819004-02

폴리아민 고함유고추의 가공제품개발

2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

농식품연구성과후속지원사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003594-01

폴리아민 고함유 고추의 가공 제품개발

2021. 7. 22

주관연구기관 / ㈜ 해피바이오텍

공동연구기관 / 강원대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "폴리아민 고함유고추의 가공 제품 개발"(개발기간 : 2019. 5. ~ 2021. 1.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 7. 22

주관연구기관명 : ㈜ 해피바이오텍 (대표자) 양 승 균 (인)
공동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 신 대 용 (인)

주관연구책임자 : 양 승 균
공동연구책임자 : 이 득 찬

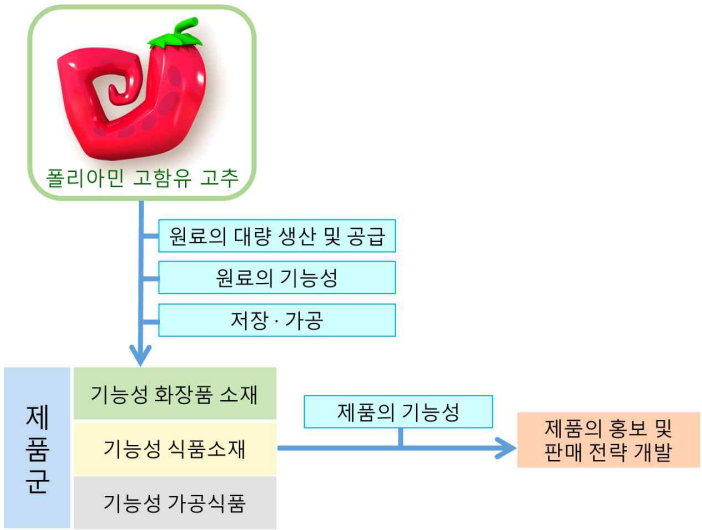
국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요 약 문 >

사업명	농식품기술개발사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)	농식품연구성과후속지원사업 벤처창업바우처지원과제	연구개발과제번호	819004-02

기술분류							
국가과학기술 표준분류	LB	30 %	LB0207	20 %	LB1801, LB0321	50%
농림식품 과학기술분류	AA	30 %		%		%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	
연구개발과제명	폴리아민 고함유 고추의 가공 제품 개발
전체 연구개발기간	2019.05.10. ~ 2021.01.09
총 연구개발비	총 220,000 천원 (정부지원연구개발비: 175,000천원, 기관부담연구개발비 : 45,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[0] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ] 기술성숙도 (해당 시 기재) 착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	기능성 작물을 활용한 시제품 제작
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	

연구개발 목표 및 내용	최종 목표	폴리아민 고함량 기능성 가공제품 개발
	전체 내용	

○ 연구 개발 내용

- 폴리아민 고함유 가공제품 개발
- 고추 폴리아민의 생리적 기능 검증

세부연구개발내용	수행결과
● 고추추출 폴리아민의 세포차원에서의 효능 평가	- 합성 폴리아민 및 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가

			(74쪽 중 3쪽) - 폴리아민에 의한 세포 증식 및 세포 단백질 증가 영향 검토 완료 - 폴리아민에 의한 항염증 활성 검토 완료 - 이들 결과는 현재 논문 투고(1편) 하였음
		● 고추로부터 폴리아민의 추출조건 및 부분정제 조건 검토	- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료 - 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료(특허 출원 1건) - 폴리아민 고함유 고추의 건조방법에 따른 함유량 비교 완료 - 폴리아민 고함유 고추의 저장조건에 따른 함유량 비교 완료
		● 폴리아민 고함유 고추추출물 식이 마우스의 혈액이행 검토	- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료 - 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있음 - 이는 추후 논문 투고(1편)를 계획하고 있음
		● 고추로부터 산업화 수준의 폴리아민 최적 추출 검토	- 폴리아민 고함유 고추로부터 분말상 식품소재 개발을 위한 추출공정 확립 - 폴리아민 고함유 고추로부터 액상 화장품 소재 개발을 위한 추출공정 확립
		● 5~100mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말상 소재개발	- 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 50mg/100g 식품소재 개발 - 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 200mg/100g 식품소재 개발 - 분석성적서
		● 10~200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발	- 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 10mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 200mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 분석성적서
		● 12mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 가공식품 개발	- 폴리아민 15mg/100g 함유 녹차아이스크림 제작

연구개발성과	○ 연구 개발 성과물 ● 폴리아민 고함유 고추추출물의 효능 검증(논문 투고 1편) - 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료 : 이는 폴리아민 고함유 추출물의 안정성을 검토한 연구 성과로서 식품 및 화장품 개발에 있어 안정성을 검토를 위한 기반으로 활용될 것임. - 폴리아민에 의한 세포증식 및 세포 단백질 발현 증가, 항염증 활성 확인 : 세포에서의 폴리아민 활성을 평가함으로써 폴리아민 고함유 고추 그 자체 및 개발 제품의 홍보에 사용 되어질 것으로 기대됨 - 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료

: 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행 중에 있으며 추후 폴리아민 고함유 고추 및 이를 이용한 제품의 홍보에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

● 폴리아민 고함유 고추 추출 조건 확립(특허출원 1건, 품종보호출원 1건)

- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료
  : 폴리아민 고함유 고추 재배를 위한 재배기간 및 재배지 등을 검토하였으며, 고농도의 고추 캡사이신은 추후 제품개발에 있어 제한적이므로 저함유 고추의 재배 조건 등을 검토 완료하였음.
- 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료
  : 폴리아민 고함유 고추의 폴리아민은 유리된 상태가 아닌 타 성분과 결합되어져 있는 것으로 판단됨에 따라 이들 고추로부터 고농도의 폴리아민을 추출하기 위한 여러 가지 용매들의 추출효율을 검토 함. 이들 고농도의 폴리아민 함유 추출물은 추후 가공제품 제작에 유용하게 활용될 것으로 기대됨.
- 폴리아민 고함유 고추의 저장 및 건조방법에 따른 함유량 비교 완료
  : 대부분의 농작물이 그렇듯이 고추 또한 재배 및 수확이 제한적인 농작물이므로 이들의 특정시기에의 수확에 따른 저장 및 건조 방법을 검토함으로써 폴리아민의 함량에 변화가 없는 조건을 마련함.
- 다량의 폴리아민 고함유 고추의 최적 추출 검토
  : 다량의 폴리아민 고함유 고추의 추출 조건을 최적화하기 위한 조건을 확립하였으며 이는 추후 식품 및 화장품 소재와 가공품 제작을 위해 고농도의 추출물이 유용하게 활용될 것으로 기대됨.

● 고추 폴리아민 고함유 소재 및 가공식품 개발(시제품 개발 5종)

- 10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종
  : 폴리아민 고함유 고추 추출물을 활용한 화장품 원료 개발함으로써 추후 항염증 등에 유용한 화장품 제품개발에 이용되어질 것으로 기대됨
- 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종
  : 폴리아민 고함유 동결고추추출물을 활용한 식품분말소재의 개발로 여러 가지 음식물에 첨가용도의 제품으로 활용되어질 것으로 기대됨
- 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발
  : 폴리아민 고함유 고추추출물 가공 녹차아이스크림을 개발함으로써 여러 가지 가공품으로의 가능성을 보임.

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과

○ 활용계획 및 기대효과

● 연구 개발 성과의 현장 적응 방안

- 폴리아민 고함유 고추을 농가에 위탁재배한 후 농가로부터 전량 수매함으로써 농가소득 증대 및 지역 활성화에 도움이 될 것으로 기대됨
- 위탁 재배 농가에 가공공장 설치로 시골 인력의 고용 증진이 기대됨

● 연구 개발 성과의 실용화 제품화 방안

- 폴리아민 고함유 고추를 풋고추 형태로 마트에 판매함으로써 anti-aging의 기능성을 부각시킬 수 있음.
- 파우치, 타블렛, 캡슐 등의 휴대성이 간편한 제품으로의 개발로 판매 증가가 기대됨

● 연구 개발 성과의 예상 활용 분야

- 건강기능성 성분 분석 체계 확립을 통한 주요 채소 작물에 확대 적용도 가능할 것으로 기대됨
- 건강기능성 고추를 활용한 기능부여 가공식품 산업 및 천연물 기원의 유용성

분을 활용한 화장품 소재 산업 육성 증진도 기대됨

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	○ 해당사항 없음

연구개발성과의 등록・기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1편 투고	1건 출원									1건 출원	

연구시설・장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ・장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	폴리아민	고추	기능성 식품	기능성 화장품	식품가공
영문핵심어 (5개 이내)	polyamine	pepper	functional food	functional cosmetic	food processing

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨자료

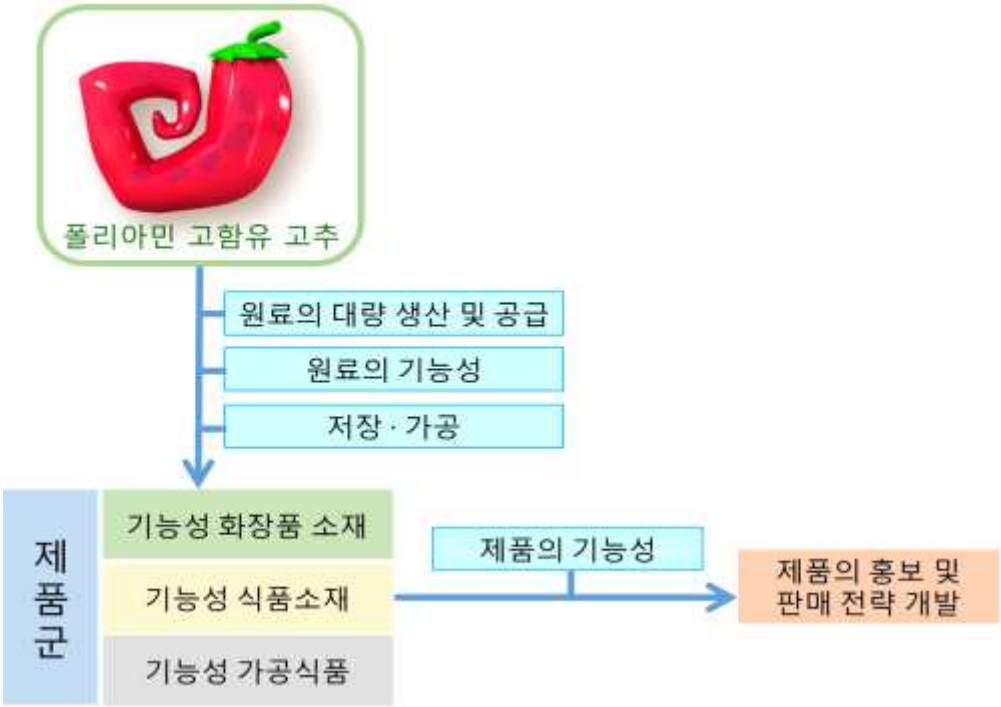
1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 연구개발 개념도

○ 연구개발 개념도

- 폴리아민 고함량 가공제품 개발
- 고추 폴리아민의 생리적 기능 검증
- 고 폴리아민 제품의 홍보 및 판매



나. 연구개발의 목표

○ 최종목표

- 폴리아민 고함유 고추 가공제품 개발

○ 세부목표

1) 고추 폴리아민의 생리적 기능 검증
   - 고추 폴리아민의 생리적 기능 검증
   - 고추 폴리아민의 혈액이행 분석
2) 폴리아민 고함유 가공제품 개발
   - 폴리아민 고함유 액상 화장품 소재 개발
   - 폴리아민 고함유 분말상 식품 소재 개발
   - 폴리아민 고함유 가공식품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발 개요

○ 연구개발 개요

- 농업생산성의 증가는 싸고 좋은 식품의 생산으로부터 부가가치가 높은 식품의 개발로 이어지며 기능성 식품이란 새로운 카테고리의 식품이 주목을 받고 있다.[1)]

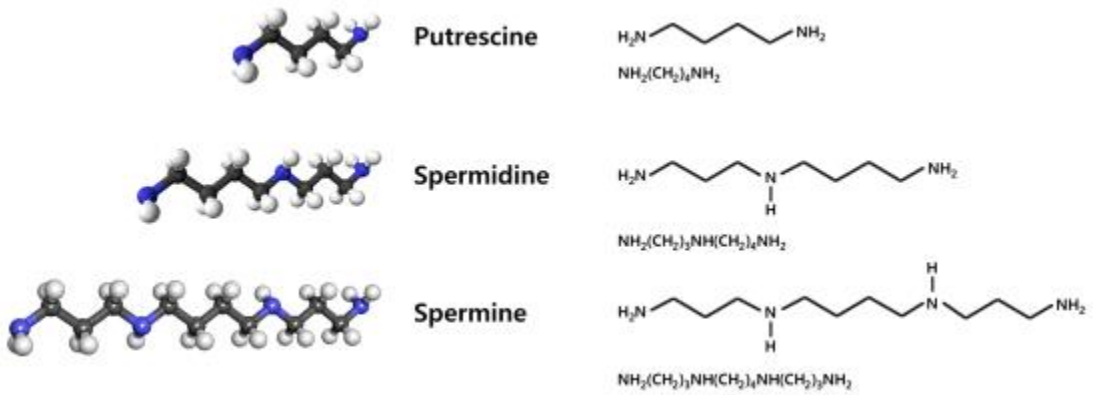
- 기능성 식품 : 식품에 물리적, 화학적, 생명 공학적 수법을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정한 작용이 발현되도록 부가가치를 부여한 식품군을 일컬으며, 종래의 수동적 영양의 공급원인 통상적인 식품으로부터 건강을 증진하는 기능을 가진 기능성 식품으로의 전환은 높은 부가가치의 부여가 뒤따름. 기능성 식품을 통하여 의료비 지출을 억제하는 효과를 기대하고 있으므로 기능성 식품은 전 세계를 대상으로 한 광대한 신시장이 형성되어 있다.[2, 3)]

- 작물의 식품학적 기능을 분자 수준에서 해명 가능하게 되어 새로운 생리 기능이 밝혀지게 되고 있으며, 식품의 원료가 되는 작물에 기능성을 부여하는 것은 새로운 기능성 식품의 개발을 가능하게 하고 있다.[4, 5, 6)]

- 기능성 작물의 개발은 식량 작물의 고부가치화로 국내에서의 농산물 생산 기반의 절대적 유지 및 국제적 경쟁력 제고에 크게 기여할 것으로 기대된다.

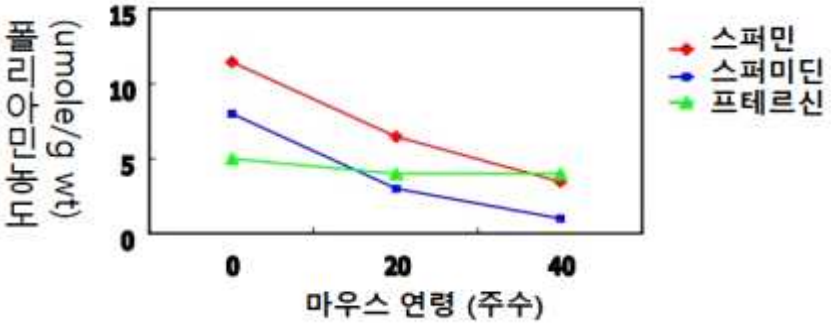
- 폴리아민은 아민기가 3개 이상 결합한 탄소사슬을 총칭한다. 아미노기가 2개 결합한 경우도 있다. 바이러스부터 인간까지 모든 생체에 함유하고 있으며 세포분열과 단백질 합성 등의 활동에 관여하고 있는 성장인자이다.[7, 8)]

- 생체 아민(Biogenic amine)은 일반적으로 단백질이나 아미노산이 미생물에 의해 대사되는 과정에서 생성되는 아민류로서 식품 부패의 지표가 되는 부패 아민을 포함한다. 생체 아민 중에서 식중독을 일으키는 부패 아민은 아미노기를 1~2개 가지고 있는데 반하여 아미노기를 3~4개 갖는 아민은 폴리아민으로 분류되어 부패 아민과 구별된다. Putrescine 은 아미노기를 2개 갖는 디아민이나 대사에 의해 spermidine 과 spermine 을 생성하는 전구체이므로 폴리아민으로 분류한다.[7)]



- 폴리아민은 세포의 증식 및 분화에 필수 불가결한 물질로서 증식이 활발한 세포나 성장이 활발한 개체의 세포내에서는 다량의 폴리아민이 합성된다. 따라서 폴리아민의 합성

을 저해하여 이 물질이 합성이 불가능하게 된 세포는 증식을 할 수 없으며 개체는 성장할 수 없다.[9] 나이가 듦에 따라서도 정상세포라도 폴리아민 합성효소의 활성을 저하한다.[10, 11] 폴리아민은 세포내에서 합성되고 분비함에 따라 주변 세포는 폴리아민을 쉽게 흡수 할 수 있다. 따라서 정상적인 개체에서는 음식물 중에 함유된 폴리아민이나 장내세균이 합성하는 폴리아민 등이 중요한 공급원이 될 수 있다.[12]



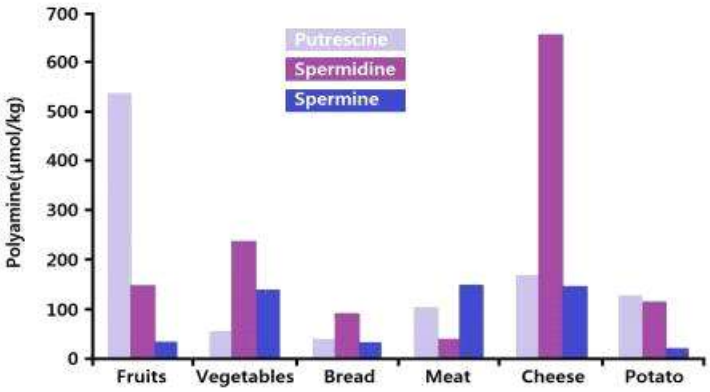
- 폴리아민의 생리작용으로서는 1) 세포 증식 작용, 2) 세포분화 촉진 작용, 3) 면역 세포 식별 작용, 4) 항알러지 작용 등이 알려져 있다. 최근에는 급성・만성 염증의 억제 작용 등이 있는 것으로 알려져 만성염증에 의해 유발되는 노인성 질환을 억제하는 작용이 기대되고 있다.[13]

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Spermidine Promotes Human Hair Growth and Is a Novel Modulator of Human Epithelial Stem Cell Functions

Received April 15, 2011; Accepted June 24, 2011; Published July 27, 2011

- 이와같이 폴리아민이 갖는 여러 가지 효과가 밝혀짐에 따라 폴리아민을 일상적으로 섭취하고자 하는 다양한 시도를 하고 있다. 음식물의 폴리아민은 장내에서 신속히 흡수되어 짧은 시간 내에 신체 각 조직의 세포로 이행하는 것이 밝혀져 있다.[10] 폴리아민의 1일 섭취량은 성인은 약 350~550μmol인 것으로 알려져 있으나 폴리아민 함량의 편차는 매우 크다.[12] 따라서 손쉽게 먹을 수 있는 식품을 개발하면 여러 가지 생리작용을 갖는 폴리아민을 양과 질을 충족시킬 수 있을 것이다.



나. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

- 우리나라 고추 육종기술은 전세계에서 선두를 지키고 있는 것으로 나타났으며 국가연구기관을 비롯하여 많은 기관과 단체가 기술을 개발하고 있으나 분자육종기술 등의 수준에 있어서 국제적 선두그룹과는 격차가 있는 것으로 나타났다(GSP 고추품목 상세기획보고서).

- 국내 민간의 고추 육종 부분은 일반적으로 바이러스, 곰팡이, 세균병 등에 대한 내병성 품종개발에만 역점을 두고 있으며, 고추의 재배법이나 작부체계 및 생산체계 개발에 관한 연구는 미미한 상황이다.

- 기능성에 관한 육종은 색소와 캡사이신 추출 목적의 품종육종이 꾸준히 진행되어왔으며 타 산업인 제약 및 화장품 등의 관련 산업과 연계하여 시장이 확대되고 있으나 이 이외의 기능성 물질에 대한 육성은 잘 알려진 바 없다.

- 식물 체내에서 자외선 조사 등과 같은 조건을 부여하였을 때 폴리아민의 생합성 양과의 관계와 같은 폴리아민의 생리학적 의미를 연구하고 있으나 폴리아민과 관련한 식품이나 작물 개발이 이루어지지 않고 있다.

2) 시장현황

- 고추는 미곡 다음으로 농가소득에 중요한 경제작물이며, 국내시장 규모는 연간 1조원에 달하며 국민 식생활에 가장 중요한 양념 채소류이다.

- 재배면적은 36,120ha이며 생산량은 85,068ton (2014년 기준. 한국농촌경제연구원)

- 국내는 기능성 품종으로 혈당 강하용 고추 품종은 판매되고 있으나 폴리아민 관련 고추는 판매되고 있지 않다.

3) 경쟁기관현황

- 고추의 일반적인 육종에 참여하는 기관은 약 20여 개의 종묘회사 및 육종 연구에 관여하는 대학 및 원예특작과학원 같은 국립연구기관 등이 있으나 작물의 폴리아민과 관련된 육종을 하는 경쟁기관은 2018년 현재 파악되고 있지 않다.

- 미생물에 의한 폴리아민의 산업적 생산에 관련한 연구는 강원대학교에서 이루어지고 있다.

4) 지식재산권현황

- “폴리아민 고생산 신균주 바실러스 서브틸리스 EE5 균주”가 한국 특허 등록을 마쳤으며 PCT 출원도 신청되어 있는 상태이다.

다. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

- 다국적 대기업은 첨단 분자육종 및 형질전환 기술을 이용하여 육종효율을 증대하고 있으며 검정결과를 육종가에게 실시간으로 정보를 제공하고 있음.

- 폴리아민을 소재로 한 건강보조식품이나 발모제 등이 개발되어 있으나 작물의 육종에 적용한 예는 찾을 수 없다. 일본의 경우 낫토의 발효 조건을 콘트롤하여 폴리아민 생산성을 높이고자 하는 노력을 하고 있다.

2) 시장현황

- 고추는 전세계적으로 재배면적이 약 400만ha, 종자시장 규모는 4,641억원규모로 추정된다.(GSP 고추품목 상세기획보고서)

- 종자시장 규모로 세계 3위를 차지하고 있을 만큼 비중이 큰 작물이며, 해외 고추 조미료 시장규모는 매년 증가 추세이다.

-세계적 교역량은 약 40억 달러로 시장규모가 지난 10년 동안 2배 이상 확대, 연평균 약 13% 성장하고 있다.

3) 경쟁기관현황

- 고추 품종개발은 다국적 기업들이 시장을 주도하고 있으며 기업 간 전략적 제휴를 추진하여 파트너십 강화와 더불어 공동연구사업 영역을 확대하고 있으며, 기후변화 대응 및 신품종 개발에 우위를 점하고자 몬산토는 BASF, Syngenta, Dupont, 바이엘 등과, Syngenta는 Dupont, Evogene, 바이엘 등과, Limagrain은 중국의 Yuan Longping과 전략적 제휴하고 있다.

- 폴리아민 고함유 작물의 품종 개발한 예는 찾을 수 없다.

4) 지식재산권현황

- 고함유 폴리아민 품종개발과 관련된 논문, 특허의 발료내용을 찾을 수 없으며, 폴리아민을 이용한 음식물 제조방법, 추출물의 제조방법에 관한 내용은 있다.

- 일본공개 2010-263816 : 폴리아민을 함유하는 음식품의 제조방법 : 간편하고 기호성에 문제가 없는 폴리아민 함유 음식품을 제공하기 위하여 연어의 정소, 돼지의 간장, 맥아, 콩, 낫토, 차 등을 염용액으로 추출하는 것을 특징으로 하는 추출물의 제조방법

- WO013/051483 : 식물로부터 폴리아민 조성물을 제조하는 방법 : （１）植物及び／又は植物加工物をエタノールで処理する工程 ｀（２）植物及び／又は植物加工物を水で処理する工程 ｀（３）植物及び／又は植物加工物を酸性条件下で処理する工程 ｀および（４）液体画分を分離し採取する工程を含むことを特徴とするポリアミン組成物の製造方法 °

-【出願番号】特願2013-125175(P2013-125175) : 대두로부터 폴리아민 조성물 제조하는 방법 : ポリアミン組成物 ｀ポリアミン組成物の製造法 : 大豆胚軸を酸性水に浸漬し ｀ｐＨ１．０ ˜ ３．５となるよう調整し ｀前記大豆胚軸浸漬物から液体部分を分離し採取し ｀大豆胚軸由来ポリアミン組成物を製造する °

- 特願2010-252638(P2010-252638) : 장내세균에 의한 폴리아민 생성 촉진에 관한 특허 출원 : 腸内ポリアミン増強剤 : 腸内細菌によるポリアミンの生成を促進する有効成分とし

て、アラニン、アルギニン、セリン、プロリン、リシン、γ－アミノ酪酸、ヒドロキシプロリン、リンゴ酸、アスパラギン酸、イソロイシン、チロシン、バリン、ロイシン、アデニン、ウラシル、イノシン、フマル酸、ニコチン酸、ヒポキサンチン、又はこれらの組み合わせから選択される腸内のポリアミン濃度増強剤。

- 特開平１０－５２２９１：효모발효에 의해 폴리아민 조제 방법：ポリアミンの調製方法：　酵母を酸性条件下で処理することを特徴とする、ポリアミンの調製方法、及びこの方法で得られたポリアミンを添加する、異臭味のないポリアミン添加食品の調製方法。

1-3. 연구개발 범위

○ 폴리아민 고함유 고추추출물의 생리적 기능 분석
- 고추 추출 폴리아민의 세포차원에서의 생리적 기능분석
- 실험동물을 이용한 고추 추출 폴리아민의 혈액이행 분석

○ 폴리아민 고함유 가공제품 개발
- 고추로부터 폴리아민의 최적 추출
  : 산업화 수준의 스케일업 공정 개발
- 폴리아민 고함유 액상 및 분말상 소재 개발
  : 5~200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 화장품 소재 제형 개발
  : 10~100mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말상 식품 소재 개발
- 폴리아민 고함유 가공식품 개발
  : 12mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 가공식품 개발

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

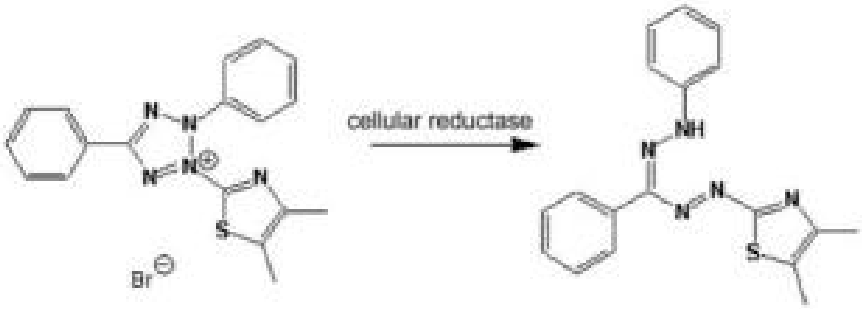
2-1. 연구수행 내용

가. 폴리아민 고함유 고추 추출물의 생리적 효능 평가

1) 폴리아민의 세포독성 평가(MTT assay)

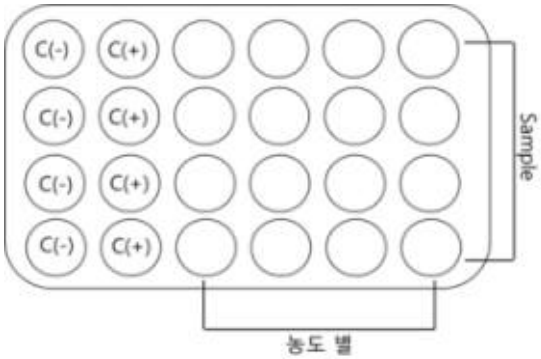
가) 측정원리

- MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria reductase의 환원력을 이용해 cell viability와 cell toxicity를 간접적으로 평가하는 방법이다. yellow tetrazolium salt는 mitochondria reductase에 의해 formazan(purple)이라는 보라색 계열의 물질로 바뀌며 이는 특정 파장(550nm)에서 흡광한다. 이를 이용해 sample을 처리 후 세포의 생장과 세포에 나타나는 독성을 평가한다.[13)]

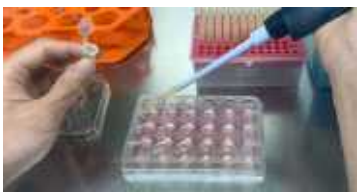
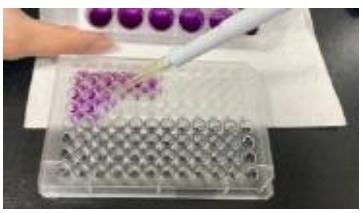
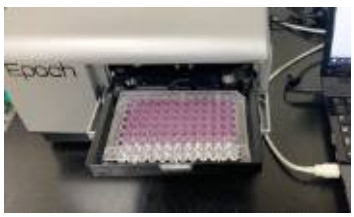


나) 측정방법

- Cell seeding은 24well plate에 well당 2 x 10^5 cell으로 1일간 culture한다.
- Sample treatment는 seeding 후 2 days에 농도 별로 24h 처리한다.

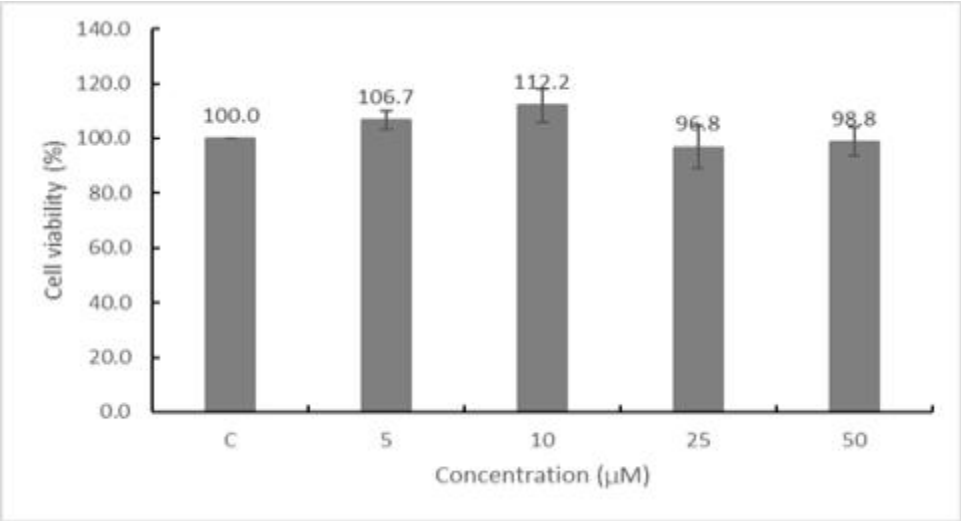


- C(-/+는 자극제 처리 유무)는 control이며 sample을 처리하지 않은 대조군이다.
- Sample treatment는 각 희석 배수(xN)의 stock solution을 제조 후 ul 단위로 treatment (ex, sample 20ul : buffer or media 980ul)

		
- Media를 제거 하여 400ul를 남긴다.	- MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 5mg/ml) 40ul 처리한다.	- 4h 동안 37℃, CO2 5% incubator 에서 반응시킨다.
		
- Media를 제거 후 DMSO를 700ul 분주하여 cell resolution 한다.	- DMSO에 녹은 formazan solution 을 40ul씩 duplication으로 96 well plate에 옮긴다.	- UV 550nm에서 흡광도를 측정한다. - Control에 대해서 각 sample 및 농도 별 처리 군을 %값으로 계산한다.

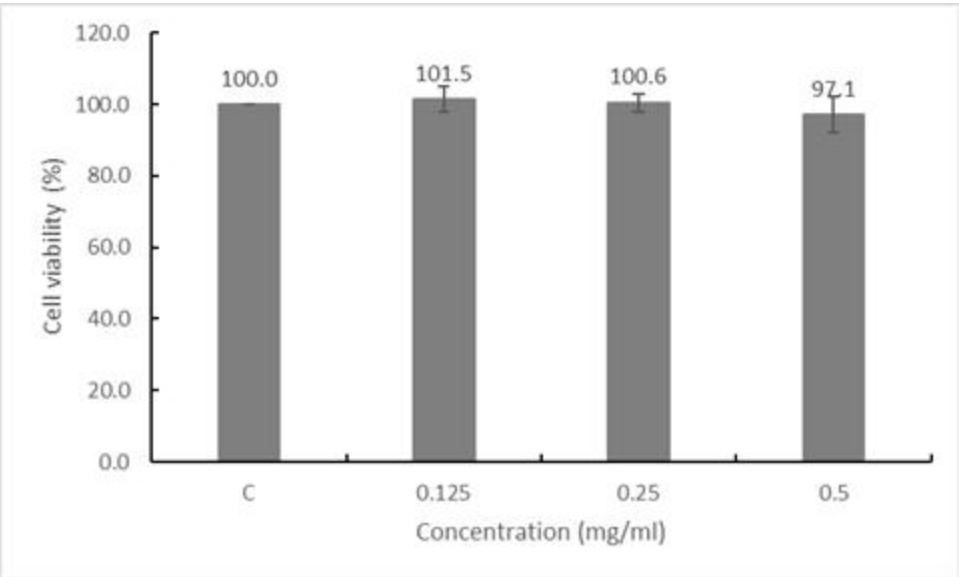
다) 합성 폴리아민 농도별 세포독성평가 결과

- 합성 polyamine은 전 농도에서 cell viability에 영향이 없으며 독성이 없는 것으로 확인했다.
- 동일한 농도에서 합성 polyamine의 항염증 활성을 NO production 양을 측정해 평가한다.
- 5, 10uM에서 세포증식이 관찰되나 변화의 폭이 크지 않으며, 통계적으로 유의미하지 않다.



라) 폴리아민 고함유 고추추출물 세포독성평가 결과

- 해당 농도에서 0.1% HCl polyamine 추출물의 농도별 동결건조는 세포독성이 나타나지 않았다.



2) 폴리아민의 세포증식 영향 평가

가) 측정원리

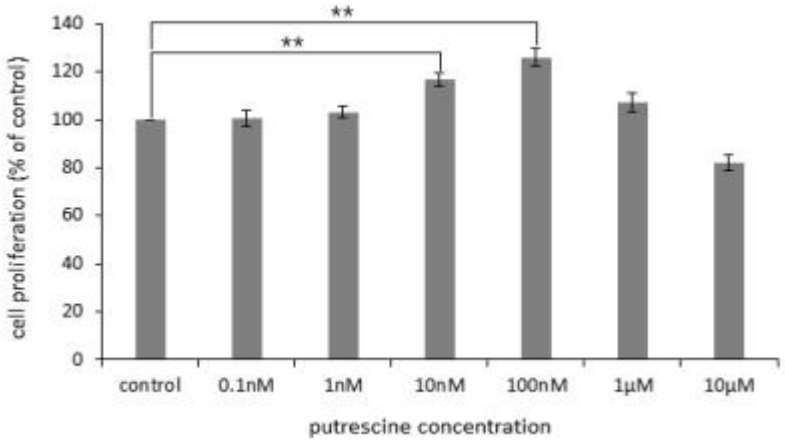
- MTT assay 기반으로 섬유아세포 및 B세포의 세포증식에 미치는 영향을 평가하였음.

나) 섬유아세포(3T3-L1) 세포주에서 폴리아민이 세포증식을 유도함을 확인함

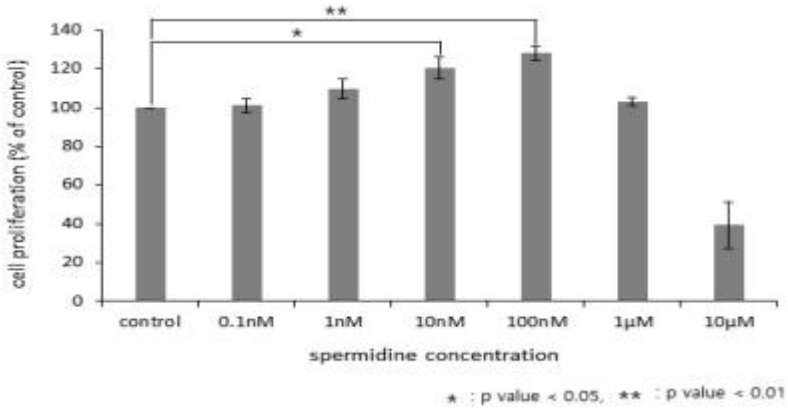
- 섬유아세포(3T3-L1) 세포주에서의 농도별 폴리아민 처리에 따른 세포증식 결과

: 위 결과 전반적으로 특정 농도에서 세포 증식능이 향상되는 것을 확인하였다. putrescine의 경우 100nM 농도로 처리하여 109.78%로 세포 증식능이 증가하는 것으로 나타났고, spermidine의 경우 100nM과 10nM에서 122.78%, 131.48%의 수치를 보이며 세포 증식능에 대한 유의성을 보였다. 또한 spermine은 10nM농도 처리 시 113.19%의 세포 증식능을 확인하였다.

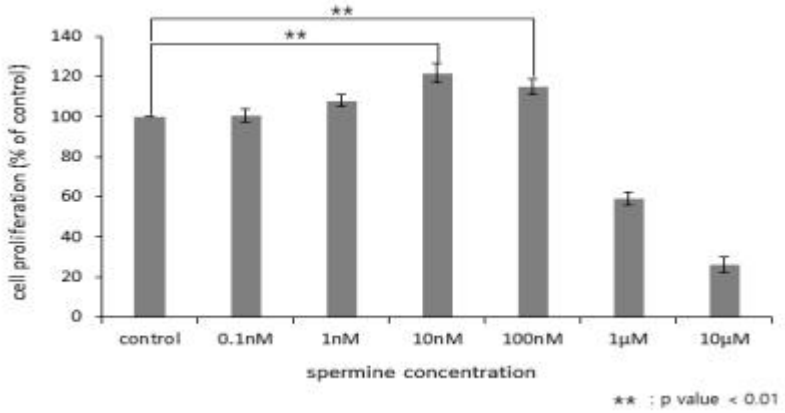
○ Putrescine



○ Spermidine



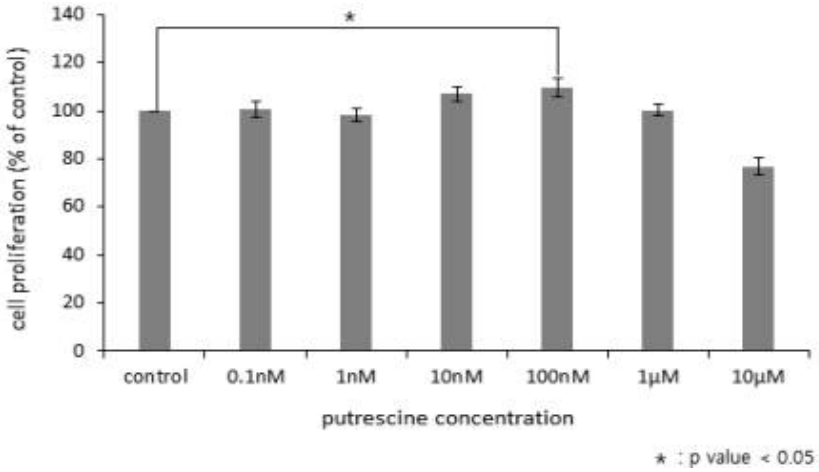
○ Spermine



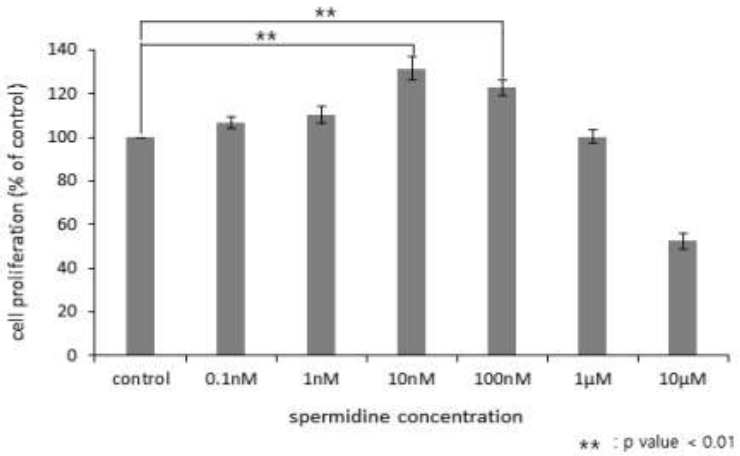
다) B세포(하이브리도마) 세포주에서 폴리아민이 세포증식을 유도함을 확인함

- 결과: 114.67%에서 128.18% 범위 내에서 전반적인 세포 증식능에 대한 유의성을 보였다. putrescine은 100nM, 10nM의 농도 처리 시 각 126.07%, 116.69%의 유의하게 세포 증식능이 증가하는 것을 확인하였고, spermidine과 spermine은 동일 농도에서 128.18%, 120.32%와 114.67% 121.7%의 세포 증식능을 보였다. 이로 인해 polyamine에 대해 세포 증식능이 향상되는 것을 확인하였다.

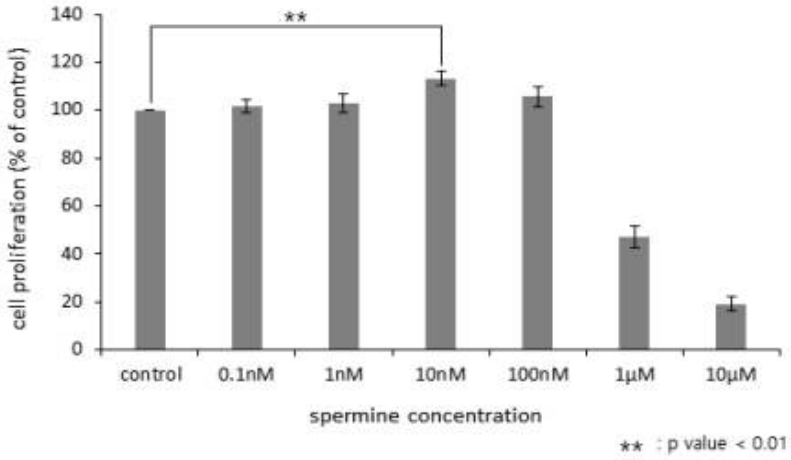
○ putrescine



○ spermidine



○ spermine



3) 폴리아민 고함유 고추추출물의 항염증 기능 평가(NO assay)

가) 측정원리(NO assay)

- NO ASSAY는 Macrophage의 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성 측정 방법으로, in vitro에서 cell supernatant에 녹아있는 NO의 양을 정량하는 것이다.

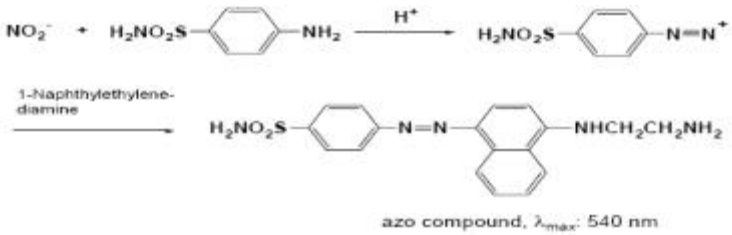


Fig. 1: Coloring reaction scheme of NO_2^- detection

$$\cdot NO + 1/2O_2 \longrightarrow \cdot NO_2 \quad (1)$$

$$2 \cdot NO_2 \rightleftharpoons N_2O_4 \quad (2)$$

$$N_2O_4 + H_2O \longrightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H_2^+ \quad (3)$$

$$\cdot NO + \cdot NO_2 \rightleftharpoons N_2O_3 \quad (4)$$

$$N_2O_3 + H_2O \longrightarrow 2NO_2^- + 2H^+ \quad (5)$$

Scheme 1: NO reaction and its metabolites

나) 측정방법

(1) RAW264.7 cell을 24well plate에 5 x 10^4 cells로 seeding한다.

(2) 24h 후 동결건조된 0.1% HCl extract를 농도별(0.125, 0.25, 0.5mg/ml)으로 treatment(1h)

(3) 1h 후 LPS를 1ug/ml 농도로 처리한다.

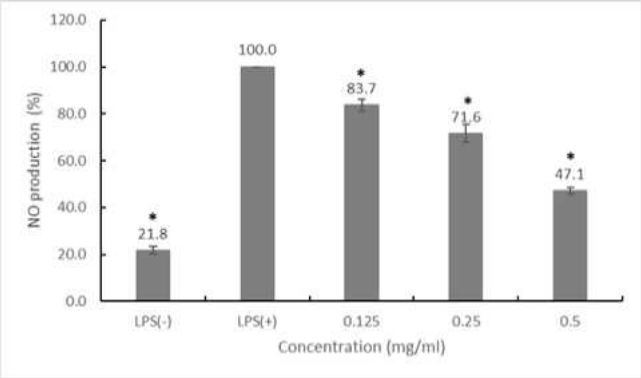
(4) 24h 후 상등액 100ul을 96well plate로 옮긴다.

(5) Griess A/B soloution을 1:1로 혼합 후 100ul씩 분주한다.

(6) 15min간 차광 상태에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정한다.

다) 폴리아민 고함유 고추추출물은 농도 의존적으로 항염증 효과가 있음을 확인함

- 폴리아민 고함유 고추추출물 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되며, 이는 0.5mg/ml에서 약 52.9% 억제되었다.



- 폴리아민 고함유 고추와 시중에서 유통되는 고추의 폴리아민 함량을 비교하였다. 이들 항염증 효과에 대한 비교 실험을 실시하여 폴리아민 고함유 고추 추출물에서 30% 이상 높은 효능이 나타남을 확인하였음. 따라서 본 연구과제에서의 결과에 의해 폴리아민 고함유 고추 추출물의 폴리아민 성분에 의해 항염증 효과가 나타났음을 확인할 수 있었다.

4) 폴리아민 고함유 고추추출물의 항염증 기능 평가 (염증성 사이토카인 발현량 비교: qRT-PCR)

가) 측정방법 (RNA isolation-cDNA synthesis-qRT-PCR)

(1) 추출물 처리 후의 세포에 Trizol 1ml을 넣고 pipetting으로 부순다.
(2) Shredder에 500ul 옮겨서 원심분리(12000rpm, 1min 30sec, 4℃)를 2회 진행한다.
(3) chloroform 200㎕를 넣고 두 층이 섞이도록 15초간 흔들어준 후 2~3분 정치한다.
(4) 원심분리(12000rpm, 15min 30sec, 4℃)
(5) 끝이 잘린 filter tip으로 400㎕ 정도만 RNA층을 떠서 새 tube로 옮긴다.
(6) isopropanol 400㎕ 넣는다. ※(4)에서 옮긴 양과 같은 양
(7) inverting 후 10분 동안 상온에 놔둔다.
(8) 원심분리 (12000rpm, 10min 30sec, 4℃)
(9) 침전된 RNA만 남기고 모두 버린다.
(10) 한 번 더 짧게 원심분리 후, tube에 남아있는 액체를 모두 제거한다.
(11) 70% EtOH를 800ul 넣고 inverting 한 후 7500rpm, 2min 30sec, 4℃에서 원심분리
(12) EtOH를 제거하고 filter tip+200㎕ tip으로 pipetting하여 남은 EtOH를 날린다.
(13) DNase 50㎕를 넣고 vortexing 후 water bath에 60min incubation 한다.
(14) inactivator 5㎕를 넣고 mix한 후 2~3분 간격으로 10분간 tapping한다.
(15) 원심분리 (12000 rpm, 3min 30 sec, 4℃)
(16) bead가 없도록 조심해서 새 tube에 덜어내고, bead가 들어갔을 경우 다시 원심분리

하여 조심히 옮긴다.

(17) Nano drop에서 RNA 양을 측정한다.

(18) DNase 50㎕를 넣고 vortexing 후 water bath에 60min incubation 한다.

RNase free water	44㎕
buffer (×10)	5㎕
DNase	1㎕
Total	50㎕

(14) inactivator 5㎕를 넣고 mix한 후 2~3분 간격으로 10분간 tapping한다.

(15) 원심분리 (12000 rpm, 3min 30 sec, 4℃)

(16) bead가 없도록 조심해서 새 tube에 덜어내고, bead가 들어갔을 경우 다시 원심분리하여 조심히 옮긴다.

(17) Nano drop에서 RNA 양을 측정한다.

(18) DNase 50㎕를 넣고 vortexing 후 water bath에 60min incubation 한다.

(19) RNA 500ng으로 정량 후 ReverTra(TOYOBO, Japan) cDNA kit를 이용해 cDNA를 합성한다.

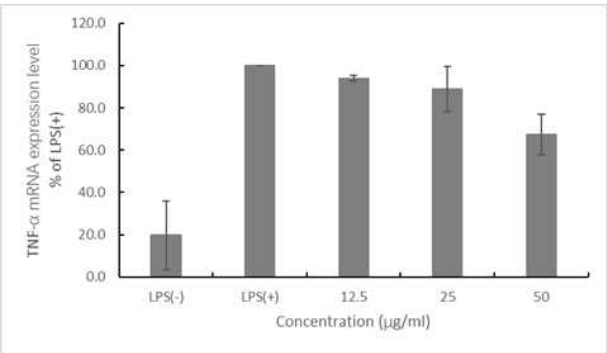
(20) THUNDERBIRD SYBR green qPCR mix를 이용해 mixture를 조성에 따라 제조한다.

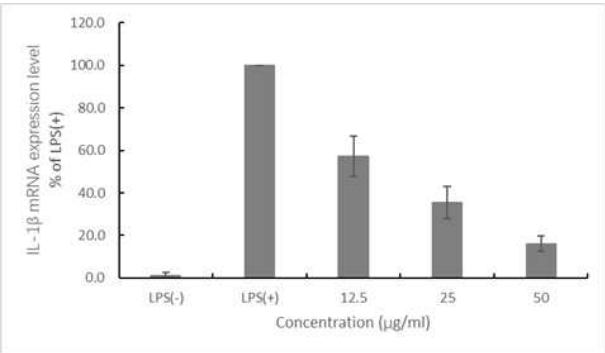
(21) Reference gene은 GAPDH, target gene은 TNF-a, IL-1b, IL-6이며 모두 mouse 기원이다. (primer는 0.5pmol을 사용)

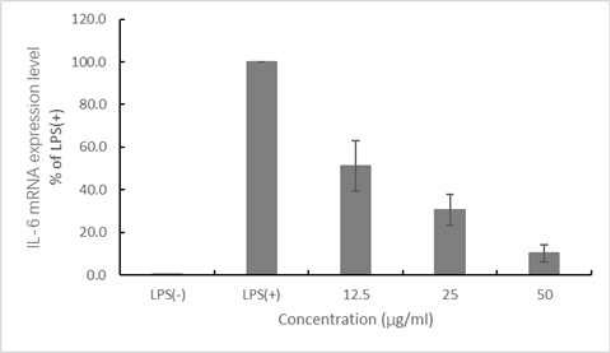
(22) GAPDH와 비교해 Ct값의 변화량으로 유전자 발현 변화를 비교한다.

나) 폴리아민 고함유 고추추출물의 농도별 염증성 사이토카인 유전자 발현량 평가

- TNF-a, IL-1b, IL-6 모두 농도 의존적으로 발현 양이 감소하였다.
- TNF-a의 경우 다른 cytokine 발현 변화에 비해 폭이 크지 않으나, 고농도에서 무처리군에 비해 발현이 감소함을 확인했다.
- IL-1b, IL-6는 변화의 폭이 크며 농도 의존적이다.
- 따라서 고추 기원의 polyamine 고 추출물에 대해서 항염증 효과가 있음을 유전자 수준에서 확인하였다.







5) 실험동물을 이용한 폴리아민 고함유 고추추출물의 혈액이행 및 효능 평가

가) 실험 방법

○ 마우스 식이 실험

(1) Mouse(Balb/C, female, 5 week)는 1주일간 순응기간을 갖는다.
(2) 급식과 급수는 자율로 하며 조명 시간과 온도를 일정하게 유지 하에 사육한다.
(3) 실험군은 동결 건조된 polyamine 분말을 멸균된 식염수에 녹인 후 200ul/2days를 경구 투여하며, 대조군은 멸균된 증류수 동량을 경구 투여한다.
(4) 1주일간 식이 하며 심장채혈을 통해 혈액을 수득 후 5% perchloric acid를 이용해 혈중 polyamine을 분석한다.

○ Dansyl-chloride derivatization 및 Thin layer chromatography(TLC) 분석법[15)]

(1) Mouse로부터 얻은 혈액을 5% perchloric acid가 되도록 적정 후 4℃에서 24h 추출한다.
(2) 이후 유도체화 및 TLC 분석은 이전과 동일하게 진행되었다.

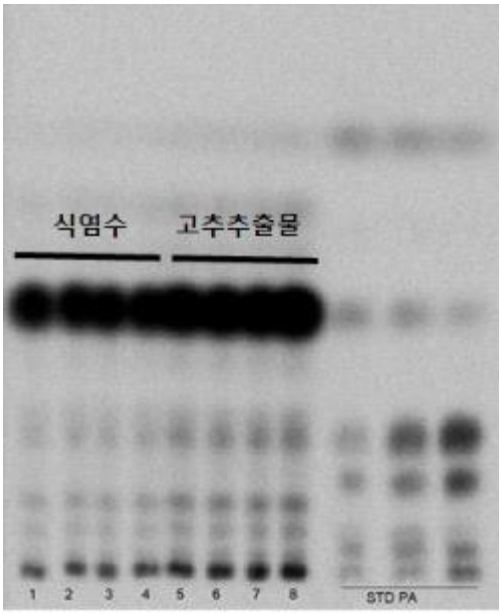
○ TPA-mouse model을 이용한 항염증 활성 평가

(1) Mouse는 1주간 순응 기간을 갖는다.
(2) Polyamine extract는 DW에 녹여 pH 7.0으로 적정 후 mouse ear 안과 밖 표면에 20ul씩 6일간 매일 도포한다. (저농도 처리군: 25mg/ml, 고농도 처리군: 100mg/ml)
(3) TPA(500ug/ml)는 마지막 sample 처리 후 4h 뒤에 동량을 처리한다.
(4) 24h 뒤에 ear thickness를 측정하며, 수득된 조직에서 RNA 추출 후 염증성 cytokine mRNA level(TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2)를 측정한다.

나) 실험 결과

○ 마우스 식이 실험(혈액이행)

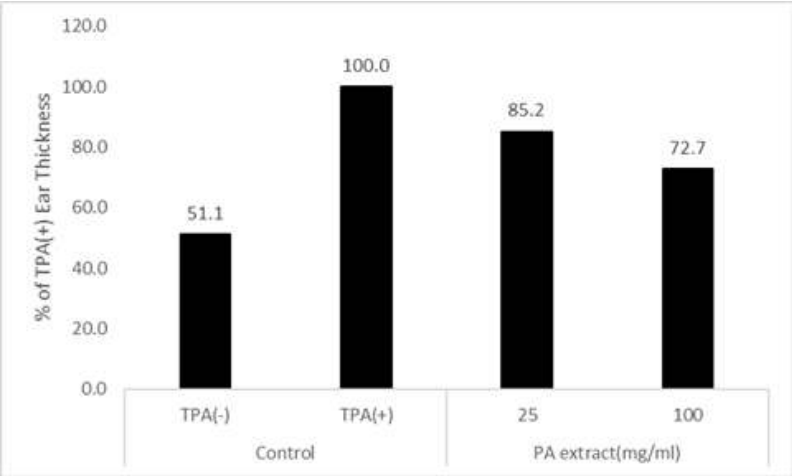
- saline group에 비교해 polyamine extract group에서 polyamine의 혈액이행이 관찰되었다.



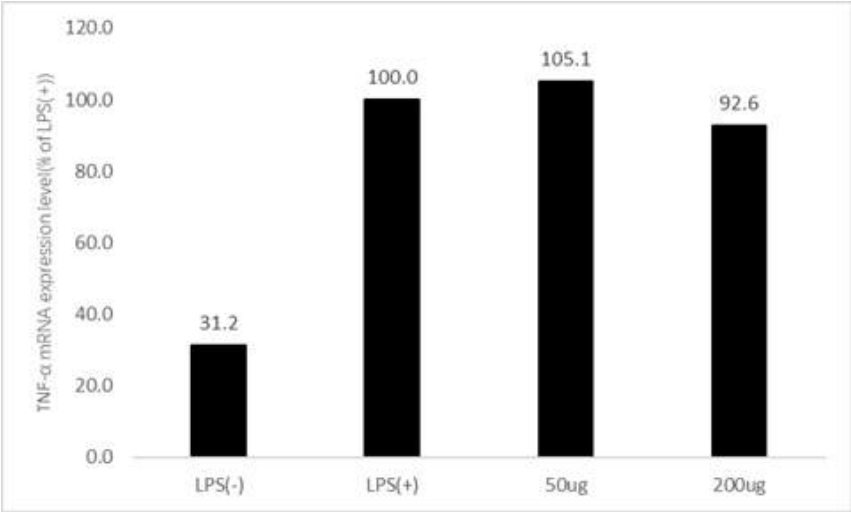
Lane No.	Sample
1-4	DW control group (200μl, 3 dose/week)
5-8	동결 건조 polyamine extract group (310μg/200μl, 3 dose/week)

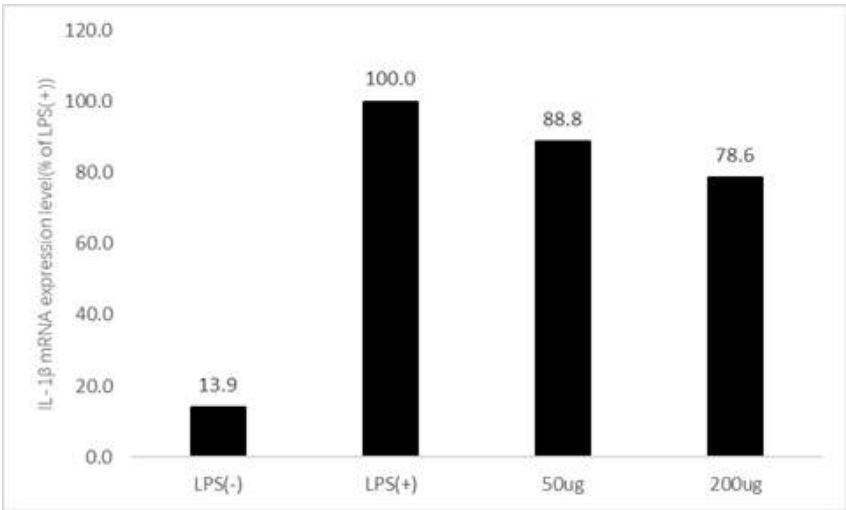
- 이 결과를 바탕으로 마우스를 이용한 폴리아민 고함유 고추추출물의 생리적 기능 연구를 진행 중에 있음.

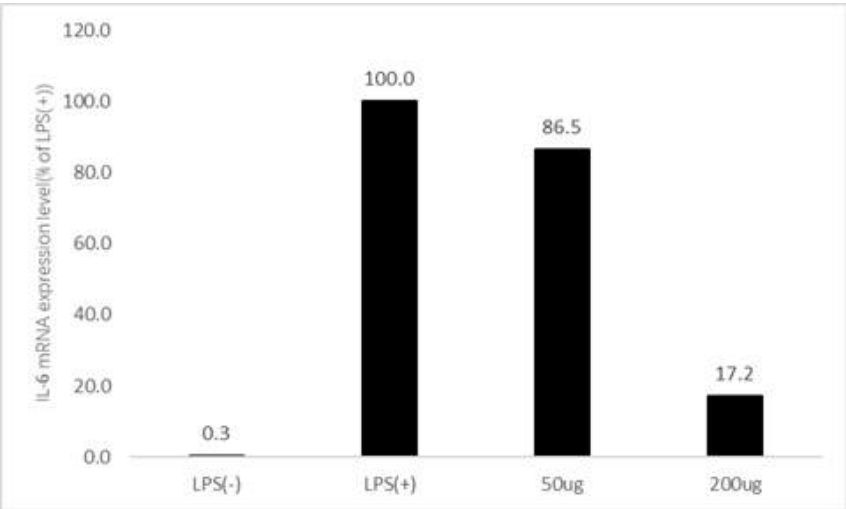
○ TPA-mouse model(항염증 활성 평가)

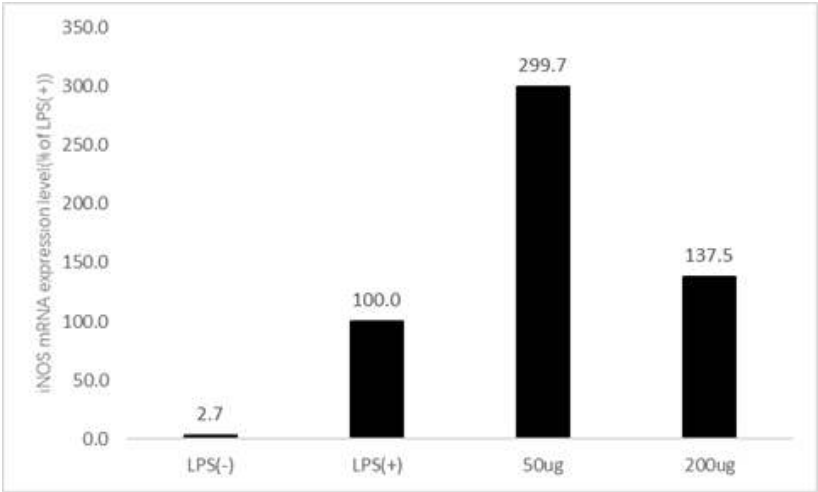


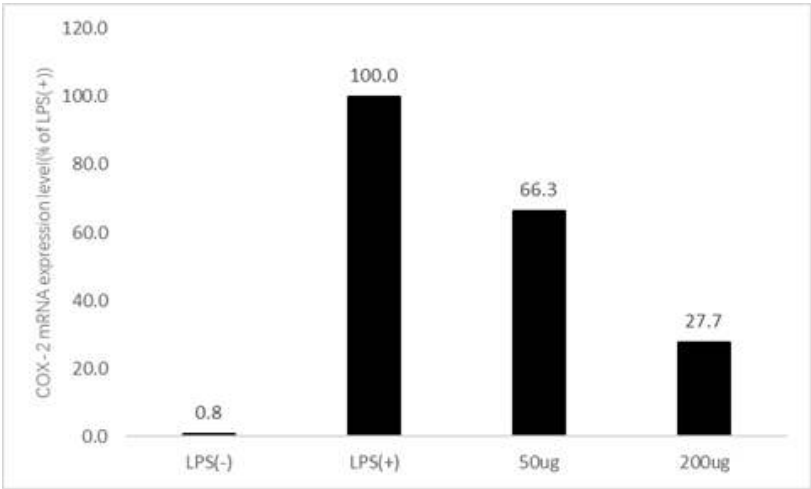
- TPA에 의해 염증이 유도된 mouse의 ear thickness가 폴리아민 고함유 고추추출물에 농도 의존적으로 감소하였다.


TNF-α mRNA expression level(% of LPS(+))
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
31.2
100.0
105.1
92.6
LPS(-)
LPS(+)
50ug
200ug


IL-1β mRNA expression level(% of LPS(+))
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
13.9
100.0
88.8
78.6
LPS(-)
LPS(+)
50ug
200ug


IL-6 mRNA expression level(% of LPS(+))
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0.3
100.0
86.5
17.2
LPS(-)
LPS(+)
50ug
200ug



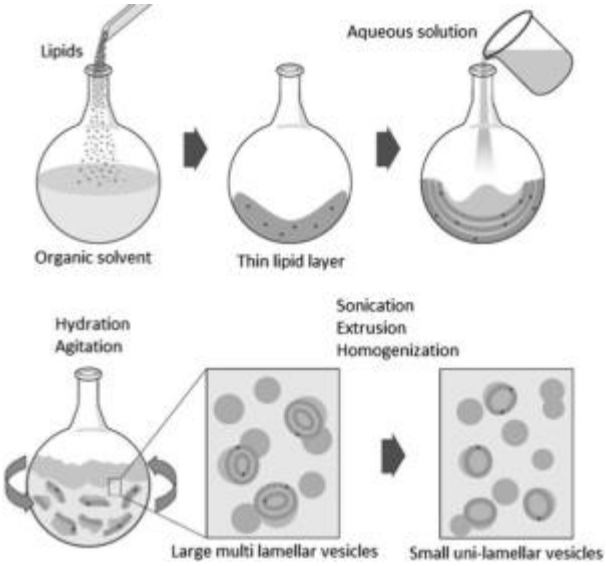


- TPA에 의해 염증이 유도된 mouse의 ear에서 각 염증성 cytokine의 mRNA level을 측정한 결과, TNF-α, iNOS를 제외한 IL-1β, IL-6, COX-2에서 모두 농도 의존적으로 감소함을 확인했다.

6) 폴리아민 고함유 고추추출물의 리포좀화 평가

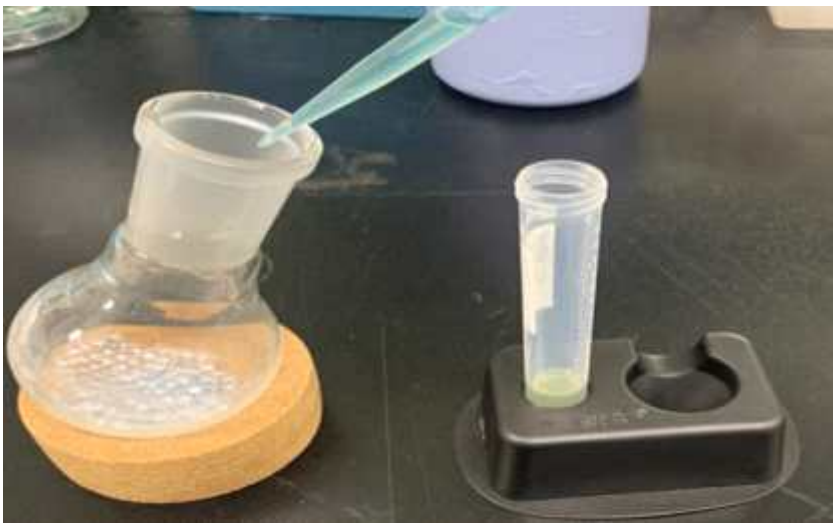
가) Thin layer/glass beads를 이용한 리포좀화

- Thin layer method는 liposome을 제조하는 기본적인 방법으로 lipid를 녹여 용매만 제거해 thin lipid layer를 만든다. 얇은 지질 막에 aqueous solution(수성상)을 가하면 소수성과 친수성에 의해 liposome이 형성되며 이때 활성 물질인 고추추출 폴리아민이 liposome안으로 encapsulation된다. 이를 물리적인 방법(glass beads)을 이용해 균질화한다.



- Egg-phosphatidylcholine solution을 Chloroform에 녹여 28mg/ml 으로 제조
- Cholesterol 10mg을 넣고 round flask로 옮김

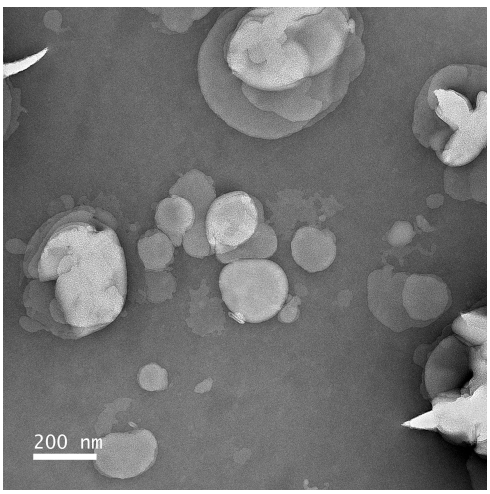
- Rotary evaporator를 이용해 50℃ 감압 조건에서 유기 용매를 제거



- Thin lipid layer가 형성되면 4mm glass beads 10.0g과 폴리아민 용액을 넣어 hydration
- Hydration 후 2-3min간 vortex

- 상온에서 24h 동안 shaking incubation 함.
- 해당 sample을 TEM으로 분석해 liposome 모양과 크기를 측정한다.

○ TEM result



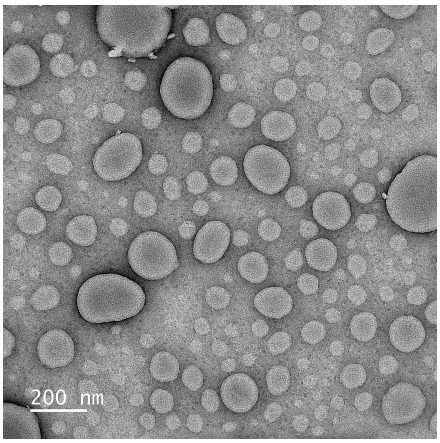
- TEM 결과에서 liposome의 크기와 모양이 일정하지 않으며 200nm 이상의 large liposome이 관찰된다.
- 또한 일부 liposome은 여러 겹의 층으로 되어있는 multilamellar liposome의 형태이며 모양이 고르지 않다.
- Glass beads와 thin layer method는 적합하지 않으며 다른 method로 liposome 합성을 진행하였다.

나) Nano emulsion 방법을 이용한 리포좀화

- 폴리아민 용액을 10%(w/v) 농도로 caprylic/apric triglyceride에 40℃에서 10min간 용해
- 제형의 안정성을 위해 sodium ascobyl phosphate 0.03%(w/v)의 농도로 용해
- 60℃로 가열한 1,2-Hexanedial/Butylene glycol(1:1)에 lecithin/lysolecithin을 homo-mixer를 사용하여 균질하게 분산
- 용해된 폴리아민용액을 phosphatidylcholine(lecithine)이 분산된 1,2-Hexanediaol/Butylene glycol(1:1) 용액에 첨가

- homo-mixer를 이용해서 re-emulsion 상태로 교반
- Micro-fludizer를 이용하여 1200bar에서 3회 반복 처리하여 폴리아민을 함유한 self-emulsifying liposome을 제조

○ TEM result



- TEM 결과에서 이전 보다 고르게 분포된 liposome을 확인했다.
- 하지만 크기와 모양이 일부 liposome에서 차이가 있으며 보다 균질화 과정이 필요하다.
- 현재까지는 폴리아민의 리포좀 형성과정까지 진행됨. 추후 이들 소재의 수요요구에 따라 농도별 포집율 등의 추가 연구가 진행 되어질 필요가 있음.

나. 폴리아민 고함유 가공제품 개발

1) 폴리아민의 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선발

가) 폴리아민 고속 검출 체계 확립

: Dansyl-chloride derivatization 및 Thin layer chromatography(TLC) 분석[15)]

(1) 파쇄한 고추 1g에 5% perchloric acid 용액 5ml를 가하고 polytron으로 파쇄한 후 저온실에서 차광하여 overnight 교반하며 추출한다.
(2) 파쇄액 원심분리하여 상등액을 취한다.
(3) 상등액 150㎕를 포화 $NaHCO_3$용액 300㎕, Dansyl chloride 용액 (10mg/ml in acetone) 200㎕을 순차적으로 가하고 vortexing 후 70℃ water bath에서 1시간 차광 반응한다.
(4) 반응액을 충분히 차광하며 식혀준 후 proline 수용액 (100mg/ml) 200㎕를 넣고 vortexing 후 70 ℃ water bath에서 30분 차광 반응한다.
(5) 반응액을 차광하며 식혀준 후 acetone을 전부 날린 후 toluene 300㎕ 를 넣고 2분간 vortexing 한다.
(6) 3분간 원심분리 후 toluene층을 취한 후 Sample, Standard 3mm안에 1mm간격으로 3㎕ loading 후 Thin Layer Chromatography 전개하여 밴드 확인 한다. 용매비율은 Cyclohexane : Ethylacetate = 3 : 2.5

나) 캡사이신 고속 검출 체계 확립 :

(1) Sample 1.0g(wet)에 acetone 2ml으로 shaking incubation(1h, 50℃)
(2) Acetone을 제거하기 위해 60℃에서 건조

(3) Hexane 1.2ml 첨가 후 5min간 shaking, 1ml을 취하여 0.05N NaOH(in 0.2% NaCl) 4ml 첨가

(4) Standard capsaicin은 농도 별(1, 5, 10, 25, 50, 100, 200ug)으로 제조 후 0.05N NaOH(in 0.2% NaCl) 4ml 첨가

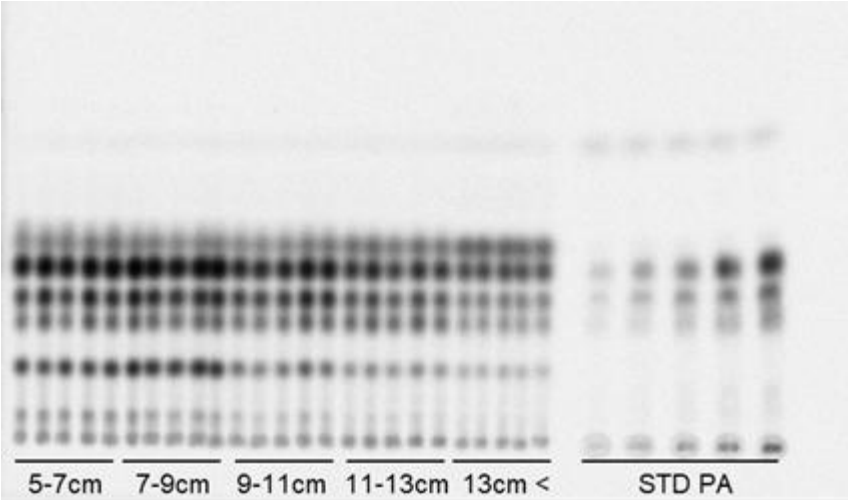
(5) Centrifuge(4000rpm, 20min, room temperature)

(6) 0.1% 2,6-dichloroquinone-4-chloroamide(in 95% MeOH) 50ul 첨가

(7) 2.5% ammonia solution 50ul 첨가

(8) 592nm에서 흡광도 측정

다) **고추 길이**에 따른 폴리아민 함량 비교



- 고추 재배지에서 수확한 고추를 크기별로 5개 그룹으로 나누어 폴리아민과 캡사이신 양을 비교하여 약 10cm 크기의 고추에서 가장 많은 양의 폴리아민이 함유되어 있음을 확인하였다.

- 또한 캡사이신 양은 고추 길이가 11cm가 넘어가면서 현저히 늘어나는 것을 확인하였다.

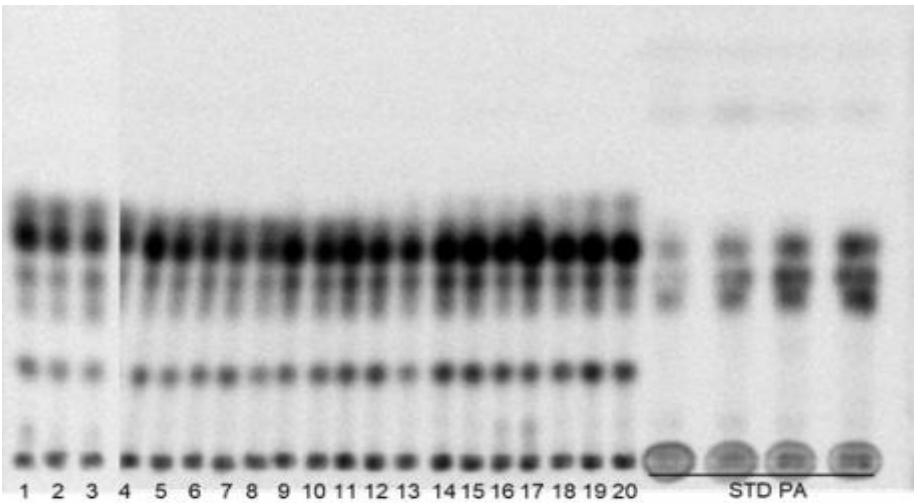
- 따라서 고 폴리아민 저 캡사이신 함유 고추는 본 품종에서는 10cm미만의 고추를 이용하는 것이 최적임을 확인했다.

Polyamine & Capsaicin content (ug/g)					
Size	Putrescine	Spermidine	Spermine	Polyamine	Capsaicin
5~7cm	421	418	314	1153	2.8
	426	443	359	1228	2.8
	428	419	314	1161	2.4
	427	442	328	1197	2.8
	408	472	314	1194	2.8
7~9cm	418	441	328	1187	4.1
	408	429	311	1148	4.4
	427	418	309	1154	5.2
	418	408	327	1153	4.8
	417	411	324	1152	5.6
9~11cm	368	354	285	1007	3.2
	374	348	294	1016	4.8
	358	349	265	972	3.2
	391	354	274	1019	4.1
	387	358	288	1033	4.4
11~13cm	304	301	214	819	10.7
	327	315	216	858	11.2
	306	298	218	822	14.6
	317	308	228	853	15.8
	311	299	194	804	13.2
13cm <	267	187	147	601	19.6
	281	194	146	621	20.7
	276	199	149	624	19.1
	271	196	143	610	20.9
	277	175	142	594	21.4

- 추가적으로 청양고추와 capsaicin 함량 비교 시 본 연구에 사용된 품종은 capsaicin 함량이 전체적으로 낮다.

라) **파종일**에 따른 폴리아민 함량 비교(수정 후 일 수에 따른 폴리아민 함량 비교)

1(7/20) – 10(8/2)　　11(8/3) – 20(8/13)



Lane No.	Date
1	7/24
2	7/25
3	7/26
4	7/27
5	7/28
6	7/29
7	7/30
8	7/31
9	8/1
10	8/2
11	8/3
12	8/4
13	8/5
14	8/7
15	8/8
16	8/9
17	8/10
18	8/11
19	8/12
20	8/13

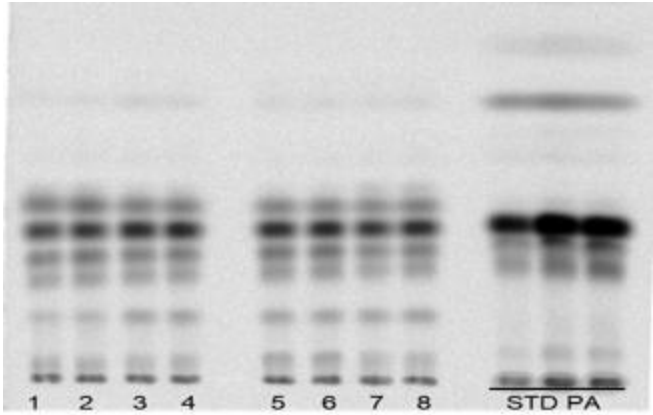
	Polyamine content (ug/g)			
No.	Putrescine	Spermidine	Spermine	Polyamine
1	287	138	45	470
2	281	131	43	455
3	279	133	49	461
4	305	144	43	492
5	287	142	44	473
6	288	146	41	475
7	289	144	42	475
8	279	134	39	452
9	305	151	59	515
10	284	150	57	491
11	309	155	62	526
12	287	155	63	505
13	291	139	55	485
14	305	155	68	528
15	307	157	64	528
16	301	141	59	501
17	317	154	61	532
18	294	133	55	482
19	291	151	64	506
20	301	149	59	509

- 7월 하순부터 8월 중순까지 파종시기를 달리한 고추 역시 파종일에 관계없이 크기에 따라 폴리아민의 양이 변화함을 확인하였다.

- 7월 24일부터 8월 13일까지 20일간 수정된 개체를 ,tagging한 후 8월 18일(수정 후 5일) 일제히 수확하여 폴리아민의 함량을 분석한 결과 수정 후 일수가 길어질수록 폴리아민의 함량이 낮았으며, 8월 7일, 8일 수정된 개체(수정 후12일, 13일)가 가장 높았다.

마) **저장 조건**에 따른 폴리아민 농도 변화 비교

4℃ -20℃



Polyamine content (ug/g)				
No.	Putrescine	Spermidine	Spermine	Polyamine
1	151	149	158	458
2	149	157	154	460
3	161	138	127	426
4	154	132	124	410
5	152	148	149	449
6	155	146	144	445
7	127	114	117	358
8	129	115	110	354

Lane No.	Temperature(℃)
1, 3, 5, 7	냉장 보관(4℃) 3일 후 5% Perchloric acid 추출
2, 4, 6, 8	냉동 보관(-20℃) 1일 후 5% perchloric acid 추출

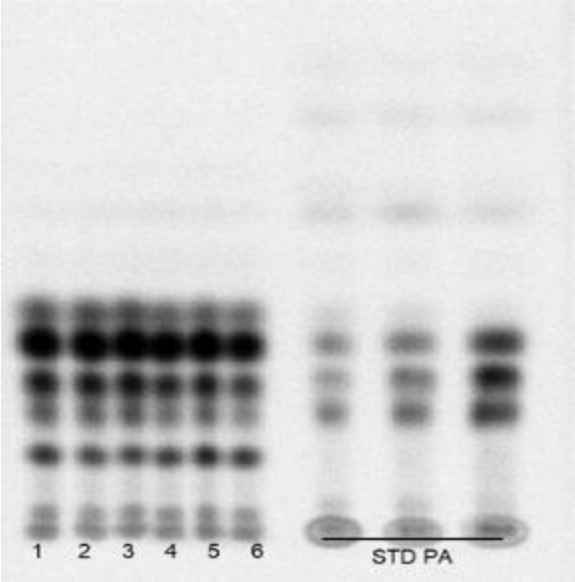
- 농작물이 대량 생산되는 시기를 제품화시기에 맞추는 것은 매우 어려우므로 이들 폴리아민 고함유 고추의 저장 조건(4℃, -20℃)에 따른 폴리아민 추출효율을 검토하였다.
- 이들 저온의 저장 조건에서는 생물과 같은 추출효율을 확인했다.
- 하지만 4℃에서는 저장기간이 길어짐에 따라 고추 상태가 병들거나 부패한다.
- 따라서 어는점 아래에 보관하는 것이 바람직하다.

바) 건조 **조건**에 따른 폴리아민 농도 변화 비교

생 고추 건 고추

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

○ 생물고추와 생물고추를 바로 동결건조한 고추 시료 비교



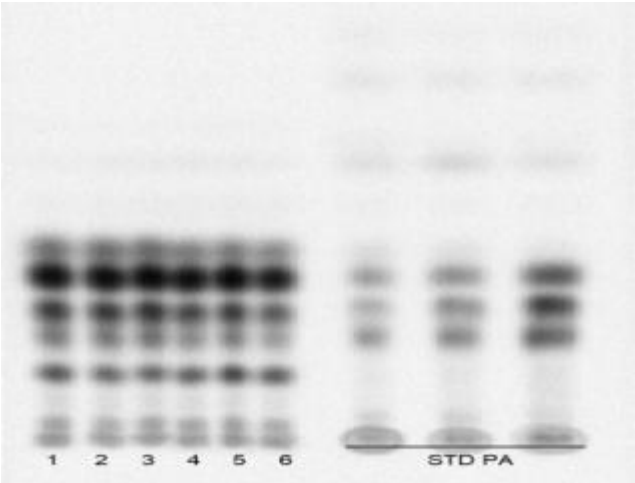
Lane No.	Sample
1	생고추 추출물 5% perchloric acid 로 추출 (1g/5ml)
2	생고추 추출물 10% acetic acid 로 추출 (1g/5ml)
3	생고추 추출물 10% citric acid 로 추출 (1g/5ml)
4	건고추 추출물 5% perchloric acid 로 추출 (0.1g/5ml)
5	건고추 추출물 10% acetic acid 로 추출 (0.1g/5ml)
6	건고추 추출물 10% citric acid 로 추출 (0.1g/5ml)

- 기존 방법의 용매인 perchloric acid와 비교해 고추의 건조 유무에 따른 폴리아민 함량을 acetic acid와 citric acid와 비교했다.

- 고추 생물과 고추 동결 건조물(생물)은 한 번에 다량 분쇄 후 일정량 취하여 추출했으며, 이전과 동일하게 추출하여 비교했다.

- 고추의 수분 함량은 90% 정도 되고 건조에 따른 고추의 polyamine 수율은 80% 정도이므로 수분 함량을 고려했을 때, 건조에 유무에 상관없이 일정량의 polyamine 추출이 가능한 것을 확인했다.

○ 생물고추와 냉동고추를 동결건조한 고추시료 비교



Lane No.	Sample
1-3	고추를 5% Perchloric acid 로 overnight 추출 (1g/5ml)
4-6	고추 동결 건조물을 5% Perchloric acid 로 overnight 추출 (0.1g/5ml)

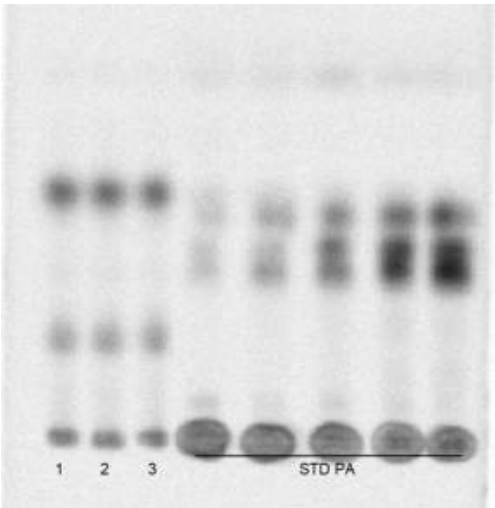
Polyamine content (μg/g)				
No.	Putrescine	Spermidine	Spermine	Polyamine
1	328	275	158	761
2	321	287	144	752
3	317	285	127	729
4	287	237	88	612
5	271	264	95	630
6	275	217	77	569

- 폴리아민 고함유 고추를 수확하여 냉동보관. 이들 냉동고추를 동결건조한 시료에서의 폴리아민 함량을 비교해 보았을 때 10% 정도의 함량저하가 발생하는 것으로 확인됨.

- 이들 동결고추는 원형의 형태를 그대로 가지고 있다는 점에서 기능성 고추로의 홍보가 가능하다는 잇점을 고려하면 냉동 보관 후 동결건조하는 방식으로 제품을 생산하는 것도 좋을 것으로 기대됨.

○ 열풍건조 시 polyamine 함량 비교

동결 건조　　열풍 건조



Lane No.	Sample
1	건고추를 5% Perchloric acid 로 overnight 추출 (1g/5ml)
2	건고추를 5% Perchloric acid 로 overnight 추출 (0.1g/5ml)
3	건고추를 5% Perchloric acid 로 overnight 추출 (0.1g/5ml)

- 폴리아민 고함유 고추의 원형을 유지하는 방법으로 동결건조보다 저렴한 열풍건조의 방법을 고려해 보았다.

- 완전히 건조된 상태에서 믹서를 이용하여 분말화 하였으며 이들 분말로부터 polyamine 양을 분석하였다.

- 동결건조에 의한 분말에서는 생물일 때의 고추와 유사한 양의 폴리아민이 검출되었으나, 열풍건조에 의한 고추는 전혀 검출되지 않았다.

- 열풍 건조의 경우 수분이 있는 상태에서 고온으로 진행되기 때문에 polyamine의 물질 변화가 유도되어 검출되지 않은 것으로 추측된다.

- 또한 분말의 색깔도 동결건조 된 고추분말이 풋고추 색과 유사하게 보여진다.

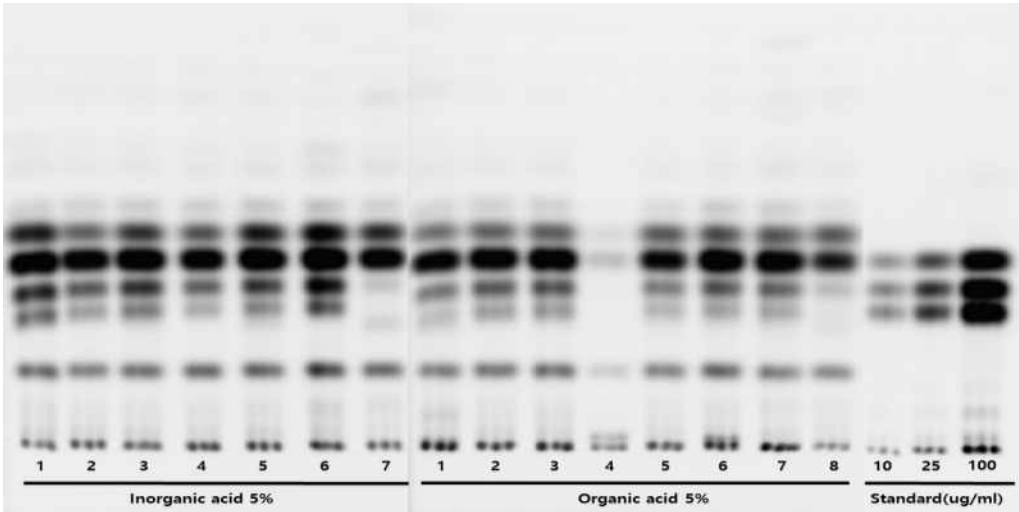
- 따라서 풋고추 분말제품은 동결건조를 이용한 건조 후 제조하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

2) **폴리아민의 고함유 고추로부터 폴리아민 최적 추출(산업화 수준의 스케일업 공정 개발)**

가) **산 용매**를 이용한 polyamine 추출 최적 용매 비교 [14)]

(1) 여러 가지 산 종류를 이용하여 이전과 동일하게 추출, 유도체화 후 TLC로 분석한다.
(2) 선정된 용매는 농도별로 High performance liquid chromatography(HPLC)를 이용해 분석하여 최적 용매의 조건을 선정한다.

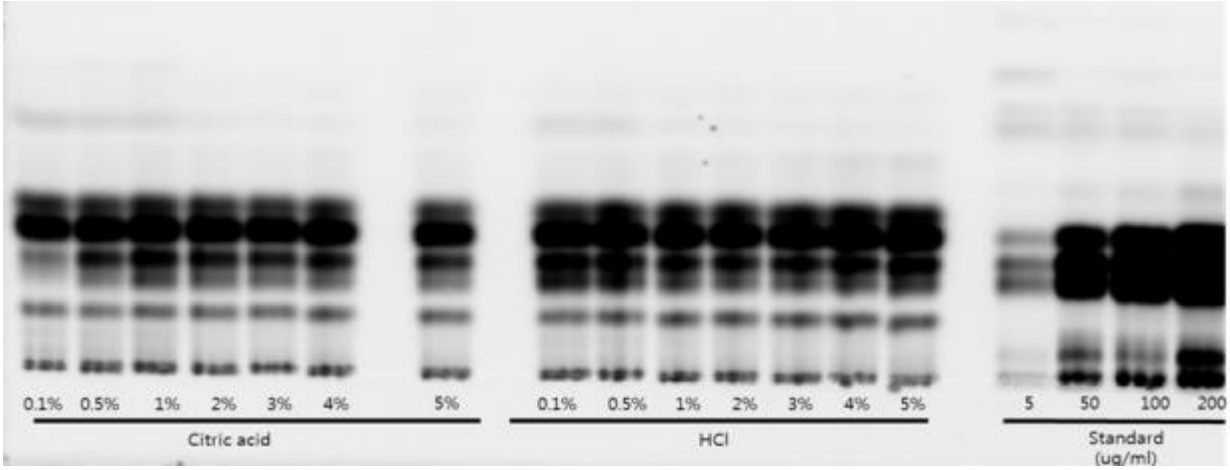
○ 여러 종류별 산 용매의 polyamine 함량 비교



Acid type	No.	Acid
Inorganic acid	1	HCl
	2	Meta phosphoric acid
	3	Perchloric acid
	4	Phosphoric acid
	5	Sulamic acid
	6	Sulfuric acid
	7	H2O(control)
Organic acid	1	Acetic acid
	2	Citric acid
	3	DL-malic acid
	4	Formic acid
	5	Maleic acid
	6	Malonic acid
	7	Phytic acid
	8	Deoxychloric acid

- 위 산 용매 중에서 HCl, perchloric acid, sulfuric acid, citric acid, DL-malic acid, maleic acid가 두드러졌다.
- 식품 및 화장품에 적합한 용매를 선정하기 위해 HCl과 citric acid를 선정 후 비교하였다.

○ Citric acid와 HCl 추출 용매 농도별 polyamine 함량 비교



- 농도 별 citric acid, HCl 추출물의 polyamine 함량 비교 시, citric acid는 0.1%에서 추출 효율이 낮으며 0.5% - 5%까지 큰 차이를 보이지 않는다.
- HCl의 경우 0.1% - 5%까지 큰 차이가 없으며, 가장 이상적인 추출 산 용매로서 낮은 산 농도인 0.1% - 0.5% HCl(pH 4.0)이 바람직하다.
- 보다 정확히 측정하기 위해 HPLC 분석을 진행한다.

○ HPLC 분석을 통한 산 용매 별 polyamine 추출 최적 용매 비교

(1) HCl 농도 별로 추출은 이전과 동일한 방법으로 진행한다.
(2) Toluen 층 200ul를 새로운 e-tube에 옮기고 질소 가스 하에서 제거한다.
(3) 남은 유도체화 잔사에 methanol 1ml으로 재 용해 시킨다.
(4) 이후 syringe filter(Minisart, 0.2um)를 통해 HPLC 전 처리를 진행한다.
(5) 아래와 같은 조건에서 HPLC 분석을 진행한다.

○ Polyamine(putrescine, spermine, spermidine) HPLC 분석조건

- Column: TC-C18 column (250 mm X 4.6 mm i.d., particle size 5 ㎛, Agilent, USA)
- 이동상: Water (A), MeOH (B)

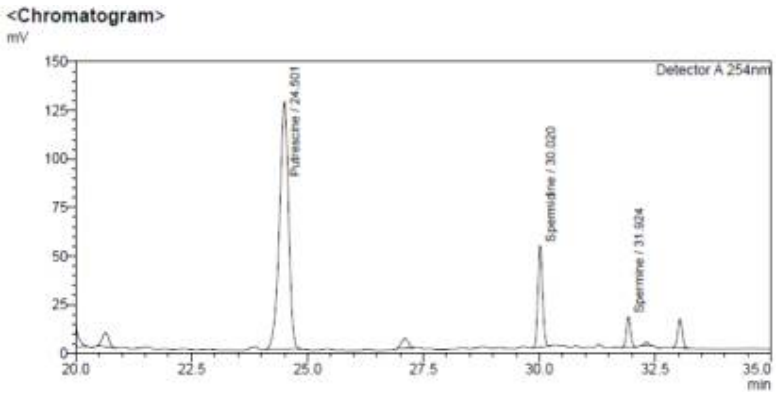
  gradient elution:

Time (min)	A (Water)	B (MeOH)
0	50	50
7	35	65
13	20	80
18	20	80
24	0	100
29	0	100
33	50	50
40	50	50

- Flow-rate: 0.7 mL/min
- Column Temperature: 30 ℃
- Detector: UV 254 nm

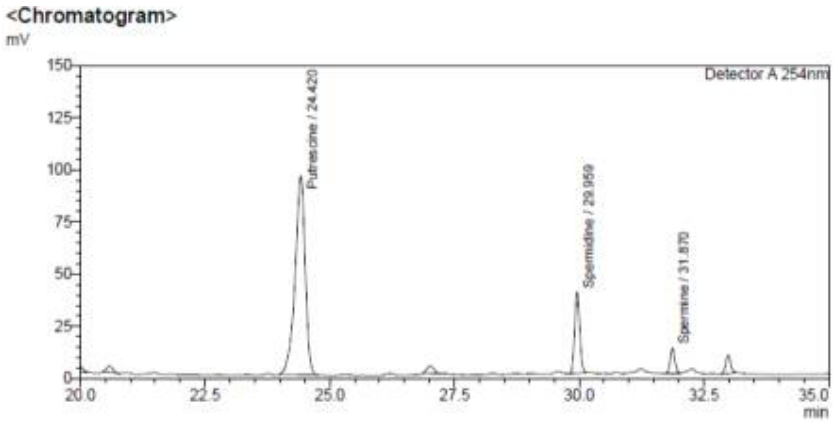
Ref. : *Plant Physiol.*, **1989**, *89*, 512-517

○ 0.1% HCl



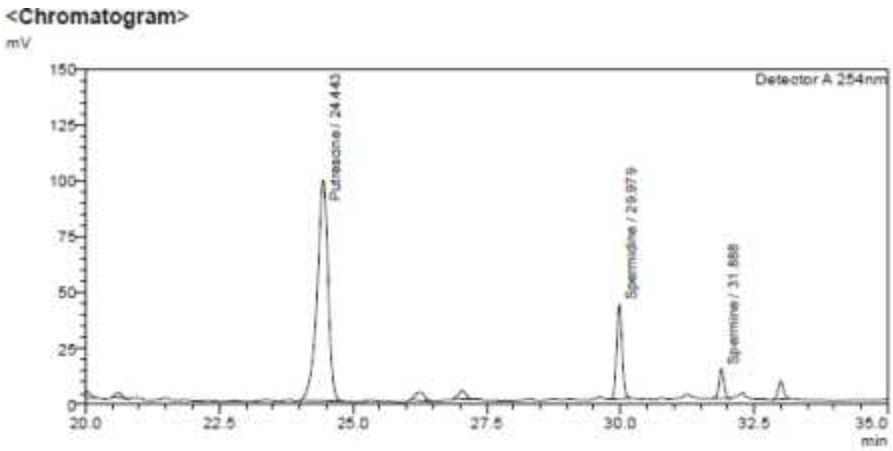
0.1% HCl	1set	2set	3set	Avg	SD
PUT	248.3	265.3	256.0	256.6	8.5
SPD	77.4	80.6	77.9	78.7	1.7
SPM	35.7	35.8	35.7	35.8	0.1

○ 1% HCl



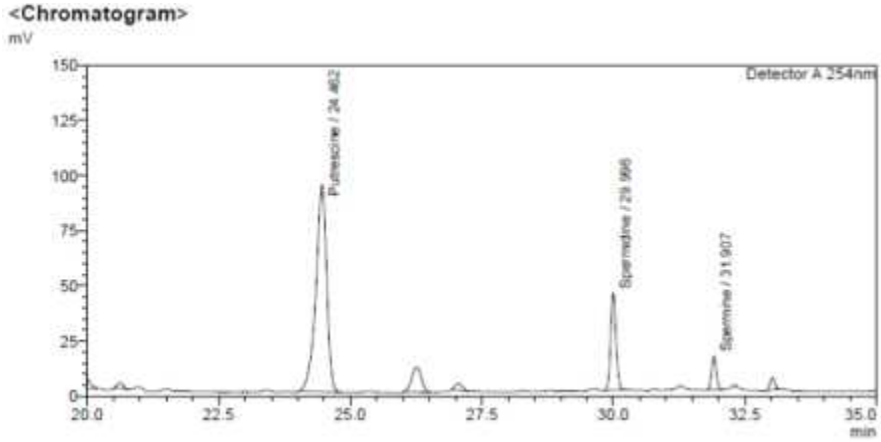
1% HCl	1set	2set	3set	Avg	SD
PUT	211.1	204.6	208.5	208.1	3.3
SPD	62.6	60.7	61.7	61.7	0.9
SPM	29.5	27.7	28.6	28.6	0.9

○ 2.5% HCl



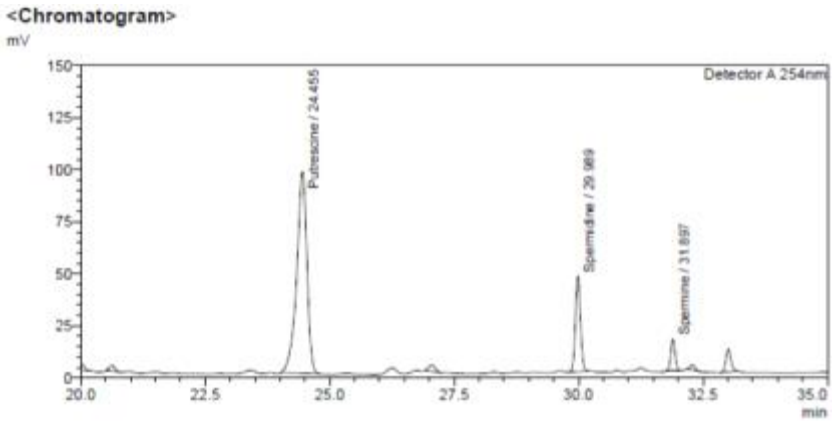
2.5% HCl	1set	2set	3set	Avg	SD
PUT	224.2	212.7	229.5	222.2	8.6
SPD	76.1	66.6	77.9	73.5	6.1
SPM	37.2	30.6	37.9	35.2	4.0

○ 5% HCl



5% HCl	1set	2set	3set	Avg	SD
PUT	210.8	243.3	204.1	219.4	21.0
SPD	71.9	87.1	69.9	76.3	9.4
SPM	36.9	44.3	34.9	38.7	5.0

○ 5% Perchloric acid



5% PCA	1set	2set	3set	Avg	SD
PUT	186.3	216.6	211.8	204.9	16.3
SPD	60.3	74.3	72.8	69.1	7.7
SPM	28.0	35.8	35.1	33.0	4.3

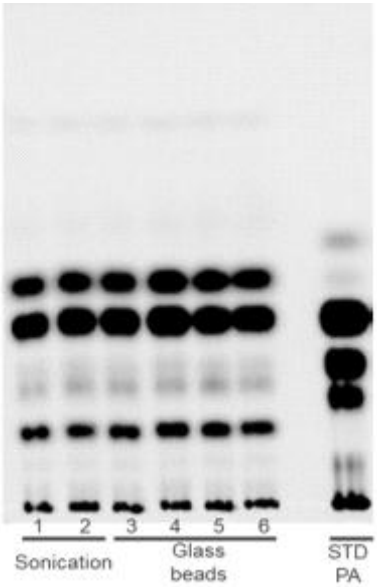
- 위 결과에서 0.1% HCl의 추출 효율이 가장 낮은 pH로 우수했으며, 기존 방법의 용매인 5% perchloric acid와 크게 차이가 나지 않는다.
- 따라서 약산성 조건의 0.1 - 0.5%은 산업화 공정의 대량 추출에서 바람직하다.
- 추가적으로 산 가수분해 추출 이외에 추출 방법을 모색하여 추출 효율을 개선한다.

나. **물리적 파쇄**에 의한 추출 효율 평가

○ 물리적 방법(sonication, glass beads)을 이용한 추출 효율 평가

(1) 산 용매 대신 증류수로 이전과 동일한 추출 배수로 추출한다.
(2) Sonication의 경우 이전과 동일하게 추출 후 Max Hz으로 30min(sonication 1min, rest 30sec)간 on ice에서 진행한다.
(3) Glass beads의 경우 직경 4mm의 glass beads 4.0g을 넣고 이전과 동일하게 추출한다.
(4) 각 방법에 대한 대조군은 증류수로만 추출하였다.

○ 물리적 방법(sonication, glass beads) 처리에 따른 polyamine 함량 비교



Method	No.	Sample
Sonication	1	냉장
	2	냉동
Glass beads	3	Glass beads 파쇄
	4	Glass beads 파쇄 후 sonication
	5	Control – glass beads 파쇄
	6	Control – glass beads 파쇄 후 sonication

- 위 결과에서 물리적 방법에 의한 polyamine 추출은 적합하지 않다.

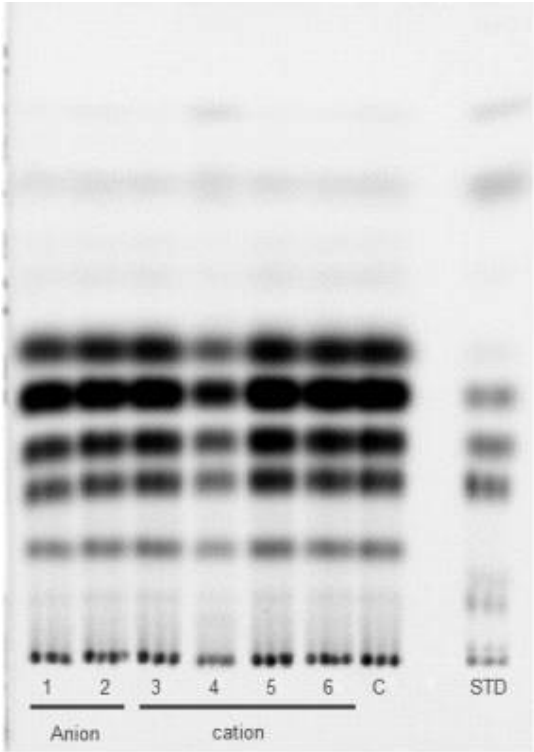
- Polyamine은 저분자 양이온 물질로서 정전기적 결합을 제거하기 위해 산 가수분해 추출이 가장 적합하다.
- 따라서 polyamine 가수 분해 추출 후 정제를 통해 순도를 향상시킨다.

다. **컬럼크로마토그래피**를 이용한 폴리아민 부분 정제[16)]

○ Ion exchange chromatography를 이용한 polyamine의 정제

(1) 종류별 resin 1g을 50ml conical에 칭량 후 DW 35ml로 swelling 시킨다.
(2) Resin을 제외한 DW을 버리고 anion, cation을 각각 0.2N의 NaOH와 HCl을 처리한다.
(3) NaOH, HCl을 제거하고 증류수로 충분히 resin에 흘려보낸다.
(4) 0.1 - 0.5% HCl extract를 loading 한다.
(5) 유속을 일정하게 조절하며, pH를 측정해 extract를 충분히 흡착시킨다.
(6) 이후 cation exchanger의 경우 KCl으로 0.05M-1M까지 gradient를 주어 elution 시킨다.
(7) 본 실험에서는 4번 resin에서 polyamine binding이 확인되었기 때문에 KCl으로 진행한다.
(8) KCl 0.5 - 4M 순서로 elution 하며 수득된 분획은 동일하게 dansylation 진행한다.

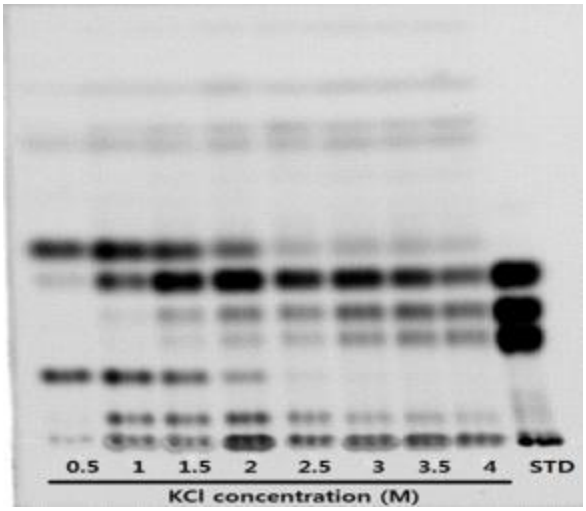
○ Resin 선택을 위한 anion/caion resin의 polyamine 흡착 평가



종류	No.	Name
Anion	1	DEAE-Cellulose
	2	DOWEX 1X2-100 strongly basic anion exchanger
Cation	3	CM Sephadex
	4	Amberlite 200 strongly acidic cation exchanger
	5	Amberlite weakly acidic cation exchange, hydrogen form
	6	Amberlite IRC-50 ion exchange resin

- Cation ion exchange resin인 4번 resin에서 polyamine 양의 줄어든 것을 보아 polyamine이 흡착한다는 것을 확인했다.
- Cation ion exchange resin에 polyamine을 흡착시키고 elution 하여 정제를 진행한다.

○ KCl(salt) 농도별 polyamine의 elution 평가



- Di-amine groupe(putrescine)은 1M. tri-amine group(spermidine)은 2M, tetra-amine group(spermine)은 3M 이상부터 elution 되는 것을 확인했다.
- 해당 농도로 다량의 sample을 흡착, 용출시켜 polyamine을 정제한다.

○ Cation exchange chromatography fraction의 동결건조 문제점

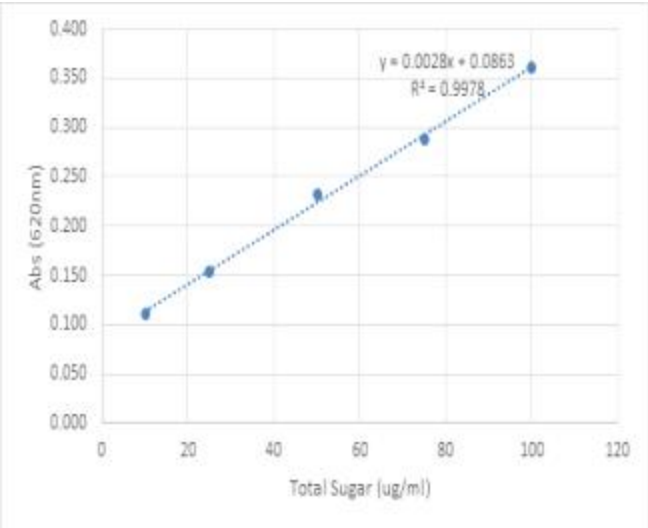
- 고 농도의 KCl(salt)를 이용하기 때문에 동결 건조 시, 용매인 수분은 제거되며 용질인 polyamine과 다량의 salt가 생성된다.
- 이는 식품 및 화장품 원료로 가공되는 과정에 있어서 제한적이다.
- 이를 해결하기 위해 HCl으로 용출 후 동결건조를 위해 산을 제거 및 중화 시 중화 염(salt)가 생성되어 동일한 문제가 발생한다.
- 이외에 dialysis를 이용해 desalting과정을 진행하였지만 저분자인 polyamine과 salt의 분리는 제한적이다.
- 따라서 polyamine이 흡착되지 않는 anion exchange resin을 이용해 polyamine의 순도를 높인다.

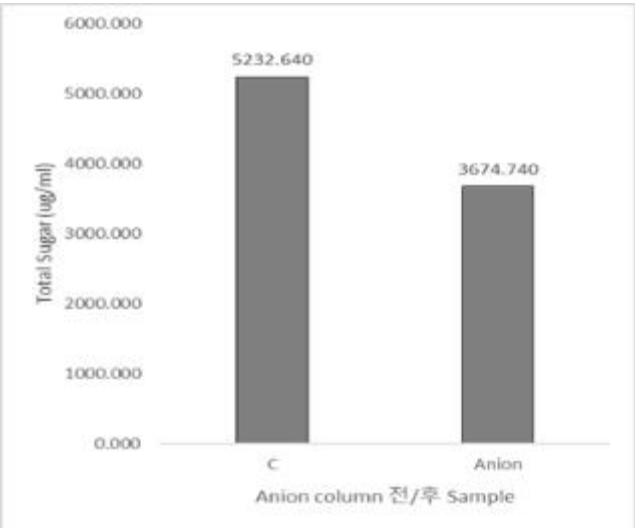
- anion exchange chromatography가 polyamine이외의 불순물인 당과 같은 2차 대사 산물을 제거하는지 당 정량법을 통해 평가한다.

○ Anthrone method를 이용한 anion exchange chromatography 전, 후의 전당정량

(1) 검체 적당량을 취하여 환원당이 1 mL에 10 ~ 100 μg이 함유되도록 희석하여 검액으로 한다.
(2) Glucose solution을 물로 희석하여 10 ug/mL의 표준 희석액을 만든다.
(3) 검액 및 표준 희석액을 각각 1 mL씩 취하여 0.2% anthrone (in 70% H2SO4) 10 mL씩을 가하고 진탕 혼합하여 100 ℃에서 15 분간 가열한 다음 빙수 중에서 급냉
(4) 상온에서 1h 정치 후 분광광도계를 사용하여 파장 620 nm에서 흡광도를 측정한다.
(5) 표준 희석액의 측정치에 의한 검량선을 만들어 검액의 측정치를 비교하여 검액의 희석도를 곱하여 검체의 환원당 함량을 구한다.

○ Anthrone 전당(total sugar) 정량





- Anion exchange chromatography를 통해 산 추출물의 당들이 부분적으로 제거되는 것을 확인했다.

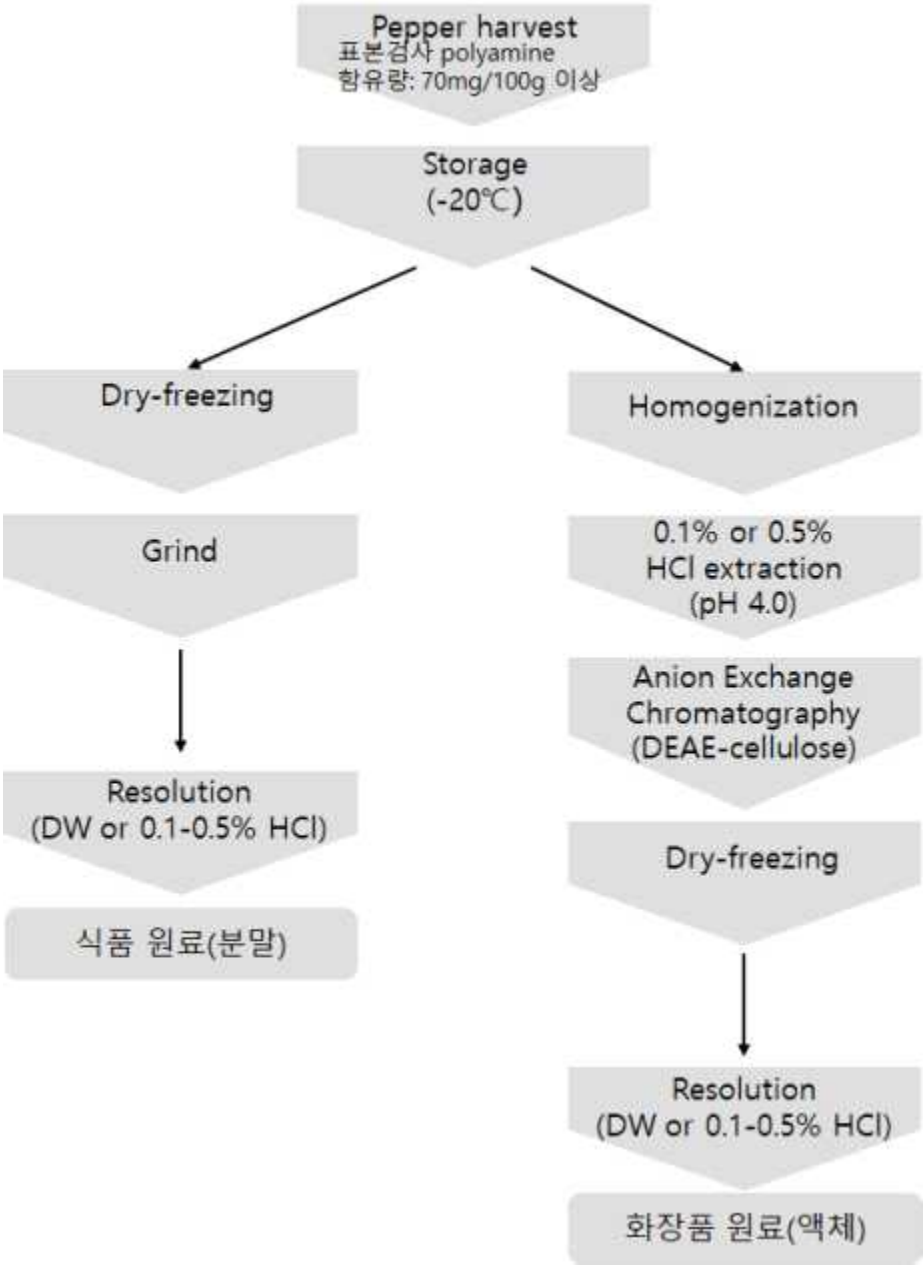
- 따라서, 부분 정제로 anion exchange chromatography를 이용해 polyamine을 정제하는 것은 산업적 스케일업 공정에 있어 바람직하다.

라. 확립된 대량추출공정

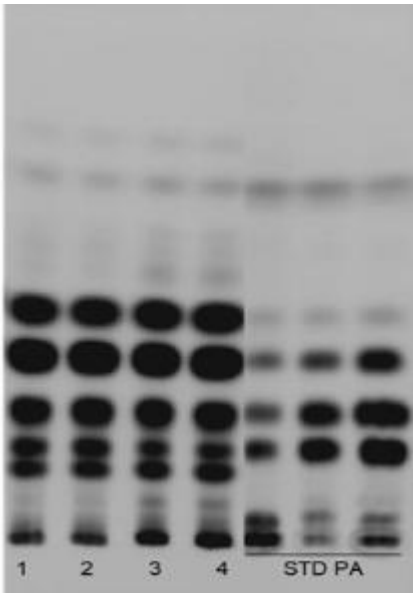
○ HCl extraction, Anion exchange chromatography, 동결건조를 통한 polyamine 함량

(1) 1kg의 sample을 0.5% HCl 2x volume인 2L로 두 번 추출한다. (sample이 많을수록 수분을 고려해 pH가 높아지지 않도록 0.5% HCl로 추출)
(2) 해당 sample은 anion exchange chromatography를 통해 부분 정제
(3) 동결 건조 후 polyamine의 yield를 계산한다.

○ **대용량 폴리아민 고함유 고추로부터의 폴리아민 추출공정**



○ 확립된 추출공정에 의한 polyamine yield 비교



Lane No.	Sample
1	해동한 고추 추출액 (1kg/2000ml of 0.5% HCl)
2	1회차 음이온 교환 컬럼 fraction (1000ml의 sample에 대한 컬럼, 용액양은 1000ml)
3	2회차 음이온 교환 컬럼 fraction (1000ml의 sample에 대한 컬럼, 용액양은 950ml)
4	2번의 동결건조물 재용해 (0.1g/10ml 0.5% HCl)

1ml	Putrescine (μg)	Spermidine (μg)	Spermine (μg)	Total (μg)	SPD+SPM (μg)	수율(%)
1	261	124	114	499	238	
2	258	122	116	497	239	
3	256	125	84	465	209	
4	260	124	81	466	205	93.0

1000ml	Putrescine (μg)	Spermidine (μg)	Spermine (μg)	Total (μg)	SPD+SPM (μg)
1	261,126	124,262	114,025	499,413	238,287
2	258,456	122,261	106,256	486,973	228,517
3 (950ml)	243,000	118,955	79,949	441,904	198,904
동결건조물 1g 당	Putrescine (μg)	Spermidine (μg)	Spermine (μg)	Total (μg)	SPD+SPM (μg)
	26016	12422	8116	46553	20537

- 위와 같이 정량되었으며, total polyamine(putrescine, spermidine, spermine)은 약 46mg/g으로 측정되었다.
- Yield는 약 93.0%로서 일부 loss를 제외하고 높은 수치를 확인했다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 논문 투고 실적(논문 투고 1편)

- Anti-inflammatory effect of pepper extract with high polyamine content
- 투고저널: Phamaceutical Biology

Pharmaceutical Biology

Anti-inflammatory effects of pepper extract with high polyamine content

Journal:	*Pharmaceutical Biology*
Manuscript ID	NPHB-2021-0035
Manuscript Type:	Original paper
Date Submitted by the Author:	20-Jan-2021
Complete List of Authors:	So, Sun Hyeon; Kangwon National University Kim, Hee Woong; Kangwon National University Rhee, Hae Ik; Kangwon National University Lee, Deug Chan; Kangwon National University
Keywords:	polyamine, pepper, acid hydrolysis extraction, inflammation, nitric oxide, cytokine

SCHOLARONE™
Manuscripts

(2) 정량적 연구개발성과

가. 특허 실적 (특허출원 1건)

- 항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 유효 추출 방법
- 특허출원통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자	2021.01.08
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2021-0002493 (접수번호 1-1-2021-0025330-00) (DAS접근코드9DCF)
출원인 명칭	농업회사법인 주식회사 해피바이오텍(1-2021-001866-8)
대리인 성명	위병갑(9-2004-000155-3)
발명자 성명	양승균 지영권 이득찬 이해익
발명의 명칭	항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추 추출물의 유효 추출 방법

특 허 청 장

나. 품종보호출원 실적 (품종보호출원신청 1건)

- 품종명칭 에이아이지01
- 출원번호 통지서

품종보호출원번호 통지서

출원일자 : 2021. 1. 7.	품종보호 출원번호 : 출원 2021 - 21 품종명칭 출원번호 : 명칭 2021 - 77

작 물 명 : 고추
품종 명칭 : 에이아이지01
출 원 인 : 지영권
주 소 : 경기도 이천시 장호원읍 성주로 145-14, 에이스종묘

2021년01월07일

국 립 종 자 원 장

다. 시제품 제작 실적 (시제품제작 5건)

1) 폴리아민 고함유 고추추출물을 활용한 가공제품 5종 개발

- 제품출시 확인서

과 제 명	폴리아민 고함유 고추의 가공 제품 개발		
주관연구기관	해피바이오텍	참여기관	
연구책임자	양승균	연구기간	2019년 05월~ 2021년 01월 (총20개월)
총 정부출연금	175,000,000 원		

해당 기술의 제품출시 유형			
시제품(제품출시 예정)	(0)	기존 제품 공정개선	( )
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )

제품 출시 실적

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
1. PEPPER POLYAMINE 10	1. PEPPER POLYAMINE 10	1. PEPPER POLYAMINE 10 - 폴리아민 10mg/100mL함유 화장품 소재	2020. 12	100%
2. PEPPER POLYAMINE 200	2. PEPPER POLYAMINE 100	2. PEPPER POLYAMINE 200 - 폴리아민 200mg/100mL함유 화장품 소재		

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

3. 폴리아민 녹차 아이스크림	3. 폴리아민 녹차 아이스크림	3. 폴리아민 녹차 아이스크림 - 폴리아민 15mg/100g 함유 아이스크림		
4. 폴리아민 고추 분말 200	4. 폴리아민 고추 분말 200	4. 폴리아민 고추 분말 200 - 폴리아민 200mg/100g 함유 식품 소재		
5. 폴리아민 고추 분말 50	5. 폴리아민 고추 분말 50	5. 폴리아민 고추 분말 50 - 폴리아민 50mg/100g 함유 식품 소재		

* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)
**식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수

상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.

2) 폴리아민 고함유 고추추출물을 활용한 가공제품 분석 성적서
- 이화학적 분석성적서

이화학적 분석성적서

분 석 년 월 일	2020. 12. 15.	제조(수입)년월일 (Batch No.)	-
유효성분의 명칭 및 함유량	Polyamine		

분 석 결 과

분석항목	분석샘플	Total polyamine(mg/100ml)	분석방법
1. 유효성분	Sample 1	11.5098	HPLC/UVD를 이용한 성량 분석
	부서샘플	Total polyamine(mg/100g)	
	Sample 3	55.6516	
	Sample 4	204.565	
2. 물리성	형동	검사결과	
	수화성	- 해당사항 없음 -	
	분말도	- 해당사항 없음	
3. 외관	성상	- 색상 - 냄새 -	
4. 시험항목 (의뢰자 기재)	-		

첨부 자료
(1) 성적개산서 및 크로마토그램

1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.
2) 본 성적서를 손피는 광고, 선전, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.

2020 년 12 월 29 일

친환경농산물안전성센터

이화학적 분석성적서

고 서 년 월 일	2020. 02. 23.	제조(수입)년월일 (Batch No.)	-
유효성분의 명칭 및 함유량	Polyamine		

분 석 결 과

분석항목	분석샘플	Total polyamine(mg/100ml)	분석방법
1. 유효성분	Sample 2	234.449	HPLC/UVD를 이용한 정량 분석
2. 물리성	항목	검사결과	
	수화성	- 해당사항 없음 -	
	분말도	- 해당사항 없음	
3. 외관	성상	색상	냄새
4. 시험항목 (의뢰자 기재)	-		

첨부 자료
○ 성적세산서 및 크로마노그램

1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.
2) 본 성적서의 결과는 광고, 선전, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.

2021 년 02 월 23 일

친환경농산물안전성센터

마. 사업화 성과 및 매출실적

1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원
			향후 3년간 매출	3 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원
			향후 3년간 매출	2 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	5	7
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	5	7
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)				
	수 출				

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Anti-inflammatory effect of pepper extract with high polyamine content	Phamaceutical Biology	소순현		USA	Tayor and Francis group	SCIE	투고	1388-0209	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	에이아이지01(고추)	품종보호출원 2021-21	국립종자원	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 유효 추출 방법	대한민국	농업회사법인 해피바이오텍	2021.01.08	10-2021-0002493					100	활용 예정

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√								√	

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1」]	인증여부[2」]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3」]	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1」]	표준명	표준기구명[2」]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3」]	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	PEPPER POLYAMINE 10	2020.12	㈜달기알		화장품 소재		친환경농산물안전성센터	2020.12.29
2	PEPPER POLYAMINE 200	2020.12	㈜달기알		화장품 소재		친환경농산물안전성센터	2021.2.23
3	폴리아민 녹차 아이스크림	2020.12	㈜달기알		아이스크림		친환경농산물안전성센터	2020.12.29
4	폴리아민 고추 분말 200	2020.12	㈜달기알		식품 소재		친환경농산물안전성센터	2020.12.29
5	폴리아민 고추 분말 50	2020.12	㈜달기알		식품 소재		친환경농산물안전성센터	2020.12.29

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1]	사업화 형태[2]	지역[3]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」기술이전 또는 자기실시
* 2」신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과			제품개발 및 판매		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
			0	5	7
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0	5	7
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
		구분	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2019		1	1		1	1					2
		2020		2	2		2	2					4

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
1) 고추추출 폴리아민의 세포차원에서의 효능평가	- 합성 폴리아민 및 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료 - 폴리아민에 의한 세포 증식 및 세포 단백질 증가 영향 검토 완료 - 폴리아민에 의한 항염증 활성 검토 완료 - 이들 결과는 현재 논문 투고(1편) 하였음	100
2) 고추로부터 폴리아민의 추출조건 및 부분정제 조건 검토	- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료 - 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료(특허 출원 1건) - 폴리아민 고함유 고추의 건조방법에 따른 함유량 비교 완료 - 폴리아민 고함유 고추의 저장조건에 따른 함유량 비교 완료	100
3) 폴리아민 고함유 고추추출물 식이 마우스의 혈액이행 검토	- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료 - 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있음 - 이는 추후 논문 투고(1편)를 계획하고 있음	100
4) 고추로부터 산업화 수준의 폴리아민 최적 추출 검토	- 폴리아민 고함유 고추로부터 분말상 식품 소재 개발을 위한 추출공정 확립 - 폴리아민 고함유 고추로부터 액상 화장품 소재 개발을 위한 추출공정 확립	100
5) 5~100mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말상 소재개발	- 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 50mg/100g 식품소재 개발 - 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 200mg/100g 식품소재 개발 - 분석성적서	100
6) 10~200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발	- 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 10mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 200mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 분석성적서	100
7) 12mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 가공식품 개발	- 폴리아민 15mg/100g 함유 녹차아이스크림 제작	100

3) 목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10					70											10		10	
최종목표	1					4						1		1.5	1		4		2	
연구기간 내 달성실적	1					5						1		2.5	0		6		0	
달성율(%)	100					125						100		167	0		150		0	

4) 연구개발 성과물

(1) 지적재산권(특허)

- 항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 유효 추출방법
  - 출원인: 양승균, 지영권, 이득찬, 이해익
  - 출원일: 2021.01.08.
  - 출원번호: 10-2021-0002493

(2) 품종보호출원

- 폴리아민 고함유 고추 품종보호출원
  - 작 물 명: 고추
  - 품종명칭: 에이아이지01
  - 출원일자: 2021.01.07.
  - 품종보호출원번호: 출원2021-21
  - 품종명칭출원번호: 명칭2021-77

(3) 국내외 논문 게재

- Anti-inflammatory effects of pepper extract with high polyamine content
  - 저널: Pharmaceutical Biology

- 투고ID:NPHB-2021-0035

(4) 시제품 5종 제작

● 폴리아민 고함유 액상 소재

- 10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종

● 폴리아민 고함유 분말상 소재

- 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종

● 폴리아민 고함유 가공식품

- 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

가. 미달성 목표

- 홍보 실적(2건) : 코로나19 상황에 의한 소극적 대처로 목표 달성을 이루지 못했음. 이에 대한 달성 계획을 종료1년차에 착실히 준비해서 진행하도록 하겠음.

2) 자체 보완활동

가. 홍보를 위한 식품박람회 참가 계획

- GTI 박람회에 참가예정: 2021년 10월 개최 되는 GTI 박람회에 참가하고자 함.

3) 연구개발 과정의 성실성

가. 개발과정에 있어서의 성실성

- 2020년 장마철이 길어짐과 고추 수확량이 줄어든 힘든 과정에서 해피바이오텍과의 원할한 연구활동 조율하에 폴리아민 고함유 고추의 추출조건 및 시제품 제작을 성공리에 수행하고 고추폴리아민의 마우스에 있어서의 생리적 활성 또한 검증한 것은 과제 수행에 있어 성실히 임했음을 보여주는 것으로 판단됨.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1) 폴리아민 고함유 고추추출물의 생리적 활성 분석

- 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료

  : 이는 폴리아민 고함유 추출물의 안정성을 검토한 연구 성과로서 식품 및 화장품 개발에 있어 안정성을 검토를 위한 기반으로 활용될 것임.

- 폴리아민에 의한 세포증식 및 세포 단백질 발현 증가, 항염증 활성 확인

  : 세포에서의 폴리아민 활성을 평가함으로써 폴리아민 고함유 고추 그 자체 및 개발 제품의 홍보에 사용 되어질 것으로 기대됨

- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료

  : 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있으며 추후 폴리아민 고함유 고추 및 이를 이용한 제품의 홍보에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

2) 폴리아민 고함유 고추추출물의 추출 조건 확립

- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료

  : 폴리아민 고함유 고추 재배를 위한 재배기간 및 재배지 등을 검토하였으며, 고농도의 고추 캡사이신은 추후 제품개발에 있어 제한적이므로 저함유 고추의 재배 조건 등을 검토 완료하였음.

- 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료

  : 폴리아민 고함유 고추의 폴리아민은 유리된 상태가 아닌 타 성분과 결합되어져 있는 것으로 판단됨에 따라 이들 고추로부터 고농도의 폴리아민을 추출하기 위한 여러 가지 용매들의 추출효율을 검토 함. 이들 고농도의 폴리아민 함유 추출물은 추후 가공제품 제작에 유용하게 활용될 것으로 기대됨.

- 폴리아민 고함유 고추의 저장 및 건조방법에 따른 함유량 비교 완료

  : 대부분의 농작물이 그렇듯이 고추 또한 재배 및 수확이 제한적인 농작물이므로 이들의 특정시기에의 수확에 따른 저장 및 건조 방법을 검토함으로써 폴리아민의 함량에 변화가 없는 조건을 마련함.

- 다량의 폴리아민 고함유 고추의 최적 추출 검토

  : 다량의 폴리아민 고함유 고추의 추출 조건을 최적화하기 위한 조건을 확립하였으며 이는 추후 식품 및 화장품 소재와 가공품 제작을 위해 고농도의 추출물이 유용하게 활용될 것으로 기대됨.

3) 폴리아민 고함유 고추추출물을 활용한 가공제품 개발

- 10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종

: 폴리아민 고함유 고추 추출물을 활용한 화장품 원료 개발함으로써 추후 항염증 등에 유용한 화장품 제품개발에 이용되어질 것으로 기대됨

- 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종

: 폴리아민 고함유 동결고추추출물을 활용한 식품분말소재의 개발로 여러 가지 음식물에 첨가용도의 제품으로 활용되어질 것으로 기대됨

- 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발

: 폴리아민 고함유 고추추출물 가공 녹차아이스크림을 개발함으로써 여러 가지 가공품으로의 가능성을 보임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1) 연구 개발 성과의 현장 적응 방안

- 폴리아민 고함유 고추을 농가에 위탁재배한 후 농가로부터 전량 수매함으로써 농가 소득 증대 및 지역 활성화에 도움이 될 것으로 기대됨

- 위탁 재배 농가에 가공공장 설치로 시골 인력의 고용 증진이 기대됨

2) 연구 개발 성과의 실용화 제품화 방안

- 폴리아민 고함유 고추를 풋고추 형태로 마트에 판매함으로써 anti-aging의 기능성을 부각시킬 수 있음.

- 파우치, 타블렛, 캡슐 등의 휴대성이 간편한 제품으로의 개발로 판매 증가가 기대됨

3) 연구 개발 성과의 예상 활용 분야

- 건강기능성 성분 분석 체계 확립을 통한 주요 채소 작물에 확대 적용도 가능할 것으로 기대됨

- 건강기능성 고추를 활용한 기능부여 가공식품 산업 및 천연물 기원의 유용성분을 활용한 화장품 소재 산업 육성 증진도 기대됨

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		매년 목표치
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		1
	국외		
	계		1
인력양성	학사		
	석사		2
	박사		
	계		2
사업화	상품출시		3
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

	별첨 자료
별첨	1) 연구개발보고서 초록
	2) 자체평가의견서
	3) 연구성과 활용계획서
	4) 참고문헌

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="6">(국문) 폴리아민 고함유 고추의 가공 제품개발</td></tr>
<tr><td colspan="6">(영문) Development of processed products of high polyamine peppe</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">해피바이오텍</td><td rowspan="2">주 관 연 구 책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 해피바이오텍</td></tr>
<tr><td>연구수행기관</td><td colspan="2">강원대학교 산학협력단</td><td colspan="2">(성명) 양 승 균</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(220,000천원)</td><td>계</td><td>220,000,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2019. 05.~ 2021. 01.(1년 9월)</td></tr>
<tr><td>정부출연 연구개발비</td><td>175,000,000</td><td rowspan="3">총 참 여 연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>12명</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>45,000,000</td><td>내부인원</td><td>2명</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>10명</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

- 폴리아민 고함유 액상 화장품소재 개발
- 폴리아민 고함유 분말상 식품소재 개발
- 폴리아민 고함유 가공식품 개발

○ 연구내용 및 결과

1) 폴리아민 고함유 고추추출물의 생리적 기능 분석(논문 투고 1편, 논문 작성중 1편)
   - 고추 추출 폴리아민의 세포차원에서의 생리적 기능분석
   - 실험동물을 이용한 고추 추출 폴리아민의 혈액이행 분석

2) 폴리아민 고함유 가공제품 개발(특허출원 1건, 품종보호출원 1건, 시제품개발 5건)
   - 폴리아민 고함유 액상 및 분말상 소재 개발
   - 산업화 수준의 스케일업 공정 개발
   - 폴리아민 고함유 가공식품 개발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 다양한 화장품 및 식품 소재로 개발
- 농산물의 고부가가치 가공 제품화
- 고 폴리아민 고추를 활용한 제품 개발로 국내 종자산업의 국제경쟁력 제고

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		819004-02	
사업구분	농식품연구성과후속지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	농식품연구성과후속지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	폴리아민 고함유 고추의 가공 제품개발			과제유형	(개발)
연구기관	해피바이오텍			연구책임자	양 승 균
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	9개월	75,000	20,000	95,000
	2차연도	1년	100,000	25,000	125,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계				
참여기업 (연구수행기관)	강원대학교 산학협력단				
상 대 국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.02.19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
해피바이오텍	대표	양 승 균

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	양 승 균

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

(1) 연구개발결과물

- 고 폴리아민 함유 고추 추출물의 생리적 기능 검증
  - 폴리아민의 세포 증식 및 단백질 합성 증가 효능을 검증함.
  - 폴리아민 고함유 고추 추출물의 항염증 효능을 검증함.
  - 폴리아민 고함유 고추 추출물의 마우스 식이를 통한 혈액으로의 이행을 분석 및 효능 검증함.
  - 논문 1편 투고 및 논문 1편 작성중
- 폴리아민 고함유 고추추출물의 활성 관련 지식재산권 출원
  - "항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 휴효 추출방법"으로 특허출원 1건
- 폴리아민 고함유 고추의 품종 보호출원
  - "에이아이지01" 품종명칭으로 품종보호출원 1건
- 폴리아민 고함유 고추의 가공 제품 개발
  - 폴리아민 고함유 고추의 선발 조건 확립
  - 폴리아민 고함유 고추 추출물의 가공제품 제작을 위한 추출공정 확립
  - 폴리아민 화장품 소재 2건, 폴리아민녹차 아이스크림 1건, 폴리아민 분말 식품 소재 2건 개발

(10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종, 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종, 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발 1건)

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 국내 민간의 고추 육종 부분은 일반적으로 바이러스, 곰팡이, 세균병 등에 대한 내병성 품종 개발에만 역점을 두고 있으며, 고추의 재배법이나 작부체계 및 생산체계 개발에 관한 연구는 미미한 상황임
- 또한 고추의 기능성에 관한 육종으로는 색소와 캡사이신 추출 목적의 품종육종이 꾸준히 진행되어 왔으며 타산업인 제약 및 화장품 등의 관련산업과 연계하여 시장이 확대되고 있으나 이 이외의 기능성 물질에 대한 육성은 잘 알려진 바 없음
- 본 연구에 의해 개발된 기능성 품종 고속선발 체계에 의해 전통 육종에 편중되어 있는 국내 종자산업을 기능성 성분 분석을 통한 기초 기술 확립으로 국내 고추 육종 기술의 재도약이 기대됨
- 본 연구에 의해 폴리아민 고함유 고추는 현재 품종보호출원(1건)과 지식재산권 출원(1건), 폴리아민 식품 및 화장품 소재 개발(5건), 활성 관련 연구논문 투고(1편) 등의 개발 결과로 폴리아민 고함유 고추의 기능성 식품 및 화장품 소재로의 고부가가치 창출이 기대됨
- 따라서 개발된 폴리아민 고함유 고추 품종은 국내 이외에도 중국 및 해외 선진국 시장으로의 진출 가능성이 높을 것으로 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 연구 개발 성과의 현장 적응 방안
  - 폴리아민 고함유 고추을 농가에 위탁재배한 후 농가로부터 전량 수매함으로써 농가소득 증대 및 지역 활성화
  - 위탁 재배 농가에 가공공장 설치로 시골 인력의 고용 증진
- 연구 개발 성과의 실용화 제품화 방안
  - 폴리아민 고함유 고추를 풋고추 형태로 마트에 판매
  - 파우치, 타블렛, 캡슐 등으로 제품 판매
- 연구 개발 성과의 예상 활용 분야
  - 건강기능성 성분 분석 체계 확립을 통한 주요 채소 작물에 확대 적용
  - 건강기능성 고추를 활용한 기능부여 가공식품 산업 육성 증진
  - 천연물 기원의 유용성분을 활용한 화장품 소재 산업 육성 증진
- 사업화 기술이전
  - 연구수행기관으로부터 기술이전 계약으로 지적재산권 확보

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구에 의해 창출된 연구성과(품종보호출원(1건)과 지식재산권 출원(1건), 폴리아민 식품 및 화장품 소재 개발(5건), 활성 관련 연구논문 투고(1편))에서 볼 수 있듯이 본 연구팀은 과제를 성실히 수행하였다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

(1) 지적재산권(특허)

- 항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 유효 추출방법
  - 출원인: 양승균, 지영권, 이득찬, 이해익
  - 출원일: 2021.01.08.
  - 출원번호: 10-2021-0002493

(2) 품종보호출원

- 폴리아민 고함유 고추 품종보호출원
  - 작 물 명: 고추
  - 품종명칭: 에이아이지01
  - 출원일자: 2021.01.07.
  - 품종보호출원번호: 출원2021-21
  - 품종명칭출원번호: 명칭2021-77

(3) 국내외 논문 게재

- Anti-inflammatory effects of pepper extract with high polyamine content
  - 저널: Pharmaceutical Biology
  - 투고ID:NPHB-2021-0035

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
● 고추추출 폴리아민의 세포차원에서의 효능평가	20	100	- 합성 폴리아민 및 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료 - 폴리아민에 의한 세포 증식 및 세포 단백질 증가 영향 검토 완료 - 폴리아민에 의한 항염증 활성 검토 완료 - 이들 결과는 현재 논문 투고(1편) 하였음
● 고추로부터 폴리아민의 추출조건 및 부분정제 조건 검토	20	100	- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료 - 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료(특허 출원 1건) - 폴리아민 고함유 고추의 건조방법에 따른 함유량 비교 완료 - 폴리아민 고함유 고추의 저장조건에 따른 함유량 비교 완료
● 폴리아민 고함유 고추추출물 식이 마우스의 혈액이행 검토	10	100	- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료 - 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있음 - 이는 추후 논문 투고(1편)를 계획하고 있음
● 고추로부터 산업화 수준의 폴리아민 최적 추출 검토	10	100	- 폴리아민 고함유 고추로부터 분말상 식품 소재 개발을 위한 추출공정 확립 - 폴리아민 고함유 고추로부터 액상 화장품 소재 개발을 위한 추출공정 확립
● 5~100mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말상 소재개발	15	100	- 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 50mg/100g 식품소재 개발 - 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 200mg/100g 식품소재 개발 - 분석성적서
● 10~200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발	15	100	- 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 10mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 200mg/100mL 함유 화장품 소재 개발 완료 - 분석성적서
● 12mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 가공식품 개발	10	100	- 폴리아민 15mg/100g 함유 녹차아이스크림 제작
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구과제는 1) 기능성 품종의 신속 선발 체계에 의해 개발된 폴리아민 고함유 고추의 생리적 기능을 검증하고, 2) 폴리아민 고함유 고추의 추출 조건을 확립 후 이를 이용한 가공제품의 개발을 목적으로 19개월간 수행해 왔음.
- 연구목표를 달성하기 위하여 1) 고추추출 폴리아민의 세포차원에서의 효능을 평가하여 세포증식 및 세포단백질 증가, 항염증의 효능이 있음을 확인하였으며, 2) 이 고추추출 폴리아민은 마우스 식이 실험에서 혈행으로 이행됨을 확인하였음, 3) 또한 폴리아민 고함유 고추로부터 폴이아민의 추출조건 및 부분정제 조건 등을 검토하고, 4) 이를 바탕으로 제품을 만들기 위한 대량추출 공정을 확립하였음, 5) 최종적으로 고추추출 폴리아민 저/고함유 액상 소재 및 분말상 소재와 고추추출 폴리아민 함유 가공제품 제작 등의 연구를 진행하였음.
- 연구성과물로는 시제품 제작 5건, 특허출원 1건, 논문 1편 투고, 품종출원 1건 신청과 더불어 현재 논문 1편을 투고 준비중에 있음.
- 본 연구과제의 성공적 수행으로 창출된 성과에 의해 건강기능성 성분 분석 체계 확립을 통한 주요 채소 작물에 확대 적용, 건강기능성 고추를 활용한 기능부여 가공식품 산업 육성 증진, 천연물 기원의 유용성분을 활용한 화장품 소재 산업 육성 증진 등을 기대할 수 있음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 폴리아민 고함유 고추의 고부가가치 창출 및 홍보를 위한 전략 제안: 냉동시설 및 동결건조 시설확보 지원 사업이 필요함

- 본 연구과제의 성과에 의해 폴리아민 고함유 고추를 활용한 제품의 개발이 성공적으로 이루어짐. 다만, 고추라는 작물은 여러 가지 재배 조건에 수확량의 변동이 발생될 수 있음. 작황이 풍부할 때 생물을 저장할 수 있는 대형 냉동시설의 확보 사업 등의 지원이 필요하다고 판단됨.

- 또한 농산물의 형태를 그대로 유지한 제품의 경우 “기능성”에 대한 용어를 사용한 홍보가 가능함. 본 연구과제에서 도출된 폴리아민 고함유 고추의 최적 건조 방법은 동결건조법임. 이 방법의 경우 고추의 형태를 그대를 유지한 상태에서 건조가 가능하며 폴리아민의 함량 변화도 없는 것으로 나타났으나 외부기업에 의뢰할 경우 건조비용이 고가로 책정됨. 따라서 동결건조 시설의 확보 사업 등의 지원이 필요하다고 판단됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

(1) 연구성과물

- 폴리아민 고함유 고추추출물의 효능 검증(논문 투고 1편)
  - 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료
    : 이는 폴리아민 고함유 추출물의 안정성을 검토한 연구 성과로서 식품 및 화장품 개발에 있어 안정성을 검토를 위한 기반으로 활용될 것임.
  - 폴리아민에 의한 세포증식 및 세포 단백질 발현 증가, 항염증 활성 확인
    : 세포에서의 폴리아민 활성을 평가함으로써 폴리아민 고함유 고추 그 자체 및 개발 제품의 홍

보에 사용 되어질 것으로 기대됨

- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료
  : 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있으며 추후 폴리아민 고함유 고추 및 이를 이용한 제품의 홍보에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

● 폴리아민 고함유 고추 추출 조건 확립(특허출원 1건, 품종보호출원 1건)

- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료
  : 폴리아민 고함유 고추 재배를 위한 재배기간 및 재배지 등을 검토하였으며, 고농도의 고추 캡사이신은 추후 제품개발에 있어 제한적이므로 저함유 고추의 재배 조건 등을 검토 완료하였음.
- 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료
  : 폴리아민 고함유 고추의 폴리아민은 유리된 상태가 아닌 타 성분과 결합되어져 있는 것으로 판단됨에 따라 이들 고추로부터 고농도의 폴리아민을 추출하기 위한 여러 가지 용매들의 추출효율을 검토 함. 이들 고농도의 폴리아민 함유 추출물은 추후 가공제품 제작에 유용하게 활용될 것으로 기대됨.
- 폴리아민 고함유 고추의 저장 및 건조방법에 따른 함유량 비교 완료
  : 대부분의 농작물이 그렇듯이 고추 또한 재배 및 수확이 제한적인 농작물이므로 이들의 특정 시기에의 수확에 따른 저장 및 건조 방법을 검토함으로써 폴리아민의 함량에 변화가 없는 조건을 마련함.
- 다량의 폴리아민 고함유 고추의 최적 추출 검토
  : 다량의 폴리아민 고함유 고추의 추출 조건을 최적화하기 위한 조건을 확립하였으며 이는 추후 식품 및 화장품 소재와 가공품 제작을 위해 고농도의 추출물이 유용하게 활용될 것으로 기대됨.

● 고추 폴리아민 고함유 소재 및 가공식품 개발(시제품 개발 5종)

- 10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종
  : 폴리아민 고함유 고추 추출물을 활용한 화장품 원료 개발함으로써 추후 항염증 등에 유용한 화장품 제품개발에 이용되어질 것으로 기대됨
- 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종
  : 폴리아민 고함유 동결고추추출물을 활용한 식품분말소재의 개발로 여러 가지 음식물에 첨가용도의 제품으로 활용되어질 것으로 기대됨
- 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발
  : 폴리아민 고함유 고추추출물 가공 녹차아이스크림을 개발함으로써 여러 가지 가공품으로의 가능성을 보임.

(2) 연구성과 활용 방안

● 연구 개발 성과의 현장 적응 방안

- 폴리아민 고함유 고추을 농가에 위탁재배한 후 농가로부터 전량 수매함으로써 농가소득 증대 및 지역 활성화에 도움이 될 것으로 기대됨
- 위탁 재배 농가에 가공공장 설치로 시골 인력의 고용 증진이 기대됨

● 연구 개발 성과의 실용화 제품화 방안

- 폴리아민 고함유 고추를 풋고추 형태로 마트에 판매함으로써 anti-aging의 기능성을 부각시킬 수 있음.
- 파우치, 타블렛, 캡슐 등의 휴대성이 간편한 제품으로의 개발로 판매 증가가 기대됨

● 연구 개발 성과의 예상 활용 분야

- 건강기능성 성분 분석 체계 확립을 통한 주요 채소 작물에 확대 적용도 가능할 것으로 기대됨

- 건강기능성 고추를 활용한 기능부여 가공식품 산업 및 천연물 기원의 유용성분을 활용한 화장품 소재 산업 육성 증진도 기대됨

Ⅳ. 보안성 검토

o “「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제		분 야	
연 구 과 제 명	폴리아민 고함유 고추의 가공 제품개발			
주관연구기관	해피바이오텍		주관연구책임자	양 승 균
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	175,000,000	45,000,000		220,000,000
연구개발기간	2019. 05.~ 2021. 01.(1년 9월)			
주요활용유형	□산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 ■기타(사업화) □미활용(사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1) 고추추출 폴리아민의 세포차원에서의 효능평가	- 합성 폴리아민 및 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료 - 폴리아민에 의한 세포 증식 및 세포 단백질 증가 영향 검토 완료 - 폴리아민에 의한 항염증 활성 검토 완료 - 이들 결과는 현재 논문 투고(1편) 하였음
2) 고추로부터 폴리아민의 추출조건 및 부분정제 조건 검토	- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료 - 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료(특허 출원 1건) - 폴리아민 고함유 고추의 건조방법에 따른 함유량 비교 완료 - 폴리아민 고함유 고추의 저장조건에 따른 함유량 비교 완료
3) 폴리아민 고함유 고추추출물 식이 마우스의 혈액이행 검토	- 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료 - 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행중에 있음 - 이는 추후 논문 투고(1편)를 계획하고 있음
4) 고추로부터 산업화 수준의 폴리아민 최적 추출 검토	- 폴리아민 고함유 고추로부터 분말상 식품 소재 개발을 위한 추출공정 확립 - 폴리아민 고함유 고추로부터 액상 화장품 소재 개발을 위한 추출공정 확립

5) 5~200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발	- 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 10mg/100mL 이상 함유 화장품 소재 개발 완료 - 폴리아민 고함유 고추추출물을 이용한 폴리아민 200mg/100mL 이상 함유 화장품 소재 개발 완료
6) 10~100mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말상 소재개발	- 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 50mg/100g 식품소재 개발 완료 - 폴리아민 고함유 고추 분말을 이용한 200mg/100g 식품소재 개발 완료
7) 12mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 가공식품 개발	- 폴리아민 15mg/100g 함유 녹차아이스크림 시제품제작

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10					70											10		10	
최종목표	1					4						1		1.5	1		4		2	
연구기간 내 달성실적	1					5						1		2.5	1		6		0	
달성율(%)	100					125						100		167	100		150		0	

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
1)	폴리아민 고함유 고추추출물의 생리적 활성 분석
2)	폴리아민 고함유 고추추출물의 추출 조건 확립
3)	폴리아민 고함유 고추추출물을 활용한 가공제품 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타 (논문)
1)의 기술	v									v
2)의 기술	v					v				
3)의 기술	v						v	v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
1)의 기술	- 폴리아민 고함유 고추 추출물의 세포독성 평가 완료 : 이는 폴리아민 고함유 추출물의 안정성을 검토한 연구 성과로서 식품 및 화장품 개발에 있어 안정성을 검토를 위한 기반으로 활용될 것임. - 폴리아민에 의한 세포증식 및 세포 단백질 발현 증가, 항염증 활성 확인 : 세포에서의 폴리아민 활성을 평가함으로써 폴리아민 고함유 고추 그 자체 및 개발 제품의 홍보에 사용 되어질 것으로 기대됨 - 폴리아민 고함유 고추추출물의 마우스 식이를 이용해 섭취 후 혈액에서의 폴리아민 농도 비교 분석 완료 : 이 결과를 근거로 현재 마우스 식이에 의한 효능 검증을 위한 연구를 진행 중에 있으며 추후 폴리아민 고함유 고추 및 이를 이용한 제품의 홍보에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.
2)의 기술	- 재배 조건에 따른 폴리아민 고함유 및 캡사이신 저함유 고추의 선별 완료 : 폴리아민 고함유 고추 재배를 위한 재배기간 및 재배지 등을 검토하였으며, 고농도의 고추 캡사이신은 추후 제품개발에 있어 제한적이므로 저함유 고추의 재배 조건 등을 검토 완료하였음. - 추출 용매별 폴리아민 추출 효율 평가 완료 : 폴리아민 고함유 고추의 폴리아민은 유리된 상태가 아닌 타 성분과 결합되어져 있는 것으로 판단됨에 따라 이들 고추로부터 고농도의 폴리아민을 추출하기 위한 여러 가지 용매들의 추출효율을 검토 함. 이들 고농도의 폴리아민 함유 추출물은 추후 가공제품 제작에 유용하게 활용될 것으로 기대됨. - 폴리아민 고함유 고추의 저장 및 건조방법에 따른 함유량 비교 완료 : 대부분의 농작물이 그렇듯이 고추 또한 재배 및 수확이 제한적인 농작물이므로 이들의 특정시기에의 수확에 따른 저장 및 건조 방법을 검토함으로써 폴리아민의 함량에 변화가 없는 조건을 마련함. - 다량의 폴리아민 고함유 고추의 최적 추출 검토 : 다량의 폴리아민 고함유 고추의 추출 조건을 최적화하기 위한 조건을 확립하였으며 이는 추후 식품 및 화장품 소재와 가공품 제작을 위해 고농도의 추출물이 유용하게 활용될 것으로 기대됨.

3)의 기술	- 10mg/100mL, 200mg/100mL 이상의 폴리아민 고함유 액상 소재 개발 2종 : 폴리아민 고함유 고추 추출물을 활용한 화장품 원료 개발함으로써 추후 항염증 등에 유용한 화장품 제품개발에 이용되어질 것으로 기대됨 - 50mg/100g, 200mg/100g 이상의 폴리아민 고함유 분말 소재 개발 2종 : 폴리아민 고함유 동결고추추출물을 활용한 식품분말소재의 개발로 여러 가지 음식물에 첨가용도의 제품으로 활용되어질 것으로 기대됨 - 15mg/100g 폴리아민 고함유 녹차아이스크림 개발 : 폴리아민 고함유 고추추출물 가공 녹차아이스크림을 개발함으로써 여러 가지 가공품으로의 가능성을 보임.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명			
가중치	10					70											10		10	
최종목표	1	1	2			4	10 10		4	20 0		1		1. 5	1		4		2	
연구기간 내 달성실적	1					5						1		2. 5	1		6			
연구종료후 성과창출 계획		1	2				10 10		4	20 0									2	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]	항염증 활성을 갖는 폴리아민 고함유 고추추출물의 유효 추출방법		
이전형태	■무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 ■기타(특허권리는 해피바이오텍에서 100% 갖기로 함)		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]	추출 공정에 대한 기술지도 실시		

[별첨 4]

참고문헌

1. Bigliardi B, Galati F. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. Trends in Food Science and Technology. 31(2):118-129.
2. Lee HY. 2013. Approval of Functional Ingredient of Health / Functional Foods in Korea. Food industry and Nutrition. 18(1):1-7.
3. Basu SK, Thomas J, Acharya S. 2007. Prospects for Growth in Global Nutraceutical and Functional Food Markets: A Canadian Perspective. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. (July 2014):637-649.
4. Schieber A, Stintzing FC, Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. Trends in Food Science and Technology. 12(11):401-413.
5. Varzakas T, Zakynthinos G, Verpoort F. 2016. Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. Foods. 5(4):88.
6. de Sá Mendes N, Santos MCP, Santos MCB, Cameron LC, Ferreira MSL, Gonçalves ÉCBA. 2019. Characterization of pepper (Capsicum baccatum) - A potential functional ingredient. Lwt. 112(January):108-209.
7. Pegg AE. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life. 61(9):880-894.
8. Thomas T, Thomas TJ. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. Cellular and Molecular Life Sciences. 58(2):244-258.
9. HEBY O. 1981. Role of Polyamines in the Control of Cell Proliferation and Differentiation. Differentiation. 19(1-3):1-20.
10. Soda K, Kano Y, Sakuragi M, Takao K, Lefor A, Konishi F. 2009. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo). 55(4):361-366.
11. Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F. 2009. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. Experimental Gerontology. 44(11):727-732.
12. Muñoz-Esparza NC, Latorre-Moratalla ML, Comas-Basté O, Toro-Funes N, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. 2019. Polyamines in food. Frontiers in Nutrition. 6(July):1-11.
13. Paul S, Kang SC. 2013. Natural polyamine inhibits mouse skin inflammation and macrophage activation. Inflammation Research. 62(7):681-688.
14. Spizzirri UG, Picci N, Restuccia D. 2016. Extraction efficiency of different solvents and LC-UV determination of biogenic amines in tea leaves and infusions. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2016.
15. Slocum RD, Flores HE, Galston AW, Weinstein LH. 1989. Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. Plant Physiology. 89(1989):512-517.
16. Wehr JB. 1995. Purification of plant polyamines with anion-exchange column clean-up prior to high-performance liquid chromatographic analysis. Journal of Chromatography A. 709(2):241-247.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.