47, 211.19 및 223.67 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ 의 경우에는 시험물질 3(1367.96 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), 5(1197.10 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), 6(1204.17 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), 7(1346.87 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), 8(1077.39 pg/mg protein,  $p < 0.01$ ), 9(1455.66 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ), 11(1145.16 pg/mg protein,  $p < 0.05$ ) 및 13(1106.48 pg/mg protein,  $p < 0.05$ )을 투여한 군에서 피부 조직 내 IFN- $\gamma$ 의 수치가 부형제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소





• **혈청 내 IgE, histamine, IL-6 및 TNF-α level** : IgE의 경우, 시험물질 1(56.37 ng/ml,  $p < 0.05$ ), 2(46.05 ng/ml,  $p < 0.05$ ), 12(38.73 ng/ml,  $p < 0.01$ ), 13(53.71 ng/ml,  $p < 0.05$ ) 및 14(45.77 ng/ml,  $p < 0.01$ )를 투여한 경우에 혈중 IgE 수치가 부형제 대조군에 비해 유의적인 수준으로 감소하였고, histamine의 경우에는 시험물질 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 14를 투여한 군의 혈중 histamine 수치가 부형제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다(각각 51.48, 63.59, 58.02, 56.17, 62.12, 66.05, 63.52, 54.63, 54.63 및 62.30 ng/ml,  $p < 0.05$ ). IL-6의 경우, 시험물질 2(36.50 pg/ml,  $p < 0.01$ ), 5(51.59 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 8(43.77 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 및 14(49.46 pg/ml,  $p < 0.05$ )를 투여한 군의 혈중 IL-6 수치가 부형제 대조군에 비해 유의적인 수준으로 감소하였고, TNF-α의 경우에는 시험물질 1(49.20 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 3(50.50 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 5(50.69 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 8(51.88 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 9(46.71 pg/ml,  $p < 0.01$ ), 10(48.14 pg/ml,  $p < 0.05$ ), 11(44.68 pg/ml,  $p < 0.01$ ), 12(45.93 pg/ml,  $p < 0.01$ ), 13(43.01 pg/ml,  $p < 0.01$ ) 및 14(40.81 pg/ml,  $p < 0.01$ )을 투여한 경우에 혈중 TNF-α 수치가 부형제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소





=> 이상과 같은 결과를 종합해 볼 때, 본 시험 조건하에서는 시험물질 2, 3, 8 및 14가 알레르기 저감 효능이 우수한 것으로 생각되며 그 중 시험물질 8이 가장 우수한 활성 가짐.

**(6) 천연색소 추출 최적화 공정 확립**

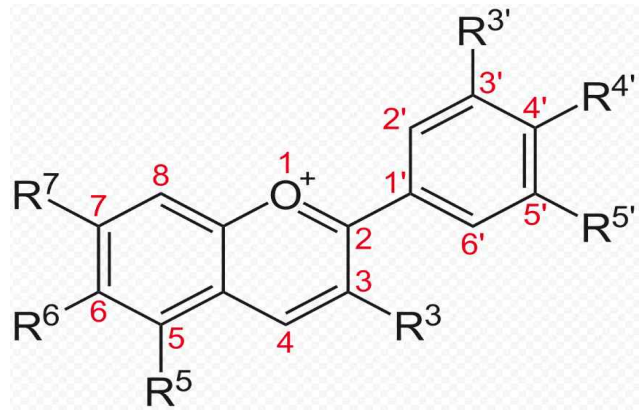
▶ 대량생산을 위한 추출조건 설정

:추출용매 선정 및 용매농도, 추출 배합비율, 추출온도, 추출시간 등에 따른 최적추출공정

○ 자소엽 추출최적화

- 추출용매 선정

: 안토시아닌계열 적색색소로서 수용성물질로 추출용매를 물과 에탄올(주정)로 선정하였으며, 고부가가치 식품, 식품 첨가물 등의 소재의 접목에 적합하다고 판단 실험을 실시하였다.



안토시아닌 구조

- 수용성 추출에 따른 자소엽추출물의 안정성

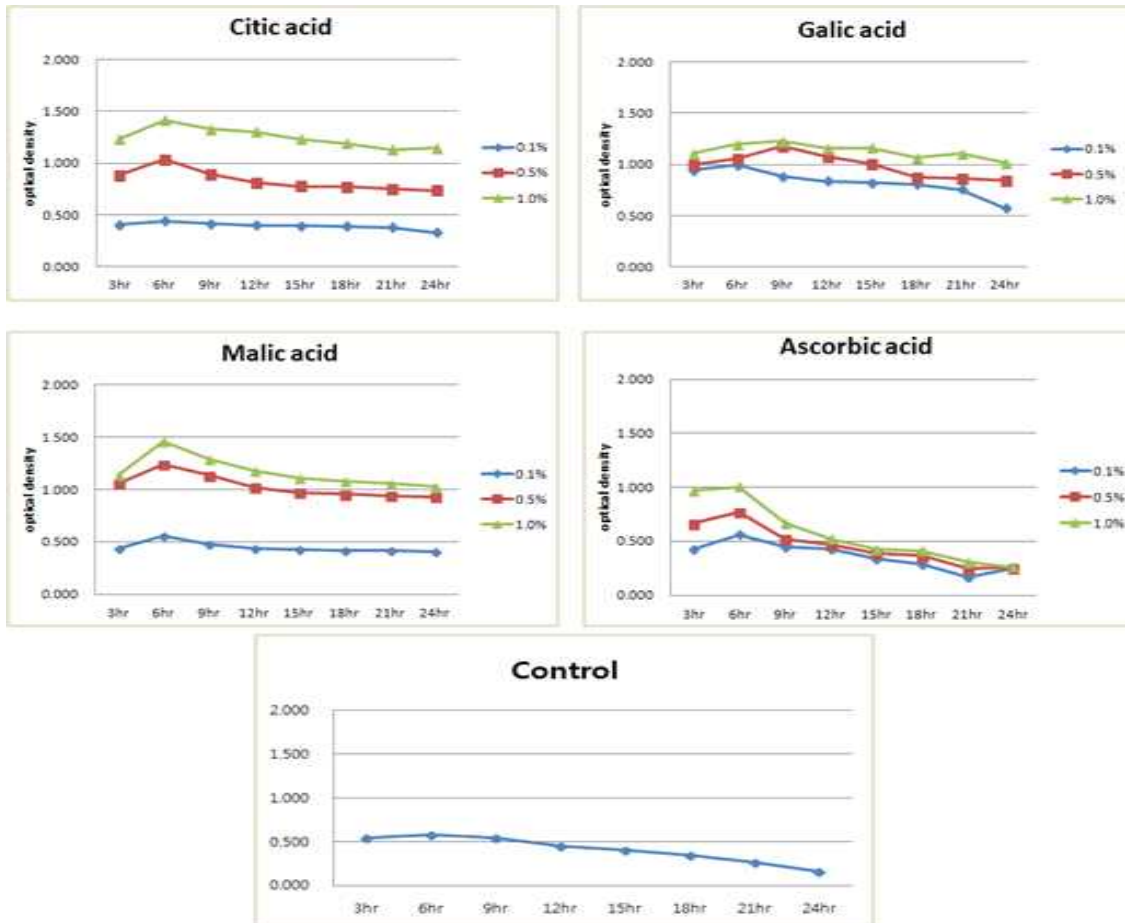
: 안토시아닌 계열의 적색소를 지닌 자소엽색소는 pH를 비롯하여 공기 중 산소와 색소 안정성이 밀접한 관계를 나타내는 것으로 확인되어 추가로 실험을 실시하였다.



그림 32 산도조절제 첨가에 따른 자소엽추출물 색상변화

- 산도조절제 선정

: Citric acid, Galic acid, Malic acid, Ascorbic acid를 이용하여 광학밀도(Optical Density)를 비교한 결과 안토시아닌의 안정성 및 추출효율 증진에 대한 실험을 실시하여 최종적으로 Citric acid를 선정하였다.





산도조절제 첨가에 따른 광학밀도값(Optical Density)

- Citric acid 농도 선정

: Citric acid의 농도는 안토시아닌 계열의 색소가 안정하게 유지되는 pH3이하를 기준으로 하여 선정하여 최종 농도는 1%로 선정하였다.

- 추출온도 및 추출시간

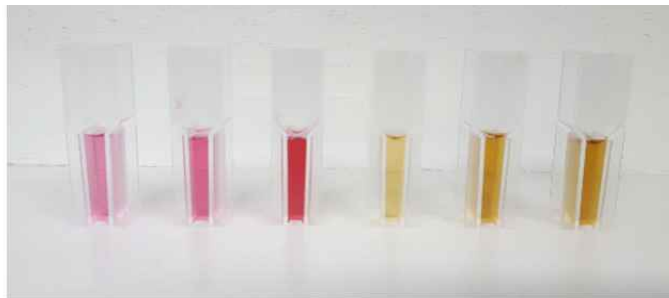
: 실험의 정확성을 위해, 위 실험에서 얻어낸 결과인 추출용매(물,에탄올), 추출배합비율 및 산도조절제 유무에 따른 조건과 접목시켜 추출온도와 시간에 대해 실험을 함께 진행하였다.

: 물을 비롯한 유기용매(에탄올)을 활용하여 추출 온도를 달리한 후 하루 간 추출하여 추출 정도를 광학밀도(Optical Density)를 비교 확인하였으며, 추출시간의 경우 추출이 완전히 되었다고 판단되는 20시간 이상을 최적조건으로 설정하였다.



(희석배수 x2)

	Added 1% citric acid			Non		
	D.W	20% EtOH	40% EtOH	D.W	20% EtOH	40% EtOH
40°C (1day)	0.439	0.844	1.315	0.452	0.657	0.318



(희석배수 x2)

	Added 1% citric acid			Non		
	D.W	20% EtOH	40% EtOH	D.W	20% EtOH	40% EtOH
60°C (1day)	0.655	0.852	<b>1.660</b>	0.152	0.444	0.666

추출조건에 따른 자소엽추출물 광학밀도값(Optical Density)

- 추출 비율

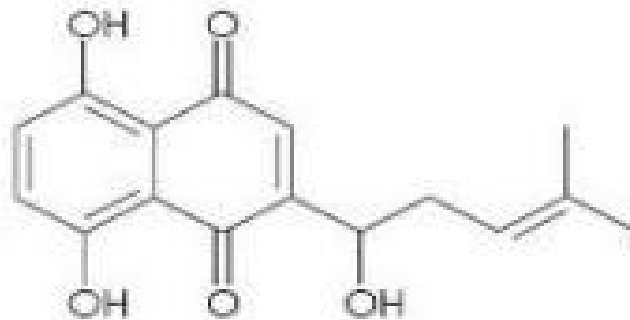
추출배합비율	1:3	1:5	1:10	1:15
optical density (A535)	0.784	0.731	0.542	0.434
비고	흡광도 값은 높게 나타났으나, 자소엽 원물 자체에서 수분을 다량 흡수하는 경향을 나타내어 추출에 용이하지 않다고 판단됨.			추출 효율 및 자소엽의 수분흡수정도를 고려한 결과 두 처리구 모두 적합한 추출배합 조건으로 판단되었으나, 대량 공정의 경우를 고려해 최종 1:15의 추출배합 비율을 선정함.

= 자소엽 추출최적화 조건		비고 : 대량생산 공정에서 에탄올 사용에 대한 점을 고려하여 단가적 측면에서 에탄올의 농도를 낮추거나, 물을 사용한 추출방법을 고려해야함
1. 용매	: 40% 에탄올	
2. 산도조절제 사용	: 1% Citric acid	
3. 추출비율	: 1 : 15 (추출용매대비)	
4. 온도 및 시간	: 60℃ , 20시간 이상	

○ 자초 추출최적화

- 추출용매 선정



: 시코닌계열 적색색소로서 추출용매를 에탄올(주정)로 선정하였으며, 고부가가치 식품, 식품 첨가물 등의 소재의 접목에 적합하다고 판단 실험을 실시하였다.


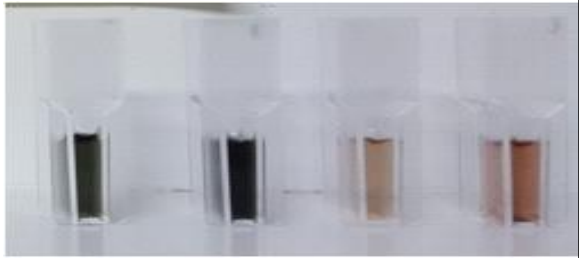


시코닌 구조

- 추출용매 및 추출온도와 추출시간에 따른 자초 추출 최적화

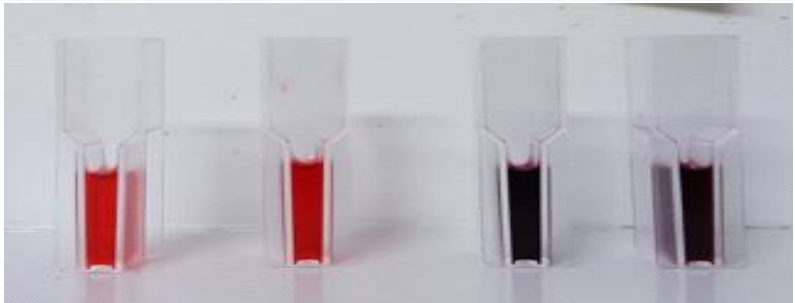
: 추출용매는 1차적으로 물과 20% 에탄올 두가지를 비교하였으며, 추출온도는 상온(RT)과 60℃에서 실험을 실시하였다. 앞선 자소엽 실험에 대한 결과에 따라 Citric acid의 유무에 따른 실험도 함께 진행하였다. 추출시간은 자초의 색이 완전히 추출 될 것으로 판단되는 20시간 이상을 기준으로 하였다.

1차 pilot-test (상온추출)				24경과 후
Citric acid 1%		Non - Citric acid		
물 100%	EtOH 20%	물 100%	EtOH 20%	
				

2차 pilot-test (60°C 추출)				24경과 후
Citric acid 1%		Non - Citric acid		
물 100%	EtOH 20%	물 100%	EtOH 20%	
				

실험조건에 따른 자초추출물 색상변화

: Citric acid의 첨가는 24시간 이후 안정성에 대하여 큰 의미를 부여하지 못했으며, 자초 특유의 자색, 적색의 추출이 원활하게 나타나지 않아 80% 에탄올을 이용하여 재실험을 실시하였다.

2차 pilot-test (80% EtOH를 활용한 추출)			
상온추출		60°C 추출	
EtOH 80%	EtOH 80%+ Citric acid 1%	EtOH 80%	EtOH 80%+ Citric acid 1%
			

80% 에탄올을 이용한 자초 추출물



물과 80% 에탄올을 이용한 자초추출물 비교

- 추출 비율

: 자초의 경우 원물자체의 수분 흡수량이 많지 않고, 추출효율이 높으며, 색이 잘 우러나오는 1 : 10을 선정하였다. 1 : 10의 비율에 비해 1 : 3, 1 : 5의 추출비율 광학밀도 값이 높게 나타났으나, 경제적 측면을 고려 2차 추출을 배제하였기에 최종 1 : 10을 선정하였다.

추출배합비율	1:3	1:5	1:10	1:15
optical density (A535)	3.53	3.21	2.738	2.431

= 자소엽 추출최적화 조건

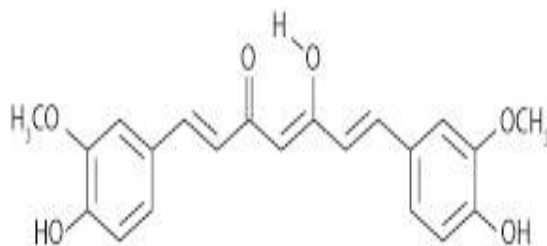
1. 용매 : 40% 에탄올
2. 추출비율 : 1 : 10 (추출용매대비)
3. 온도 및 시간 : 60℃ , 20시간 이상

비고 : 대량생산 공정에서 에탄올 사용에 대한 점을 고려하여 단가적 측면에서 에탄올의 농도를 낮추거나, 물을 사용한 추출방법을 고려해야함

o 강황 추출최적화

- 추출용매 선정

: 강황 속에 함유되어있는 노란색소 성분인 커큐민을 대상으로 추출용매를 물과 에탄올(주정)로 선정하였으며, 고부가가치 식품, 식품 첨가물 등의 소재의 접목에 적합하다고 판단 실험을 실시하였다.



커큐민 구조

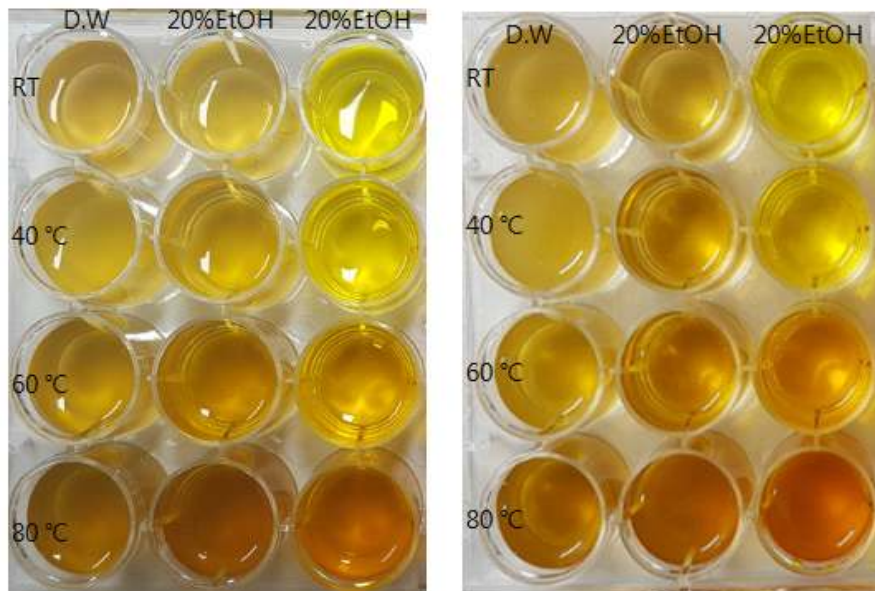
- 추출용매 및 추출온도와 추출시간에 따른 자초 추출 최적화

: 추출용매는 물, 20% 에탄올, 80% 에탄올, 추출온도는 상온(RT), 40°C, 60°C, 80°C, 추출 시간은 24시간동안 (3hr, 6hr, 9hr, 12hr, 18hr, 24hr) 경과관찰하였다.

: 물의 비율이 높음에 따라 탁도가 증가하고 추출효율이 떨어지는 것을 확인하였으며, 에탄올 함유가 증가할수록 추출물의 투명도가 높으며 추출효율이 좋게 나타났다. 추출 조건에 따라 물 비율이 높을수록, 온도가 높을수록, 시간이 경과함에 따라 갈변하는 현상이 나타났으며, 80% 에탄올의 경우에 시간의 경과에 따른 변화는 크게 없으며 고온에서만 갈변이 일어나는 것을 확인하였다.

: 에탄올의 농도가 높을수록 초기 추출효율이 높게 나타나는 것이 확인됨에 따라, 추출효율과 에탄올 소모량의 경제적측면을 고려하였을 때, 추출시간을 줄이고 원물의 재사용을 통한 반복추출을 고려해봐야 할 사항로 판단된다.

: 에탄올을 사용하여 40°C이하에서 8시간 이내로 추출하는 것을 최종 선정하였다.



실험조건에 따른 강황추출물 색상변화 (좌:3시간추출, 우:24시간추출)

- 추출 비율

: 강황 추출물의 경우 추출용매에 따라 원물이 용매를 흡수하는 정도가 다름을 확인할 수 있었다. 에탄올추출의 경우 물추출의 경우보다 회수되는 추출물이 약 1.5배정도 차이남을 확인할 수 있었다. (에탄올함유 용매에 비해 물추출의 경우 흡수율이 더 높아 최종 회수율 측면에서 효율성이 떨어질 것으로 판단된다.)

: 추출비율은 강황 원물자체의 추출효율을 고려 1 : 10을 선정하였다.

추출용매 비율	물			발효주정		
	1:3	1:5	1:10	1:3	1:5	1:10
optical density (A410)	1.084	0.899	0.648	2.712	2.514	2.186
추출물 회수량	약 65% (1:10 비율기준)			약 85% (1:10 비율기준)		

= 강황 추출최적화 조건	비고 : 에탄올의 농도가 높을수록 초기 추출효율이 높게 나타나는 것이 확인됨에 따라, 추출효율과 에탄올 소모량의 경제적측면을 고려하였을 때, 추출시간을 줄이고 원물의 재사용을 통한 반복추출을 고려해야 할 사항로 판단된다. (많은양의 에탄올 소모는 경제적으로 경쟁력이 떨어지므로 농축과정에서 에탄올을 회수하여 재추출에 사용하는 법을 강구해야함)
1. 용매 : 80% 에탄올 2. 추출비율 : 1 : 10 (추출용매대비) 3. 온도 및 시간 : 40℃ , 8시간 이하	

▶ 대량생산 공정 확립을 위한 추출조건 확립

: 실험을 통해 선정된 최적화 조건을 통한 대량생산 공정확립

(1) 최적화된 추출조건

	자소엽	자초	강황
추출용매	40% 에탄올	40% 에탄올	80% 에탄올
산도도조절제	1% Citric acid		
추출비율(추출용매대비)	1 : 15	1 : 10	1 : 10
추출온도	60℃	60℃	40℃
추출시간	20시간 이상	20시간 이상	8시간 이하

(2) 최적화된 추출조건에 대량공정 추출조건 확립


: 자소엽 추출용매는 경제적측면을 고려하여 40% 에탄올에서 물로 변경하였다. 자소엽추출물 안정성에 있어 에탄올의 사용보다 산도조절제의 사용이 더 큰 영향을 미치므로 경제적측면을 고려하여 대량추출에 있어 추출물용매는 물로 변경하여 대량생산하였다.

: 자소엽 추출에 사용되는 산도조절제(Citric acid)의 농도 1%의 함량은 신맛이 강하여 식품, 식품 첨가물 등의 소재로서 사용이 어려울 것으로 판단되어 안토시아닌의 안정성을 유지시키는 pH3부근의 안정성을 나타내는 농도 0.5%로 최종 변경하였다.

: 자초의 경우 에탄올 함량을 20%로 줄여 대량생산을 실시하였다. 대량생산의 경우 20%에탄올이 40%에탄올보다 추출효율이 작지만 경제적측면으로 비교했을 때 20%에탄올의 사용이 대량생산공정에서 더 적합하다고 판단된다.

: 강황의 경우 추출물의 선명도와 추출효율, 경제적측면을 고려하여 에탄올 농도를 낮추는

법을 고려하였으나, 에탄올 함량이 낮을수록 탁도가 높아져 80% 에탄올을 유지하였다.  
 : 강황 추출은 에탄올의 소비를 줄이고 추출 효율을 유지하기 위하여 추출비율을 1 : 5로 상온에서 5시간 이하 추출하여 총 3회 반복 추출(에탄올재사용)하는 것으로 최종 대량공정으로 확립하였다.

	자소엽	자초	강황
추출용매	물	20% 에탄올	80% 에탄올
산도도조절제	0.5% Citric acid		
추출비율(추출용매대비)	1 : 15	1 : 10	1 : 5
추출온도	60℃	60℃	RT
추출시간	20시간 이상	20시간 이상	5시간 이하
			

○ 추출 공정 확립

2-3. 여과 및 농축공정 확립

: 최적화된 대량생산 공정을 이용한 천연색소 추출물의 여과 및 농축공정 확립

(1) 여과공정

- : Basket filter, Membrane filter, Centrifugal separator, UF filter 공정을 통한 여과정도 및 수율확인 결과 Basket filter를 통한 1차 여과 후 Membrane filter 과정을 최종 여과공정 선정하였다.
- : 자소엽 추출물은 에탄올추출물의 다른 추출물들에 비해 부유물이 관찰되어 Centrifugal separator(원심분리기)의 사용이 필요하다고 판단되었다. (공정소요시간과 추출물자체의 부유물이 적은 점, 경제적인측면을 고려하여 유동적 선택이 이루어져야 한다고 판단)
- : UF filter 공정의 경우 미세한 부유물 및 침전물, 전분 등이 관찰되지 않았으며 공정소요시간과 경제적 측면을 고려하여 여과공정에서 배제하였다.

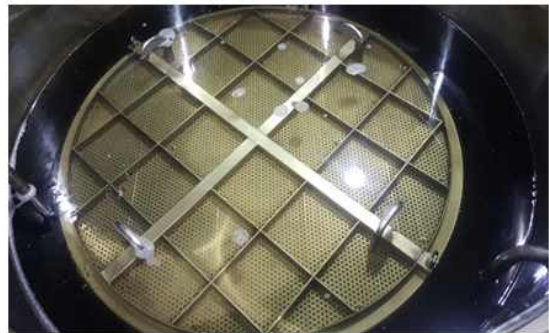




소분



정제수 투입



추출



Basket filter, Membrane filter





Centrifugal separator, UF filter

(2) 농축공정

: 여과된 추출액을 유량계를 통해 이송시킨 후 감압 진공상태를 유지시킨 상태에서 50℃로 25~35Brix 농축한다. 완료된 1차 농축액을 2차 농축기로 이송시킨 후 동일한 조건으로 사용 용도에 맞는 Brix까지 농축한다.



1차 농축기 사진



2차 농축기 사진

○ 대량생산 공정 확립



1. 추출

	자소엽	자초	강황
추출용매	물	20%EtOH	80%EtOH
원물비율	1: 15	1: 10	1: 5
산도조절제 Citric acid	0.5%	-	-
추출온도	60 °C	40°C	
추출시간	60 °C	40°C	



2. 여과

Basket filter : 추출탱크에서 냉각(buffer)탱크로 이송 시 1차 필터를 실시  
 Membrane filter: 냉각탱크에서 저장탱크로 이송 시 2차 필터를 실시  
 Centrifugal separator: 냉각된 추출물을 8,200RPM에서 원심분리  
 UF filter: 경제적 측면을 고려(사용하지않음)



3. 농축

진공상태에서 1차적으로 15~20Brix까지 농축, 냉각과정을 거친 후 동일한 방법으로 최종 Brix까지 농축

○ 대량공정으로 생산된 색소의 안정성향상 도모

: 안정적인 원료수급을 위해 계약재배를 진행하고, 첨가공정을 다양화하여 색소의 안정성을 강화시키는 방법 모색.

## ▶ 생리활성측정

### ○ 실험방법

#### - DPPH radical 소거능 측정

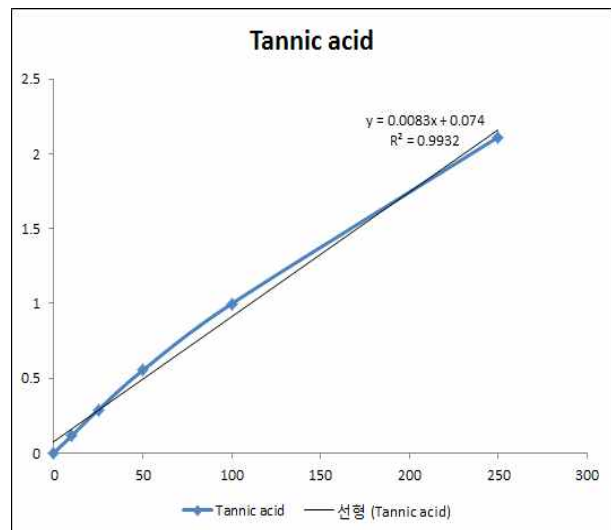
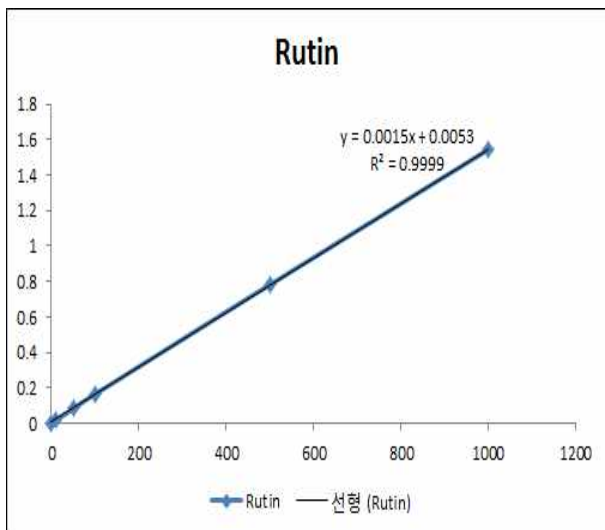
DPPH radical 소거활성은 Blois의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 상등액 100 ul에 DPPH 용액(ethanolic solution)을 900 ul를 가하여 혼합한 다음 실온에서 10분간 방치 후, 517 nm에서 흡광도 감소치를 측정하였다. 이때 DPPH radical 소거활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 백분율로 나타내었으며, 양성대조군으로 Vitamin C를 사용하였다.

#### - Total flavonoid 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Jia 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 각각의 시료 용액 150 ul에 증류수 600 ul와 5% NaNO<sub>2</sub> 45 ul를 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 100ul를 가하고 6분간 반응시킨 후에 1N NaOH 300 ul를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 rutin을 위와 같은 방법으로 실험하여 표준곡선으로 하여 함량을 구하였다.

#### - Total polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다[28]. 각각의 시료 50 ul에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 1 ul을 넣고, 50% Folin시약 50 ul를 넣은 후 상온에서 30분간 방치하여 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 760nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이때 표준물질은 tannic acid를 사용하였으며, 적정농도로 만든 후 위와 같은 방법으로 실험하여 표준곡선을 구하였다.



Total flavonoid, Total polyphenol 검량곡선

- Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD유사활성은 Marklund의 방법에 따라 과산화수소로 전화시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생산량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 10 ul에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl]amino-methane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 130 ul와 7.2 mM pyrogallol 10 ul를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응 후, 1N OH 10ul를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

- 색가 측정

: 차소염(차즈기색소)

이 품목을 측정하여 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 정밀히 달아 구연산완충액(pH 3.0)을 가하여 100mL로 한 것을 시험용액으로 한다. 필요하면 원심분리하여 그 상등액을 사용한다. 구연산완충액(pH3.0)을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 520nm 부근의 극대흡수파장에서 시험용액의 흡광도 A를 측정하여 다음 계산식에 따라 색가를 구한다.

(식품공전에 명시된 정량법 참조)

: 자초

이 품목을 측정하여 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 정밀히 달아 구연산완충액(pH 3.0)을 가하여 100mL로 한 것을 시험용액으로 한다. 필요하면 원심분리하여 그 상등액을 사용한다. 구연산완충액(pH3.0)을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 520nm 부근의 극대흡수파장에서 시험용액의 흡광도 A를 측정하여 다음 계산식에 따라 색가를 구한다.

(등록된 색소의 색가측정법이 없어 적색계열의 차소염의 실험법에 따라 험을 실시하였다.)

: 강황(심황색소)

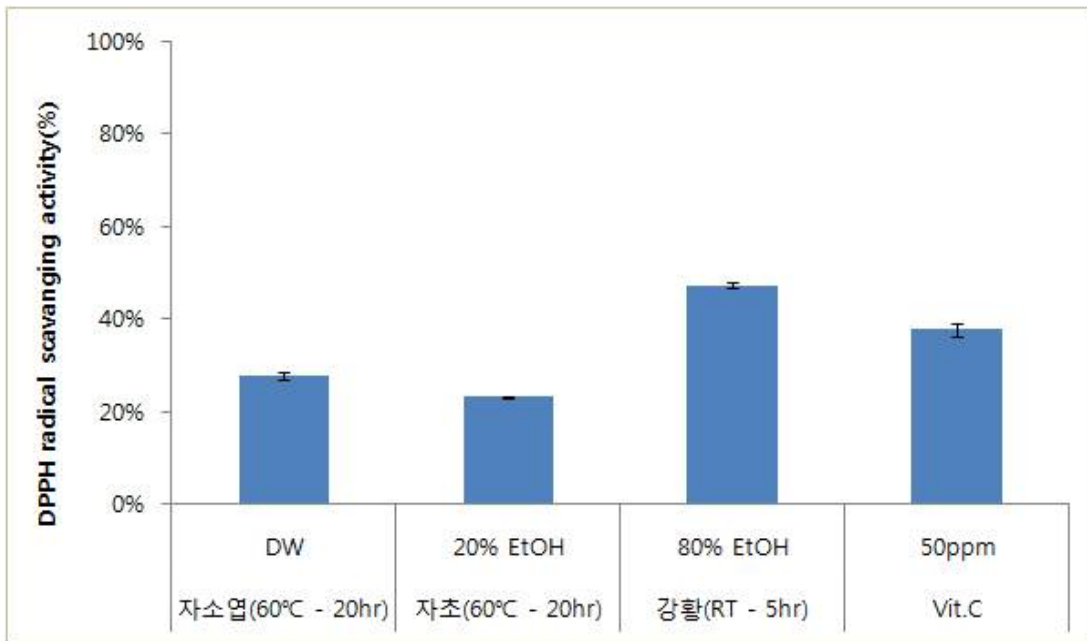
이 품목을 측정하는 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 정밀히 달아 에탄올에 녹여 100mL로 하고 이 액 1mL를 취하여 에탄올을 가하여 100mL로 한 것을 시험용액으로 한다. 필요하면 원심분리하여 그 상등액을 사용한다. 에탄올을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 425nm 부근의 극대흡수파장에서 시험용액의 흡광도 A를 측정하여 다음 계산식에 따라 색가를 구한다.

(식품공전에 명시된 정량법 참조)

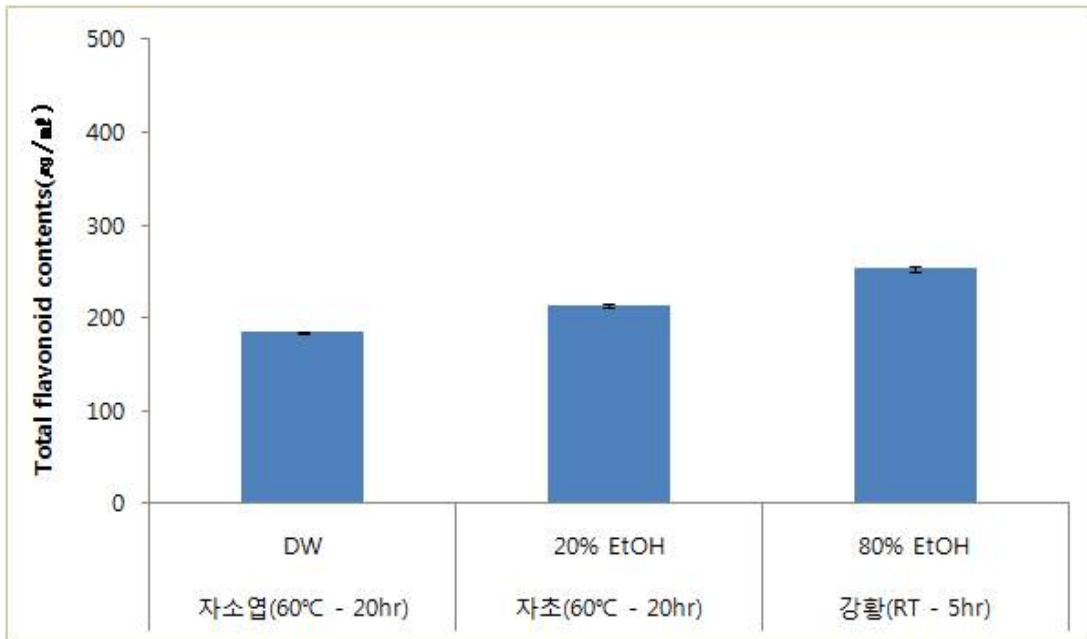
$$\text{색가}(E_{1cm}^{10\%}) = \frac{A \times 1,000}{\text{검체의 채취량}(g)}$$

(2) 실험결과

- DPPH radical 소거능 측정



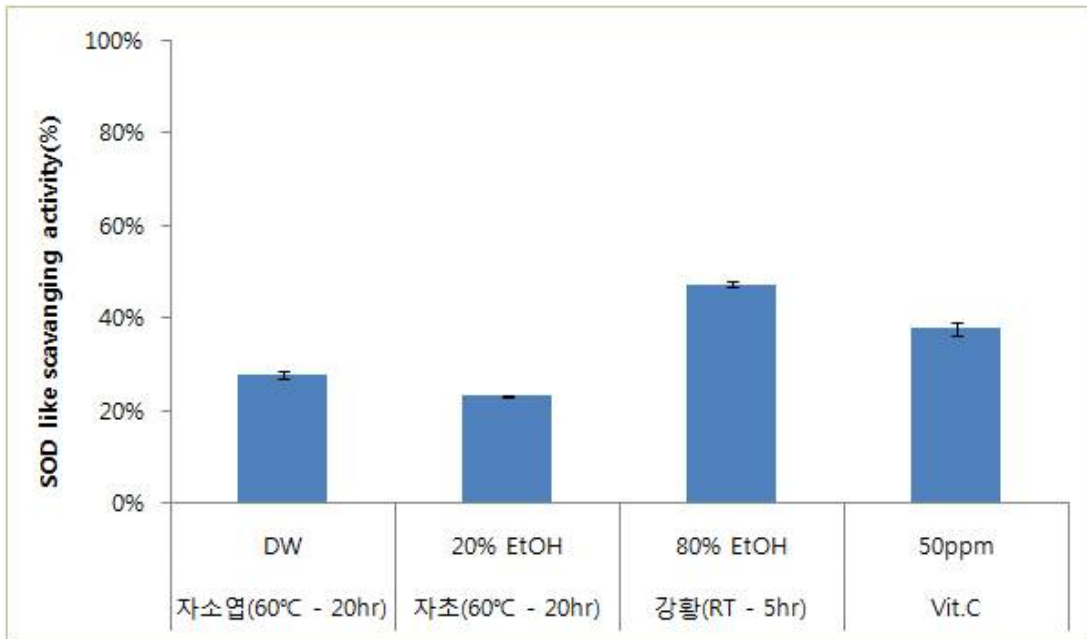
- Total flavonoid 함량 측정



- Total polyphenol 함량 측정



- Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정



- 색가측정 결과

품목 및 계산식	최종색가
$\text{자소엽} \left( E \frac{10\%}{1\text{cm}} \right) = \frac{0.012 \times 1,000}{1(\text{g})} \times 3(\text{회석배수})$	E1cm/10% = 36
$\text{자초} \left( E \frac{10\%}{1\text{cm}} \right) = \frac{0.01275 \times 1,000}{1(\text{g})} \times 4(\text{회석배수})$	E1cm/10% = 51
$\text{강황} \left( E \frac{10\%}{1\text{cm}} \right) = \frac{0.0104 \times 1,000}{1(\text{g})} \times 5(\text{회석배수})$	E1cm/10% = 52

▶ 안토시아닌 나노 복합체 색소의 안전성 확보 (적자색, 녹황색)

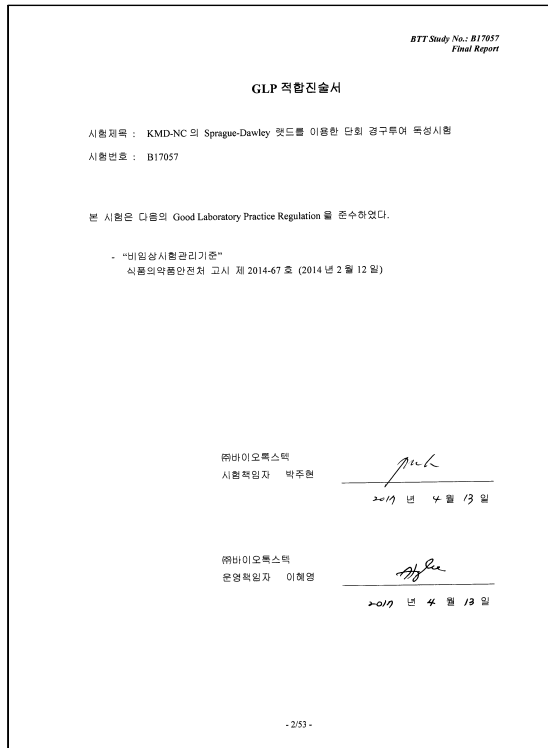
○ 품목허가 및 섭취 안전성에 대한 데이터를 확보하기 위해 독성실험 진행

- 일반 독성 시험

· 단회 투여 시험(Acute toxicity test): 단회 투여하여 나타나는 독성을 관찰하는 시험.

: 단회 투여 시험 최종 보고서

본 시험의 조검 하에서 KMD-NC(적자색)를 단회 경구투여한결과, 수컷, 암컷 모두 5,000 mg/kg 이상의 농도에서 치사량이 확인될 것으로 예상됨.



요약

본 시험은 시험물질인 KMD-NC 를 Sprague-Dawley 계 알수 6 주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 처사량을 구하기 위하여 실시하였다.

연구성은 시험물질 5,000 mg/kg 투여군과 대조군 (주사용수)으로 구성하였고, 군당 알수 각 5 마리에 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14 일 동안 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

알수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 **관찰되지** 않았다. 일반증상에서는 알수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 시험물질 흡입변, 설사, 연변 또는 경역변이 관찰되었다. 체중 및 부검에서 시험물질에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 KMD-NC 를 알수 랫드에 단회 경구투여 한 결과, 개략의 처사량은 알수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

I. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

알수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 KMD-NC 를 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 처사량을 구하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation 을 준수하였다.

-“비임상시험관리기준”  
식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014년 2월 12일)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

-“의약품등의 독성시험기준”  
식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호 (2015년 11월 11일)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (개정 1991년 5월 31일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제 13023 호)에 근거한 ㈜바이오텍스텍의 동물실험윤리위원회에 의뢰 승인되었다. (승인번호: 170097).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭 ㈜케이메디  
주소 우 06106 서울특별시 강남구 논현로 652 한일빌딩 5층  
TEL +82-2-3443-9252 FAX +82-2-3444-9252

• 2주 반복 경구투여 독성시험

: 본 시험의 조건 하에서 KMD-NC(적자색)를 랫드에 2주 반복 경구 투여한 결과, 반복투여 독성 시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해도 될것으로 판단됨



최종보고서

KMD-NC의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
2주 반복 경구투여 용량결정시험  
[Non-GLP]

시험번호: B17058

㈜바이오텍스텍  
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 33


최종보고서의 작성

시험제목 : KMD-NC의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여  
용량결정시험

시험번호 : B17058

본 시험은 Non-GLP 로 수행하였다.

㈜바이오텍스텍  
시험책임자 박주현   
2019년 6월 5일

㈜바이오텍스텍  
문양책임자 이해영   
2019년 6월 5일



요약

본 시험은 시험물질을 KMD-NC를 Sprague-Dawley (Ch:CDXSD)계 암수 랫드에 2주간 1일 1회 반복 경구 투여시에 대한 안전성을 평가하여 반복투여 독성시험의 영향설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 대조군 (주사용수)의 4군으로, 군당 암수 각 5 마리로 구성하였다.

관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중과 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정 및 부검시 육안적 검사를 수행하였다.

투여기간 동안, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망하는 관찰되지 않았다.

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 혼입분이 관찰되었고, 일부 개체에서 연변, 점액변 또는 설사가 일시적 또는 산발적으로 관찰되었다.

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다.

이상으로 KMD-NC를 랫드에 2주 반복 경구 투여한 결과, 반복투여 독성시험의 고유향은 5,000 mg/kg/day로 설정해도 될 것으로 판단됨.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질을 KMD-NC를 2주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복 경구투여 독성시험의 영향설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

Non-GLP

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 참고하여 실시하였다.

- "의약품등의 독성시험기준"
- 식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호 (2015년 11월 11일)

1.4 등록관리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제 13023호)에 근거한 ㈜바이오텍스틱의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다. (승인번호: 170153).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭: ㈜케이메디  
주소: 우 06106 서울특별시 강남구 논현로 652 한일빌딩 5층  
TEL: +82-2-3443-9252 FAX: +82-2-3444-9252

1.7 시험기관

명칭: ㈜바이오텍스틱  
주소: 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 53  
TEL: +82-43-210-7777 FAX: +82-43-210-7778

• 단회 투여 시험(Acute toxicity test): 단회 투여하여 나타나는 독성을 관찰하는 시험.

: 단회 투여 시험 최종 보고서

본 시험의 조건 하에서 KMI-NC(녹황색)를 단회 경구투여한결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.



최종보고서

KMI-NC의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
단회 경구투여 독성시험

시험번호: B17257

㈜바이오텍스틱  
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 53

GLP 적합진술서

시험제목: KMI-NC의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험  
시험번호: B17257

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- "비임상시험관리기준"
- 식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014년 2월 12일)

㈜바이오텍스틱  
시험책임자 박창성

2017년 7월 7일

㈜바이오텍스틱  
운영책임자 이혜영

2017년 7월 9일

요약

본 시험은 시험물질인 KMI-MNC 를 Sprague-Dawley 계 알수 6 주령 랫드에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 처사량을 구하기 위하여 실시하였다.

근구성은 시험물질 2,000 mg/kg 의 용량 및 대조군 (corn oil) 의 2 군으로 하고, 알수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

알수 2,000 mg/kg 투여군에서 사망하는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 KMI-MNC 를 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 처사량은 알수 모두 2,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

알수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 KMI-MNC 를 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 처사량을 구하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation 을 준수하였다.

- "비임상시험관리기준"
- 식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014년 2월 12일)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

- "의약품등의 독성시험기준"
- 식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호 (2015년 11월 11일)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제 13023호)에 근거한 ㈜바이오텍스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다. (승인번호: 170254).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

영칭 ㈜케이메디  
주소 우 06106 서울특별시 강남구 논현로 652 한일빌딩 5층  
TEL +82-2-3443-9252 FAX +82-2-3444-9252

▶ 천연색소 추출농축액을 활용한 제형의 다양화

○ 나노 복합물을 활용한 과립분말 제형

- 나노 복합물을 활용한 분말코팅제품

- 코팅제 HPMC의 농도는 2%로 진행하였으며, 슈가스피어(seed)는 추출농축액과 1 : 3, 1 : 5의 비율로 각각 진행하였다.
- 분말코팅화 작업 조작조건

(건조온도 60°C, damper 35%에서 분사압력 0.bar - 2.0bar, 분사량 0.5Hz - 1.5Hz 로 두 조건을 조절하여 분말작업 최적조건을 설정하였다. 코팅작업 시 코팅제(HPMC)의 무게로 인한 유동의 어려움으로인해 45%로 상향조치취하여 실시하였다. 최종 유동층과립 건조기 분말코팅화작업 조건은 건조온도 60°C, damper 45%에서 분사압력 2.5bar, 분사량 1.0Hz로 설정하였다.)



HPMC , 슈가스피어



### 유동층과립건조기 및 원리

- 유동층과립건조기 및 나노 복합물을 활용한 분말코팅 제형화



시드배합비율 1: 3



시드배합비율 1: 5



유동층과립건조기를 활용한 코팅분말 (예시 : 자초)

○ 천연색소의 제품 적용 테스트 및 시제품 개발 (빙과류, 음료류 등)

- 시제품 개발용 추출액

			
강황추출액(에탄올80%) 4brix	강황농축액(20brix)	자소엽추출액 (열수+ 0.5%구연산)	자소엽농축액(20brix)

- 아이스크림 시제품 생산 배합비 설정

			
강황 나노킴플렉스 조성물 3%	강황 나노킴플렉스 조성물 5%	자소엽 나노킴플렉스 조성물 5%	자소엽 나노킴플렉스 조성물 10%

아이스크림 기본 배합조성물

정제수, 백설탕, 혼합분유[탈지분유(우유)85%, 탈염유청퍼미에이트15%]. 테어리스프레드[유지방63%, 크림(우유)37%], 물엿, 가당연규[원유84.84%, 설탕, 유당], 우유0.67%,

혼합제제1(글리세린지방산에스테르, 로커스트콩검, 카라기난, 메타인산나트륨, 알긴산나트륨, 구아검,

포도당)

혼합제제2(로커스트콩검, 산탄검, 텍스트린)

혼합제제3(프로필렌글리콜, 연유, 아라비아검, 글리세린, 합성착향료(바닐라향))



- 천연색소의 제품 적용 제품 및 시제품 생산과정

· 아이스크림



배합

냉각



부적합검열 및 포장

생산

· 아이C (어린이용 비타민류) & 음료



추출/농축



진공건조기



과립건조기



음료포장기



스틱 포장기



과립 포장작업

- 천연색소의 제품 적용 제품 및 시제품
- 아이스크림(시제품)



· 어린이용 액상음료(제품)



· 어린이용 분말 비타민(제품)



· 면류 (천연 황색색소 함유)(시제품)



○ 대량생산 최종공정



1. 추출



2. 여과



3. 냉각



4. 농축



5-1. 유동층과립건조기(과립분말제조)



5-1. 아이스크림 제조



▶ 산업화 적용 테스트

○ 제품 원가 산정

### 제 조 원 가 계 산 서

품 명 : 자초 색소(액상,수용성)	생산량 : 180kg	원료사용량 : 500kg
규 격 : kg 색 가 : Elcm/10%=50이상	에탄올 20% 추출	유통기간 :

구 분 (비 목)		금 액	구 성 비 (%)	비 고 (내용)
재 료 비	직접 재료비	8,250,000		자초(500kg×12,500원=6,250,000원)
		1,820,000		추출용메탈콜(1000L×1,820=1,820,000원)
	간접 재료비	360,000		용기(500ml×360원×1,000원=360,000원)
	<b>소 계</b>	<b>10,430,000</b>		
노 무 비	직접 노무비	3,000,000		1개월기준(인건비2명 1개월×3,000,000)
	간접 노무비	2,600,000		10일기준(일용인건비4명 65,000원×4명×10일)
	<b>소 계</b>	<b>1,000,000</b>		
제 조 원 가  경 비	전력비	2,500,000		전기세(1개월분)
	수도광열비	1,000,000		수도세(1개월분)
	운반비			
	감가상각비			
	수리수선비			
	시험검사비	350,000		영양성분검사:1회×350,000원
		200,000		일반시험검사:1회×200,000원
	보험료	50,000		소비자배상책임보험:1개월×250,000원
		833,000		화재보험료(10,000,000원÷12개월)
	복리후생비			
	보관비			
	외주가공비			
	소모품비			
	여비·교통비·통신비			
	세금과 공과금			
폐수처리분담금				
도서인쇄비				
지급수수료	50,000		방충,방서수수료(600,000원÷25일)	
그밖의 법정경비				
	<b>소 계</b>	<b>4,983,000</b>		
<b>합 계</b>		<b>21,013,000</b>		
일 반 관 리 비 (5%)		1,050,650		
이 윤 (10%)		2,101,300		
<b>총 원 가</b>		<b>24,164,950</b>	<b>24,164,950원÷180kg= 134,000원</b>	

※ 적무색소 1kg = 102,000원대

## 제 조 원 가 계 산 서

품 명 : 자소엽색소(액상,수용성)	생산량 : 220kg	원료사용량 : 500kg
규 격 : kg 색 가 : E1cm/10%=30이상	물 추출	유통기간 :

구 분 (비 목)		금 액	구 성 비 (%)	비 고 (내 용)
재 료 비	직접 재료비	8,250,000		자소엽(500kg×10,000원=5,000,000원)
	간접 재료비	360,000		용기(100ml×360원×1,000원=360,000원)
	소 계	120,000		산도조절제 (40kg × 3,000원 = 120,000)
<b>소 계</b>		<b>8,730,000</b>		
노 무 비	직접 노무비	3,000,000		1개월기준(인건비2명 1개월×3,000,000)
	간접 노무비	2,600,000		10일기준(일용인건비4명 65,000원×4명×10일)
	소 계	1,000,000		
제 조 원 가	전력비	2,500,000		전기세(1개월분)
	수도광열비	1,000,000		수도세(1개월분)
	운반비			
	감가상각비			
	수리수선비			
	시험검사비	350,000		영양성분검사:1회×350,000원
		200,000		일반시험검사:1회×200,000원
	보험료	50,000		소비자배상책임보험:1개월×250,000원
		833,000		화재보험료(10,000,000원÷12개월)
	경비			
	복리후생비			
	보관비			
	외주가공비			
	소모품비			
	여비·교통비·통신비			
세금과 공과금				
폐수처리분담금				
도서인쇄비				
지급수수료	50,000		방충,방서수수료(600,000원÷25일)	
그밖의 법정경비				
소 계	4,983,000			
합 계	19,313,000			
일 반 관 리 비 (5%)	965,650			
이 윤 (10%)	1,931,300			
<b>총 원 가</b>	<b>22,209,950</b>	<b>22,209,950원÷220kg= 101,000원/kg</b>		

※ 적양배추색소 kg (색가100이상)= 146,300원대

## 제 조 원 가 계 산 서

품 명 : 강황색소(액상,수용성)	생산량 : 423kg	원료사용량 : 500kg
규 격 : kg	에탄올 80% 추출	유통기간 :
색 가 :Elcm/10%≒100이상		

구 분 (비 목)		금 액	구 성 비 (%)	비 고(내용)	
재 료 비	직접 재료비	5,750,000		강황(500kg×11,500원=5,000,000원) 3회반복 추출	
		7,280,000		알콜(4000kg×1,820원 = 7,280,000	
	간접 재료비	423,000		용기(423개×1,000원=423,000원)	
	<b>소 계</b>	<b>13,453,000</b>			
노 무 비	직접 노무비	3,000,000		1개월기준(인건비2명 1개월×3,000,000)	
	간접 노무비	2,600,000		10일기준(일용인건비4명 65,000원×4명×10일)	
	<b>소 계</b>	<b>5,600,000</b>			
제 조 원 가	전력비	2,500,000		전기세(1개월분)	
	수도광열비	1,000,000		수도세(1개월분)	
	운반비				
	감가상각비				
	수리수선비				
	시험검사비		350,000		영양성분검사:1회×350,000원
			200,000		일반시험검사:1회×200,000원
	보험료		50,000		소비자배상책임보험:1개월×250,000원
			833,000		화재보험료(10,000,000원÷12개월)
	경 비	복리후생비			
		보관비			
		외주가공비			
		소모품비			
		여비·교통비·통신비			
		세금과 공과금			
		폐수처리분담금			
도서인쇄비					
지급수수료		50,000		방충,방서수수료(600,000원÷25일)	
그밖의 법정경비					
	<b>소 계</b>	<b>4,983,000</b>			
<b>합 계</b>		<b>24,036,000</b>			
일 반 관 리 비 (5%)		1,201,800			
이 윤 (10%)		2,403,600			
<b>총 원 가</b>		<b>27,641,400</b>	<b>27,641,400원÷423kg= 65,300원/kg</b>		

※ 심황(울금)색소 kg (색가300이상)= 67,000원대

○ 관능 평가 수행

- 모든 일반패널은 관능검사의 취지에 대한 설명을 듣고 동의서에 서명한 후 검사에 임했음. 평가자는 해당 시제품을 섭취한 후 주어진 관능검사지의 각 문항에 대해 직접 표기하였음. 개인적인 의견이나 개선사항에 대해서도 설문지의 해당 항목에 각각 작성하였음.(관능평가 동의서, 관능평가지)
- 관능평가를 위한 일반 패널의 인구통계학적 특성
  - 어린이 비타민 분말 “아이C” 제품의 관능평가에 참여한 일반 패널은 총 20명으로 일반 패널 대상자의 인구학적 정보는 아래 표와 같음.

연령(세)	남성	여성	합계
20~29	2	5	7
30~39	4	2	6
40~49	3	2	5
50~59	1	1	2
합계	10	10	20

- “아이C” 외질

- 색의 기호도

; “아이C”의 색에 대한 기호도를 각 문항의 응답자와 그 비율을 아래의 표에 나타내었음.

항목		응답자(명)	백분율(%)
외형 (천기곽향원의 색)	매우 싫다	0	-
	싫다	0	-
	약간 싫다	0	-
	보통이다	6	30
	<b>약간 좋다</b>	<b>8</b>	<b>40</b>
	좋다	4	20
	매우 좋다	2	10
합계		20	100

; “아이C” 색의 기호도에서 “약간 좋다”는 8명(40%)이었으나, “보통이다”, “좋다”, “매우 좋다”고 긍정적인 답변을 보인 응답자는 12명(60%)으로 색의 기호도에 대해서는 비교적 기호성이 좋은 것으로 생각됨.

- “아이C” 내질

• 향의 기호도

; “아이C” 제품의 향에 대한 기호도는 각 문항의 응답자와 그 비율을 아래의 표에 나타내었음.

항목		응답자(명)	백분율(%)
“아이C”의 향	매우 싫다	0	-
	싫다	0	-
	약간 싫다	0	-
	<b>보통이다</b>	<b>11</b>	<b>55</b>
	약간 좋다	8	40
	좋다	1	5
	매우 좋다	0	-
합계		20	100
“아이C”의 방향성	매우 약하다	0	-
	약하다	4	20
	약간 약하다	5	25
	<b>보통이다</b>	<b>9</b>	<b>45</b>
	약간 강하다	2	10
	강하다	0	-
	매우 강하다	0	-
합계		20	100

; “아이C”의 향은 “보통이다”가 11명(55.0%)으로 가장 높았으며, 그 다음으로 “약간 좋다”로 응답한 사람이 8명(40.0%)로 높았으며, 전체적으로 긍정적인 응답률이 높음.

; “아이C”의 방향성은 입안에서 느껴지는 향을 말하는 것으로 보통으로 느끼는 응답자가 9명(45.0%)으로 가장 높았음. 전체적으로 방향성을 느끼는 사람들이 많았으며, 이는 “아이 C” 특유의 향으로 인한 것으로 생각됨.

• 맛의 기호도

; “아이C” 제품의 맛에 대한 기호도는 각 문항의 응답자와 그 비율을 아래의 표에 나타내었음.

항목		응답자(명)	백분율(%)
“아이C”의 맛 (쓴맛)	매우 약하다	-	
	약하다	5	25
	<b>약간 약하다</b>	<b>7</b>	<b>35</b>
	보통이다	5	25
	약간 강하다	3	15
	강하다	-	
	매우 강하다	-	
합계		20	100
“아이C”의 맛 (신맛)	매우 약하다	-	
	약하다	4	20
	약간 약하다	6	30
	<b>보통이다</b>	<b>9</b>	<b>45</b>
	약간 강하다	1	5
	강하다	-	
	매우 강하다		
합계		20	100
천기곽향원의 맛 (단맛)	매우 약하다	-	
	약하다	-	
	약간 약하다	2	10
	보통이다	5	25
	<b>약간 강하다</b>	<b>8</b>	<b>40</b>
	강하다	5	25
	매우 강하다	-	
합계		20	100

- ; “아이C” 제품의 쓴맛은 “약하다”가 7명(35.0%)로 가장 높았으며, “약하다 ”와 “보통이다”가 각각 25%, “약간 강하다” 15%로 전반적으로 쓴맛은 약하다는 답변이 많았음.
- ; “아이C” 제품의 신맛은 “보통이다”가 9명(45.0%)로 가장 높았으며, “약간 약하다” 6명(30.0%), “약하다” 4명(20%), “약간 강하다” 1명(5%)로 비교적 신맛을 느끼는 응답자가 많았음.
- ; “아이C” 제품의 단맛은 “약간 강하다”가 8명(40%)로 가장 높았고, 전체적으 “보통이다” 5명(25%), “강하다” 5명(25%)의 응답이 많아 비교적 단맛이 강하다는 의견이 많았음.

○ 관능평가 수행 설문지 및 동의서

**아이 C 관능 검사**

연 령 : 10대 / 20대 / 30대 / 40대 / 50대 / 60대

성 별 : 남  / 여  이 름 : \_\_\_\_\_

본 관능평가는 학술을 목적 이외에는 사용되지 않습니다.

게시된 시료의 맛을 보고, 그 시료에 대하여 귀하가 느끼는 좋아하거나 싫어하는 정도를 가장 잘 나타낼 기호-확도의 해당 위치에 V표 해주십시오. 그리고 그에 대한 이유나 의견을 간단히 적절하여 주십시오. 시료를 맛보기 전에는 반드시 입을 충분히 헹구어 주십시오.

===== 아래의 질문을 읽고 답하십시오.=====

**1. 시료의 색은 어떨습니까? (외관의 기호도)**

1. 보기에 매우 싫다.  
 2. 보기에 싫다.  
 3. 보기에 약간 싫다.  
 4. 보기에 보통이다.  
 5. 보기에 약간 좋다.  
 6. 보기에 좋다.  
 7. 보기에 매우 좋다.

의견: \_\_\_\_\_

**2. 시료의 향은 어떨습니까? (향의 기호도)**

1. 매우 싫다.  
 2. 싫다.  
 3. 약간 싫다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 좋다.  
 6. 좋다.  
 7. 매우 좋다.

의견: \_\_\_\_\_

**3. 시료의 병량성은 어느 정도입니까? (향의 강도)**

1. 매우 약하다.  
 2. 약하다.  
 3. 약간 약하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 강하다.  
 6. 강하다.  
 7. 매우 강하다.

의견: \_\_\_\_\_

**4. 시료의 쓴맛은 어느 정도입니까? (맛의 강도)**

1. 매우 강하다.  
 2. 강하다.  
 3. 약간 강하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 약하다.  
 6. 약하다.  
 7. 매우 약하다.

의견: \_\_\_\_\_

**5. 시료의 신맛은 어느 정도입니까? (맛의 강도)**

1. 매우 강하다.  
 2. 강하다.  
 3. 약간 강하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 약하다.  
 6. 약하다.  
 7. 매우 약하다.

의견: \_\_\_\_\_

**6. 시료의 단맛은 어느 정도입니까? (맛의 강도)**

1. 매우 약하다.  
 2. 약하다.  
 3. 약간 약하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 강하다.  
 6. 강하다.  
 7. 매우 강하다.

의견: \_\_\_\_\_

**7. 시료의 질감성은 어떨습니까? (텍스처)**

1. 매우 약하다.  
 2. 약하다.  
 3. 약간 약하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 강하다.  
 6. 강하다.  
 7. 매우 강하다.

의견: \_\_\_\_\_

**8. 시료의 점착성은 어떨습니까? (텍스처)**

1. 매우 약하다.  
 2. 약하다.  
 3. 약간 약하다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 강하다.  
 6. 강하다.  
 7. 매우 강하다.

의견: \_\_\_\_\_

**9. 시료의 전체적인 맛은 어떨습니까? (전체적인 맛의 기호도)**

1. 매우 싫다.  
 2. 싫다.  
 3. 약간 싫다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 좋다.  
 6. 좋다.  
 7. 매우 좋다.

의견: \_\_\_\_\_

**10. 시료의 전체적인 기호도는 어떨습니까? (전반적인 기호도)**

1. 매우 싫다.  
 2. 싫다.  
 3. 약간 싫다.  
 4. 보통이다.  
 5. 약간 좋다.  
 6. 좋다.  
 7. 매우 좋다.

의견: \_\_\_\_\_

설문에 응해주셔서 대단히 감사합니다.

## 관능평가 참여 동의서

귀하를 본 관능검사의 일반과제로 초청합니다. 본 검사의 참여결정은 전적으로 귀하의 자발적 판단에 의한 것이며, 귀하의 자유의사에 따라 언제든지 검사의 중단을 결정할 수 있습니다.

연구제목: 알리지 저감 색소를 첨가한 어린이용비타민분말 "아이디" 관능 평가  
연구기관: 케미메디

본 연구의 목적은 알리지 저감 색소를 첨가하여 품질을 개선한 '아이디' 제품을 개발하기 위함으로 천연 색소를 함유한 제품에 대하여 크게 10가지의 변수에 대해 관능평가를 실시하고자 합니다. 제시된 시제품을 맛보신 후, 그 시제품에 대하여 귀하가 느끼는 좋거나 싫은 정도(기호 및 강도)를 나누어 드리는 관능검사 설문지에 작성해주시면 됩니다.

본 검사에서 수집된 개인정보와 내용은 관능을 목적 이외의 다른 목적으로 사용되지 않습니다.

본인은 본 관능검사의 목적과 진행과정에 대해 충분히 이해하였으며, 본 검사에 참여하는 것에 대하여 자발적으로 동의합니다.

2017년 월 일

성명: (서명)

### ▶ 농민 계약재배

- 자소엽 계약재배 : 2930 kg 수확

#### 천연색소 원료 수매 약정서

안동시농업기술센터에서 추진하는 천연색소 원료 수매 약정을 함에 있어 농가개인(성명)(이하"갑"이라 한다)과 안동시농업기술센터소장(이하 "을"이라한다)은 다음과 같이 수매출하 약정을 체결하고 상호 신의성실의 원칙에 따라 이를 이행할 것을 약정합니다.

매도인(갑) : (성명) [redacted]

매수인(을) : 안동시농업기술센터  
경북 안동시 경동로 [redacted]

수매출하 약정개요

- 품 목 : 자소엽(건)
- 수매약정량 : 1,200kg(약정사항에 포함된 개체만 수매)
- 정식예정일 : 약정 체결 후 농가 개별 진행
- 수확예정일 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.

약정(계약)일 : 2017. 02. 27.  
수매기간 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.

수매대금 지급 : 수매 후 15일 이내

연 락 처

- 갑의 연락처 : 안동시 서후면 [redacted]
- 을의 연락처 : 안동시농업기술센터 [redacted]

#### 천연색소 원료 수매 약정서

안동시농업기술센터에서 추진하는 천연색소 원료 수매 약정을 함에 있어 농가개인(성명)(이하"갑"이라 한다)과 안동시농업기술센터소장(이하 "을"이라한다)은 다음과 같이 수매출하 약정을 체결하고 상호 신의성실의 원칙에 따라 이를 이행할 것을 약정합니다.

매도인(갑) : (성명) [redacted]

매수인(을) : 안동시농업기술센터  
경북 안동시 경동로 [redacted]

수매출하 약정개요

- 품 목 : 자소엽(건)
- 수매약정량 : 1,800kg(약정사항에 포함된 개체만 수매)
- 정식예정일 : 약정 체결 후 농가 개별 진행
- 수확예정일 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.

약정(계약)일 : 2017. 02. 27.  
수매기간 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.

수매대금 지급 : 수매 후 15일 이내

연 락 처

- 갑의 연락처 : 안동시 일직면 [redacted]
- 을의 연락처 : 안동시농업기술센터 [redacted]



## - 자초 계약재배 : 2510 kg 수확

### 천연색소 원료 수매 약정서

안동시농업기술센터에서 추진하는 천연색소 원료 수매 약정을 함에 있어 농가개인(성명)(이하"갑"이라 한다)과 안동시농업기술센터소장(이하 "을"이라한다)은 다음과 같이 수매출하 약정을 체결하고 상호 신의성실의 원칙에 따라 이를 이행할 것을 약정합니다.

- 매도인(갑) : (성명) [REDACTED]
- 매수인(을) : 안동시농업기술센터  
경북 안동시 경동로 [REDACTED]
- 수매출하 약정개요
  - 품 목 : 자초(생)
  - 수매약정량 : 1,400kg(약정사항에 포함된 개체만 수매)
  - 정식예정일 : 약정 체결 후 농가 개별 진행
  - 수확예정일 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.
- 약정(계약)일 : 2017. 02. 27.  
수매기간 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.
- 수매대금 지급 : 수매 후 15일 이내
- 연 락 처
  - 갑의 연락처 : 안동시 북후면 [REDACTED]
  - [REDACTED]
  - 을의 연락처 : 안동시농업기술센터  
[REDACTED]

### 천연색소 원료 수매 약정서

안동시농업기술센터에서 추진하는 천연색소 원료 수매 약정을 함에 있어 농가개인(성명)(이하"갑"이라 한다)과 안동시농업기술센터소장(이하 "을"이라한다)은 다음과 같이 수매출하 약정을 체결하고 상호 신의성실의 원칙에 따라 이를 이행할 것을 약정합니다.

- 매도인(갑) : (성명) [REDACTED]
- 매수인(을) : 안동시농업기술센터  
경북 안동시 경동로 [REDACTED]
- 수매출하 약정개요
  - 품 목 : 자초(생)
  - 수매약정량 : 1,200kg(약정사항에 포함된 개체만 수매)
  - 정식예정일 : 약정 체결 후 농가 개별 진행
  - 수확예정일 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.
- 약정(계약)일 : 2017. 02. 27.  
수매기간 : 2017. 11. 01. ~ 11. 30.
- 수매대금 지급 : 수매 후 15일 이내
- 연 락 처
  - 갑의 연락처 : 안동시 서후면 [REDACTED]
  - [REDACTED]
  - 을의 연락처 : 안동시농업기술센터  
[REDACTED]

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

### 1절 목표달성도

#### 1. 연구 성과 목표

성과목표	사업화지표									연구기반지표									
	특허		기술실시 (이2전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책·활용·홍보		식품·천연색소개발	적용시제품
	출원	등록	권수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책·활용	홍보전시		
										SCI	비SCI								
최종목표	2	2	1		1	1		1			2	1					2	2	2
1차년도	목표	1						1									1	1	
	실적	2						1									1	1	
2차년도	목표	1	2	1		1	1				2	1					1	1	2
	실적	2				2											1	1	2
소계	목표	2	2	1		1	1				2	1					2	2	2
	실적	4				2											2	2	2
종료 1차년도		4	1	1		1						1							
종료 2차년도											2								
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소계		4	1	1		1													
합계		4	4	1	1	2	1				2	1					2	2	2

#### 2. 성과 목표에 대한 평가

성과목표	자 체 평 가
천연 색소 원료 및 추출 개발	약용작물 유래 적색소 및 황색색소의 최적 추출 조건 확립
천연 색소의 기능성 탐색 및 나노화	각 원료의 항염증, 항알러지 효과 기능성 확인 안토시아닌 함량 확인으로 기능성 확인 열안정성 확인, 광안정성 확인, PH 안정성 확인
대량생산공정 확립 사업화 - 고용창출	up-scale 공정확립을 통한 대량생산에 따른 추출농축액 품질 균일화 확립 신규인력 채용
정책활용·홍보 - 홍보전시	2016.09.30.~2016.10.9 안동 탈춤축제 참가 및 홍보 전시 2017.11.07.-11.10 화순 블렌딩국제차문화제(전시일 2017.11.07.~11.10)
식품용 천연색소 개발	천연 색소 원료 개발 완료
천연색소 적용 제품 및 시제품 개발	제품 : 어린이용 음료, 어린이용 비타민C분말 시제품 : 면류, 아이스크림

## 2절. 관련분야 기여도

- 원료의 최적 추출방법을 통한 대량생산 표준화 확립
- 본 연구과제를 위한 고용창출 사업화 성과
- 제품 제작 완료 및 시제품제작을 통한 다양한 제품적용으로 시장 점유율 확대 가능성 확인
- 나노화 복합물을 이용한 알러지 저감 색소개발로 인해, 알러지 관련 의료시장 진입 가능

## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

1. 연구수행 결과로 이루어진 상품화된 알리지저감 색소를 활용한 제품 2종 (비타민 분말, 어린이용 음료)의 매출 발생
- 본 연구를 통하여 알리지 저감 색소를 첨가한 제품을 본격 시장에 진입하기 위해 홈쇼핑, (주)케미메디의 자체 온라인 쇼핑몰에서 판매예정다양한 매체를 이용하여 홍보 진행
  - 관련 제품 및 산업 분야의 진입 가능성 확보
    - 음료 시장과 병과류 시장의 규모와 식품 첨가물 Trend 의 변화
      - 천연 색소 시장은 음료나 과자, 병과류 등의 시장 수요가 꾸준히 증가 추세를 보임
      - 국내 음료 시장은 2012년 현재 3조 7,527억원 규모임, 품목별로는 탄산음료, 스포츠음료, 생수, 음용차, 초코드링크는 전년 대비 판매액이 증가한 반면, 두유, 음용식초, 과일음료, 야채음료는 감소함. 음료 시장 내에서 가장 높은 판매액 점유율을 보이는 품목은 탄산음료로 전년 대비 6.5% 성장한 9,522억원 규모. 이온 음료, 스포츠 음료는 2012년 현재 전년 대비 25.1% 급성장을 하며 5,429억원의 판매액을 나타내고 있다. 최근 Trend 는 천연색소가 함유된 비타민 음료가 꾸준한 인기를 끌고 있으며, 탄산음료나 캔디 등에도 천연색소를 가미하여 고급화를 시도하고 있음.



- 인공 감미료를 뺀 'Natural 100%, All natural(천연재료 100%, 100% 내추럴)' 문구 사용으로 천연재료 사용을 강조하여 소비자에게는 보다 자연과 가까운 맛을 느낄 수 있는 건강한 브랜드라는 이미지를 가지게 함
- 소비자들의 40% 이상이 건강 관련 식품의 “식품 첨가물 무첨가, 합성 착색료 무첨가, 천연색소, 천연향료, 유기농” 과 같이 식품 첨가물 역시 기능성을 가진 제품을 선호.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

○

## 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

○ 일반

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 기술적 위험요소 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자 추출시 폐놀계 물질 사용</li> <li>- 미생물 폐기물 발생</li> <li>- 유기용매 폐수 발생</li> </ul> <p>○ 안전관리대책</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자 추출시 폐놀계 물질 사용: 반드시 가글 사용하고 후드에서 작업토록 한다.</li> <li>- 연구실 안전수칙과 생물위해요소에 대한 교육을 연구원들에게 주지시키고 실험 수행시 개인보호장비 (PPE) 착용하고 수행토록 한다.</li> <li>- 미생물 폐기물은 정해진 절차를 따라 고압살균 후 안전용기에 담아 처리토록 한다.</li> <li>- 유기용매의 경우 실험에서 나오는 폐수를 분리수거하여 별도 처리한다.</li> </ul>		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화된 천연색소의 발굴 및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공 정 표준화를 통한 산업화	(주)케이 메디	출원인	대한민국		출원일: 2016.08.22	사사기재 완료	
2	특허	안토시아닌 나노 복합체를 포함하는 색소 조성물	(주)케이 메디	출원인	대한민국		출원일: 2016.10.21	사사기재 완료	
3	특허	상표출원 29류“LOBERE”	(주)케이 메디	출원인	대한민국		출원일: 2017.03.24	사사기재 완료	
4	특허	상표출원 29류“로베르”	(주)케이 메디	출원인	대한민국		출원일: 2017.03.24	사사기재 완료	
5	논문	알레르기 저감 효과를 가진 적색과 황색 천연 색소의 개발연구	(주)케이 메디		한국식품과 학회지	0.5	-		
6	논문	자소염, 자초 추출물에 구연산 첨가가 마우스동물모델에서 항알레르기 활성에 미치는 영향	(주)케이 메디		식품저장유 통학회지	1.06	-		

## 11. 기타사항

							코드번호	D-13		
○ 사업화										
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화 명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	고용 창출	고용 창출	안동	1명		(재)한국천연색소산업화센터			-	
○ 계약재배										
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	계약금액			
1	계약재배	계약재배	안동	4명	자소엽, 자초 계약재배	(재)한국천연색소산업화센터				
○ 보고서 원문										
연도	보고서 구분					발간일	등록번호			
2017	KMI-NC의 단회 경구투여 독성시험					2017.04.13	시험번호 B17057			
2017	KMD-NC의 2주 반복 경구투여 독성시험					2017.06.05	시험번호 B17058			
2017	KMD-NC의 단회 경구투여 독성시험					2017.04.13	시험번호 B17257			

## 12. 참고문헌

		코드번호	D-14	
1. You, J.S., et al., Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> Kor. J. Pharmacogn., 2012. 43(2): p. 163-166.				
2. Oh, H.A., et al., Effect of <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. <i>Experimental Biology and Medicine</i> 2011. 236: p. 99-106.				
3. Makino, T., et al., Effect of oral treatment of <i>Perilla frutescens</i> and its constituents on type-I allergy in mice. <i>Biol Pharm Bull</i> , 2001. 24(10): p. 1206-9.				
4 Shin, T.Y., et al., Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by <i>Perilla frutescens</i> . <i>Immunopharmacol Immunotoxicol</i> , 2000. 22(3): p. 489-500.				
5. Oh, H.A., et al., Anti-allergic effects of <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> Kudo 30% ethanol extract powder. <i>Oriental Pharmacy and Experimental Medicine</i> , 2010. 10(3): p. 173-183.				